

50376
2000
284

N° ordre

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

THESE



présentée par

Isabelle DUTHILLE-DHENNIN

pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE

option Sciences de la Vie et de la Santé

Rôle de la lactoferrine dans la maturation des cellules T

- Induction d'un signal de transduction aboutissant à l'expression du CD4 dans les cellules lymphoblastiques T Jurkat.
- Effets comparatifs des lactoferrines humaine et bovine.

Soutenue le 3 octobre 2000 devant la commission d'examen :

Président :	R. CACAN	Professeur, Université de Lille1
Rapporteurs :	G. LESCOAT	Directeur de Recherche INSERM, Rennes
	B. VANDENBUNDER	Directeur de Recherche CNRS, Institut de Biologie de Lille
Examineurs :	J. MAZURIER	Directeur de Recherche CNRS, Lille1
	J.P. PERRAUDIN	Directeur de la Société Domo-Biopole, Bruxelles
	G. SPIK	Professeur, Université de Lille1

Ce travail a été réalisé sous la direction du Docteur Joël Mazurier 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 †, Directeur intérimaire : Jean-Claude Michalski).

A David,

A ma mère,

A mon grand-père,

*Avec toute mon affection et ma reconnaissance
pour m'avoir soutenue, réconfortée et encouragée
tout au long de mes études,
et plus particulièrement au cours de cette thèse.*

Je remercie vivement les membres de ce jury :

Monsieur le Professeur René Cacan,

Je suis particulièrement honorée que vous ayez accepté de présider ce jury de thèse. Veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements et soyez assuré de ma profonde gratitude.

Madame le Professeur Geneviève Spik,

Je vous remercie de m'avoir accueillie dans votre équipe, et d'avoir ainsi permis mon intégration dans le groupe "lacto". Vous me faites l'honneur et le plaisir de siéger dans ce jury. Trouvez dans ce mémoire le témoignage de mon plus profond respect.

Docteur Joël Mazurier,

Je te remercie pour la confiance et la grande liberté de mouvements que tu m'as accordée au cours de ces années de DEA et de thèse. Je te suis également reconnaissante pour m'avoir laissée me forger une expérience en enseignement.

Monsieur le Docteur Gérard Lescoat,

Monsieur le Docteur Bernard Vandenburg,

Je suis très honorée que vous ayez accepté de juger cette thèse en qualité de rapporteur, et de consacrer de votre temps à la lecture et la critique de ce travail. Veuillez croire en l'expression de ma respectueuse et sincère reconnaissance.

Monsieur le Docteur Jean-Paul Perraudin,

Je trouve ici l'occasion de vous remercier d'avoir organisé et participé au financement d'une partie de ma thèse, et d'avoir toujours suivi mes travaux avec beaucoup d'intérêt. Votre présence dans ce jury me fait extrêmement plaisir, soyez assuré de ma très vive gratitude.

Je tiens également à remercier tout particulièrement :

Monsieur le Docteur Tomita (Morinaga Milk Industry), *Monsieur Cruse* (Armor Proteins) et *Monsieur Richardson* (Tatua Biological) qui ont également contribué au financement de cette thèse dans le cadre d'une collaboration industrielle.

Véronique Fafeur et Réjane Paumelle, membres du laboratoire du Docteur Bernard Vandebunder, qui m'ont initiée aux techniques de transfection et d'analyse d'activité luciférase. Je vous remercie d'avoir su me faire profiter de vos compétences techniques et scientifiques.

Les membres des équipes "lacto" et "cyclo" :

Annick, ma coéquipière sportive, pour le dynamisme et l'énergie que tu insuffles au laboratoire.

Dominique, pour ta bonne humeur, ton humour et tes histoires "pas classes"... bref pour ton art de détendre l'atmosphère.

Elisabeth et Fabrice, pour vos précieux conseils et discussions scientifiques, ainsi que pour les bons moments passés ensemble en enseignement.

Monique, pour tes connaissances techniques et ton aide lors de mon incursion dans le monde de la biologie moléculaire.

Maryse, malgré ton côté "ronchon" et nos petits conflits, je te remercie de m'avoir initiée à la culture cellulaire, et surtout de m'avoir aidée techniquement et moralement lors des différents temps forts de cette thèse.

Danielle, Carine, Sophie, Sandrine, Mathieu et Noël, pour vos encouragements et votre soutien moral, pour la bonne ambiance qui règne entre nous et les conversations heureusement souvent "hors-sujet".

Tous les autres membres et ex-membres du C9, pour la gentillesse et la sympathie qu'ils m'ont témoignée tout au long de ces années.

Ainsi que *Sandrine, Christophe, Christine, Bénédicte, Denis, Tony*... et bien d'autres encore pour leur amitié et les moments agréables que nous avons passés ensemble.

Résumé

La lactoferrine est une glycoprotéine sécrétée dans les liquides de sécrétion, notamment dans le lait, et libérée dans le plasma par dégranulation des neutrophiles. Les principales propriétés biologiques de la lactoferrine concernent les processus inflammatoire et immunitaire. La lactoferrine est, en effet, capable d'accélérer la maturation des cellules T en augmentant l'expression de l'antigène de surface CD4.

Afin d'approfondir cet effet de la lactoferrine humaine sur les cellules T, nous avons utilisé la lignée humaine lymphoblastique T Jurkat. Nous avons ainsi montré que la lactoferrine augmente la densité de surface du CD4 en modulant l'expression du gène de ce marqueur : la synthèse des ARNm ainsi que l'activité du promoteur du gène du CD4 sont stimulées par la lactoferrine.

Le mécanisme d'action aboutissant à cette régulation a été élucidé en étudiant le signal de transduction induit par fixation de la lactoferrine à son récepteur. Nous avons observé que la lactoferrine stimule la phosphorylation de nombreuses protéines cytosoliques, et qu'elle active une seule isoforme de la MAP Kinase ("Mitogen-Activated Protein Kinase"). L'utilisation des inhibiteurs génistéine et PD98059 a ensuite permis de corrélérer ces deux événements à l'expression du CD4. Enfin, en utilisant des cellules Jurkat déficientes en protéine Lck, les cellules J.CaM1.6, nous avons démontré que la kinase p56^{lck} est nécessaire à la régulation du CD4 par la lactoferrine.

La dernière partie de nos travaux a consisté à comparer les effets des lactoferrines d'origine humaine et bovine sur certaines cellules du système immunitaire. Les deux protéines présentent les mêmes activités sur la cytotoxicité des cellules NK ("Natural Killer") envers des lignées tumorales, et sur la régulation de la densité du CD4 à la surface des cellules Jurkat. Par ailleurs, nos résultats indiquent que la protéine bovine régule l'expression du CD4 en stimulant également l'activité de la MAP Kinase.

Abstract

Lactoferrin is a glycoprotein which is found in external secretions, such as milk, and released in plasma by neutrophils during inflammation. The main biological properties of lactoferrin are thought to concern inflammation and immunomodulation processes. Lactoferrin is notably able to accelerate the T-cell maturation by inducing the expression of the CD4 surface marker.

To gain further insights into the maturation of T-cells through the expression of CD4, we used the human lymphoblastic T Jurkat cell line. We showed that lactoferrin increases the cell surface density of CD4 by acting on the CD4 gene expression. Indeed, the synthesis of CD4 mRNA and the activity of the CD4 gene promoter were enhanced in lactoferrin treated cells.

The mechanism by which lactoferrin acts on the CD4 regulation was then investigated by studying the transduction pathway induced by the binding of lactoferrin on Jurkat cells. We observed that lactoferrin stimulates the tyrosine phosphorylation of numerous cytosolic proteins, and activates only one isoform of MAP Kinase (Mitogen-Activated Protein Kinase). The use of the inhibitors genistein and PD98059 allowed us to correlate the tyrosine kinases, the MAP Kinase and the CD4 expression. Finally, using Lck-defective Jurkat cells, the J.CaM1.6 cells, we showed that the p56^{lck} kinase is necessary for MAP Kinase activity and CD4 expression.

The last part of our results concerned the comparative effects of human and bovine lactoferrins on cells involved in the immune response, such as NK (Natural Killer) and Jurkat cells. These two proteins present the same activities on the NK cell cytotoxicity against tumour cell lines, and on the regulation of CD4 density in Jurkat cells. Moreover our data indicate that bovine lactoferrin regulates the CD4 expression through the activation of the MAP Kinase enzyme.

Sommaire

<i>Introduction</i>	1
<i>Généralités</i>	6
I- DISTRIBUTION CELLULAIRE ET TISSULAIRE DE LA LACTOFERRINE	6
1- La lactoferrine issue des cellules épithéliales	6
1.1- Le lait	6
1.2- Les autres liquides de sécrétion	7
2- La lactoferrine issue des leucocytes	7
2.1- Le sang	7
2.2- Les cellules myéloïdes	8
II- BIOSYNTHÈSE DE LA LACTOFERRINE	9
1- Gène de la lactoferrine	9
1.1- Le gène de la lactoferrine murine	9
1.2- Le gène de la lactoferrine humaine	10
2- Régulation de l'expression du gène de la lactoferrine	10
2.1- La régulation au cours de la différenciation	13
2.1.1- <i>La myélopoïèse</i>	13
2.1.2- <i>L'embryogenèse</i>	14
2.1.3- <i>Les modifications morphologiques</i>	15
2.2- La régulation hormonale	15
2.2.1- <i>La glande mammaire</i>	15
2.2.2- <i>L'utérus</i>	16
2.3- La régulation transcriptionnelle	17

III- STRUCTURE DE LA LACTOFERRINE	18
1- Structure de la partie protéique	18
1.1- La séquence primaire	18
1.2- La structure tridimensionnelle	19
2- Structure des glycanes	22
IV- SITES DE FIXATION DE LA LACTOFERRINE À LA SURFACE DES CELLULES DE MAMMIFÈRES	24
1- Récepteurs et devenir du complexe lactoferrine-récepteur	24
1.1- Le LRP	24
<i>1.1.1- Les hépatocytes</i>	24
<i>1.1.2- Les cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique</i>	26
<i>1.1.3- Le site d'interaction de la lactoferrine avec le LRP</i>	26
1.2- Le RHL-1, sous-unité majeure du récepteur des asialoglycoprotéines	27
<i>1.2.1- Les hépatocytes</i>	27
<i>1.2.2- Le site d'interaction de la lactoferrine avec le RHL-1</i>	29
1.3- Le récepteur lymphocytaire	30
<i>1.3.1- Les lymphocytes</i>	30
<i>1.3.2- Les plaquettes</i>	33
<i>1.3.3- Les cellules épithéliales de la glande mammaire</i>	34
<i>1.3.4- Les cellules du système nerveux central</i>	36
<i>1.3.5- Le site d'interaction de la lactoferrine avec le récepteur lymphocytaire</i>	36
2- Protéoglycanes	37
2.1- L'héparine	37
2.2- Les protéoglycanes membranaires	38
2.3- Le site d'interaction de la lactoferrine avec les protéoglycanes	39

V- RÔLES BIOLOGIQUES DE LA LACTOFERRINE	41
1- Modulation de la prolifération cellulaire	41
1.1- L'effet prolifératif de la lactoferrine	42
1.2- L'effet anti-prolifératif de la lactoferrine	43
2- Modulation de la maturation	44
2.1- La régulation de l'hématopoïèse	44
2.2- La maturation des lymphocytes B et T immatures	45
2.3- La modulation de la synthèse d'anticorps	47
3- Modulation de l'activité cytotoxique des cellules mononucléées du sang	48
3.1- Les cellules NK	48
3.2- Les monocytes	49
4- Mécanisme d'action de la lactoferrine	50
4.1- L'activité facteur de transcription	50
4.2- L'activation de signaux de transduction	52
5- Conclusion	53
<i>Travaux personnels.....</i>	55

PARTIE I

MODE D'ACTION DE LA LACTOFERRINE HUMAINE SUR LES CELLULES LYMPHOBLASTIQUES T JURKAT	55
--	----

-A-

EFFET DE LA LACTOFERRINE SUR LES CELLULES JURKAT	55
I - INTRODUCTION	55
1- Gène du CD4	56
2- Régulation du gène du CD4 lors du développement des cellules T	58

3- Rôle du CD4 dans la réponse immunitaire	60
II- RÉSULTATS	62
1- Régulation de la densité de surface de l'antigène CD4	62
2- Régulation de l'expression du gène du CD4	65
2.1- Détection des ARNm par RT-PCR	65
2.2- Régulation du promoteur du gène du CD4	67
3- Régulation du cycle cellulaire	69
III- DISCUSSION	71
-B-	
SIGNAL DE TRANSDUCTION IMPLIQUÉ DANS	
LA RÉGULATION DU CD4 PAR LA LACTOFERRINE	
	73
I- INTRODUCTION	73
Signal de transduction transmis par le complexe TCR/CD3 dans les lymphocytes T	74
1- La voie de la phospholipase C	75
2- La voie Ras/MAP Kinase	75
II- RÉSULTATS	80
1- Régulation des flux calciques	80
2- Induction d'une cascade de phosphorylation sur les résidus tyrosine de protéines cytosoliques	82
3- Activation de la MAP Kinase	84
3.1- Stimulation de l'activité MAP Kinase	84
3.2- Stimulation de la phosphorylation de la MAP Kinase	90
4- Implication de la MAP Kinase dans la régulation du CD4	92
4.1- Cytotoxicité des inhibiteurs	92
4.2- Effet des inhibiteurs sur la régulation du CD4	94

4.3- Effet de la génistéine sur l'activité MAP Kinase	94
5- Implication de la protéine p56^{lck}	97
5.1- Fixation de la lactoferrine à la surface des cellules Jurkat et J.CaM1.6	97
5.2- Effet de la lactoferrine sur la régulation du CD4 à la surface des J.CaM1.6	98
5.3- Effet de la lactoferrine sur l'activité MAP Kinase des J.CaM1.6	101
III- DISCUSSION	103

PARTIE II

EFFET COMPARATIF DES LACTOFERRINES HUMAINE ET BOVINE

SUR L'EXPRESSION DU CD4 DANS LES CELLULES JURKAT

ET SUR LA CYTOTOXICITE DES CELLULES NK

I- INTRODUCTION	107
II -RÉSULTATS	110
1- Modulation de la cytotoxicité des cellules NK	110
1.1- Effet des lactoferrines sur les cellules effectrices NK	110
1.2- Effet des lactoferrines sur les cellules cibles MDA-MB-231	113
2- Régulation de l'expression de l'antigène CD4 à la surface des cellules lymphoblastiques T Jurkat	115
2.1- Régulation de la densité de l'antigène de surface CD4	116
2.2- Activation de la MAP Kinase	116
2.3- Implication de la MAP Kinase dans la régulation du CD4	119
III- DISCUSSION	121
<i>Conclusion générale.....</i>	124

<i>Appendice technique</i>	127
I- MATÉRIEL	127
1- Lactoferrines	127
1.1- Préparation des lactoferrines humaine et bovine	127
1.2- Préparation de la lactoferrine marquée à la fluorescéine	128
2- Lignées cellulaires	128
2.1- Lignées hématopoïétiques humaines	128
2.2- Lignée épithéliale mammaire humaine	129
3- Préparation de la population lymphocytaire	129
3.1- Séparation de la population lymphocytaire totale	129
3.2- Enrichissement de la population lymphocytaire en cellules NK CD3 ⁻ CD20 ⁻ CD56 ⁺	130
II- MÉTHODES	130
1- Culture cellulaire	130
1.1- Culture des lignées hématopoïétiques	130
1.2- Culture des cellules mammaires cancéreuses	131
2- Techniques de cytofluorimétrie en flux	131
2.1- Détection d'antigènes de surface	131
2.2- Analyse du cycle cellulaire	132
2.3- Analyse des flux calciques	132
2.4- Analyse de la viabilité cellulaire	133
2.5- Fixation de la lactoferrine humaine fluorescente	133
3- Préparation des lysats cellulaires	134

4- Immunorévélation	134
4.1- Electrophorèse en gel de polyacrylamide	134
4.2- Electrotransfert	135
4.3- Détection à l'aide d'anticorps	135
4.3.1- <i>Immunorévélation P-Tyr</i>	135
4.3.2- <i>Immunorévélation P-Erk</i>	135
5- Mesure de l'activité MAP Kinase	136
5.1- Méthode des "mini-colonnes"	136
5.2- Immunoprécipitation de la MAP Kinase	137
5.3- Gel de polyacrylamide	137
6- Test de cytotoxicité	138
6.1- Marquage des cellules cibles	138
6.1.1- <i>Cellules hématopoïétiques</i>	138
6.1.2- <i>Cellules épithéliales mammaires</i>	138
6.2- Cytolyse	139
6.3- Conditionnement des cellules avant le test de cytolys	139
6.3.1- <i>Prétraitement des cellules effectrices avec la lactoferrine</i>	139
6.3.2- <i>Prétraitement des cellules cibles avec la lactoferrine</i>	140
7- Techniques de biologie moléculaire	140
7.1- Extraction des ARN totaux	140
7.2- RT-PCR	141
7.3- Electrophorèse en gel d'agarose	142
8- Mesure de l'activité luciférase	142
8.1- Construction des vecteurs	142
8.1.1- <i>Le vecteur -1076CD4p</i>	143
8.1.2- <i>Le vecteur pGL3b</i>	143

8.2- Production des vecteurs	143
8.2.1- Transformation des bactéries	143
8.2.2- Production des plasmides	145
8.3- Transfection des cellules Jurkat par électroporation	146
<i>Bibliographie</i>	147
<i>Annexes</i>	171
Article 1 :	
Isabelle Dhennin-Duthille, Maryse Masson, Eve Damiens, Carine Fillebeen, Geneviève Spik, Joël Mazurier (2000). <i>Lactoferrin upregulates the expression of CD4 antigen through the stimulation of the mitogen-activated protein kinase in the human lymphoblastic T Jurkat cell line</i> . J. Cell. Biochem., sous presse.	171
Article 2 :	
Isabelle Dhennin-Duthille, Eve Damiens, Maryse Masson, Dominique Legrand, Elisabeth Ellass-Rochard, Yolande Boilly-Marer, Joël Mazurier (2000). <i>Comparative studies of human and bovine lactoferrins effects on immune system</i> . Adv. Exp. Med. Biol., 443 : 257-260.	200

Abréviations

ADCC : Antibody-Dependent Cell Cytotoxicity	EGF : Epidermal Growth Factor
ADN : Acide DésoxyriboNucléique	EGFRE : EGF Response Element
AMP : Adenosyl MonoPhosphate	ELP : Embryonic Long terminal repeat- binding Protein
apoE : Apolipoprotein E	ERE : Estrogen Response Element
AR : Acides Rétinoïques	FITC : Fluorescein 5'-isothiocyanate
Arg : Arginine	GAG : Glycoaminoglycannes
ARN : Acide RiboNucléique	GAPDH : Glyceraldéhyde-3- phosphodéhydrogénase
ARNm : ARN messenger	Gln : Glutamine
Asn : Asparagine	GM-CSF : Granulocyte/ Macrophage-CSF
Asp : Aspartate	GTP : Guanosyl TriPhosphate
ATF : Activating Transforming Factor	His : Histidine
ATP : Adenosyl TriPhosphate	hLf : Lactoferrine humaine
BET : Bromure d'éthydiuim	HLH : Helix Loop Helix
bLf : Lactoferrine bovine	HRP : Horse Radish Peroxidase
CAT : Chloramphenicol Acetyl Transferase	Hyf : {5-[(2-(carbohydrazino)méthyl) thio]acétyl] amino-fluorescéine}
CD : Cluster of Differentiation	IFN : Interferon
Cdk : Cyclin-dependent kinase	Ig : Immunoglobuline
CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité	Il : Interleukine
COUP (-TF) : Chicken Ovalbumin Upstream Element (Transcription Factor)	kb : kilobase
CRE : Cyclic-AMP Response Element	kDa : kilo Dalton
CSF : Colony Stimulating Factor	LDL : Low Density Lipoprotein
Cys : Cystéine	LEF : Lymphoid Enhancer Factor
DEAE : Diéthylaminoéthyl	LPS : Lipopolysaccharides
ΔLf : delta lactoferrine	LRP : LDL Receptor-related Protein
ECL : Enhanced ChemiLuminescence	Lys : Lysine
	MAP Kinase : Mitogen-Activated Protein Kinase

MBP : Myelin Basic Protein

mERM : composite Estrogen Response
Module

MRU : Mitogen Response Unit

NGF : Nerve Growth Factor

NK : Natural Killer

pb : paire de bases

PBS : Phosphate Buffered Saline

PCR : Polymerase Chain Reaction

pH : potentiel Hydrogène

PHA : Phytohématagglutinine

Phe : Phénylalanine

PKA : AMP cyclic-dependent Protein
Kinase

PKC : Protéine kinase C

PLC : Phospholipase C

Pro : Proline

RAP : Receptor-Associated Protein

RARE : Retinoic Acid Response Element

RHL-1 : Rat Hepatic Lectin-1

RT-PCR : RetroTranscription Polymerase
Chain Reaction

SAB : Sérumbalbumine

SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate-
Polyacrylamide Gel
Electrophoresis

Ser : Sérine

TBS : Tris Buffered Saline

TCF : T Cell Factor

TCR : T Cell Receptor

TGF : Transforming Growth Factor

Thr : Thréonine

TNF : Tumor Necrosis Factor

Tyr : Tyrosine

Val : Valine

VLDL : Very Low Density Lipoprotein

Introduction

La lactoferrine est une glycoprotéine présente dans tous les liquides de sécrétion, notamment dans le lait (Montreuil *et al.*, 1960), et à la surface des muqueuses où elle est produite et sécrétée par les cellules endothéliales. La lactoferrine est également stockée dans les granules secondaires des leucocytes neutrophiles (Masson *et al.*, 1969), et libérée dans la circulation sanguine par dégranulation des neutrophiles sur le lieu de l'inflammation.

Le rôle de la lactoferrine n'est pas encore bien défini, cependant il a été montré qu'elle est impliquée dans la défense de l'organisme, notamment dans les processus inflammatoire, anti-tumoral et immunitaire. Cette protéine régule en effet la production de cytokines pro-inflammatoires (Crouch *et al.*, 1992 ; Sorimachi *et al.*, 1997), et module les propriétés adhésives des leucocytes aux cellules endothéliales lors du recrutement de ces cellules sur le lieu de l'inflammation (Boxer *et al.*, 1982 ; Kurose *et al.*, 1994). *In vivo* la lactoferrine réduit également la croissance de tumeurs solides et inhibe la dissémination de métastases expérimentales (Bezault *et al.*, 1994). Cette activité anti-tumorale semble être due, d'une part, à la stimulation de la cytotoxicité des cellules NK ("Natural Killer") et, d'autre part, à une inhibition de la prolifération des cellules cibles cancéreuses (Damiens *et al.*, 1998b). Enfin, la lactoferrine accélère le processus de maturation des lymphocytes B et T immatures : les cellules B spléniques murines montrent un changement phénotypique dans le ratio de leurs marqueurs de surface IgM et IgD (Zimecki *et al.*, 1995). De façon similaire, en présence de lactoferrine, les thymocytes murins double négatifs CD4⁻CD8⁻ acquièrent l'antigène de surface CD4, phénotype caractéristique des cellules T auxiliaires (Zimecki *et al.*, 1991).

Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes attaché à définir le mécanisme d'action de la lactoferrine humaine sur l'expression de l'antigène CD4 lors de la maturation des cellules T immatures. Pour cela, nous avons utilisé, comme modèle expérimental, la lignée humaine lymphoblastique T Jurkat qui exprime le récepteur lymphocytaire de la lactoferrine (Bi *et al.*, 1994 ; Legrand *et al.*, 1997), et qui présente une faible densité du marqueur de surface CD4.

Le premier point de notre étude a été d'approfondir nos connaissances concernant l'activité de la lactoferrine sur l'expression du CD4 dans les cellules Jurkat. Pour cela, l'effet du temps d'incubation et de la concentration en lactoferrine a été étudié sur la densité de surface du marqueur, ainsi que sur le cycle cellulaire. L'expression du CD4 étant généralement régulé au niveau transcriptionnel (Sawada *et al.*, 1994 ; Siu *et al.*, 1994), nous nous sommes également intéressée à la synthèse des transcrits du CD4 et à l'activité du promoteur du gène de ce marqueur.

Les événements intracellulaires induits par la lactoferrine dans ses cellules cibles ont été peu étudiés jusqu'à présent. Cependant la lactoferrine est capable d'activer la phosphorylation sur les résidus tyrosine de protéines macrophagiques (Tanaka *et al.*, 1998), et de stimuler une voie de transduction dépendante de la PKA (Protéine Kinase A) via une protéine G hétérotrimérique dans les cellules hépatocytaires HepG2 (Goretzki et Mueller, 1998). Dans le cas des lymphocytes T immatures, nous sommes les premiers à avoir étudié le signal de transduction induit par la fixation de la lactoferrine à son récepteur spécifique et aboutissant à l'augmentation de la densité de l'antigène de surface CD4.

Afin d'élucider ce signal de transduction dans les cellules Jurkat, nous avons regardé l'effet de la lactoferrine sur certains événements connus pour être impliqués dans de nombreuses voies de transduction : les flux calciques, la phosphorylation sur les résidus tyrosine des protéines cytosoliques, ainsi que l'activité et la phosphorylation de l'enzyme MAP Kinase ("Mitogen-Activated Protein Kinase"). Le prétraitement des cellules par les inhibiteurs génistéine et PD98059 a permis de corréler les tyrosine kinases, la MAP Kinase et l'expression du CD4. Enfin, grâce à l'utilisation des cellules mutantes J.CaM1.6, qui sont des cellules Jurkat déficientes en protéine Lck, nous avons démontré l'implication de cette kinase dans la régulation du CD4 par la voie des MAP Kinases.

Le dernier point de ce travail a été d'étudier les effets de la lactoferrine bovine, qui possède une structure conformationnelle similaire à celle de l'humaine (Moore *et al.*, 1997 ; Baker *et al.*, 1998), sur certaines cellules impliquées dans l'immunomodulation. Dans le cadre d'une collaboration avec des industries (*Morinaga Milk Industry, Japon ; Armor Proteins, France ; Domo-Biopole, Belgique ; Tatua Biological, Nouvelle-Zélande.*) désirant valoriser le lactosérum bovin en utilisant les propriétés biologiques de la lactoferrine, il était nécessaire de comparer l'activité de la lactoferrine bovine à celle de l'humaine. Nous avons pour cela choisi de travailler sur deux modèles cellulaires utilisés couramment dans notre laboratoire, qui sont les cellules NK humaines et la lignée lymphoblastique T humaine Jurkat. Les effets des deux protéines ont été étudiés sur l'activité cytotoxique des cellules NK envers des lignées cellulaires cancéreuses hématopoïétiques et mammaires, et sur la régulation de la densité de l'antigène CD4 à la surface des cellules Jurkat.

L'ensemble de nos travaux a permis de mieux définir et de comprendre l'effet et le mode d'action de la lactoferrine humaine sur le processus de maturation des cellules T immatures et les résultats obtenus ont fait l'objet des publications et des présentations suivantes :

Publications

- 1- Isabelle Dhennin-Duthille, Maryse Masson, Eve Damiens, Carine Fillebeen, Geneviève Spik, Joël Mazurier (2000). *Lactoferrin upregulates the expression of CD4 antigen through the stimulation of the mitogen-activated protein kinase in the human lymphoblastic T Jurkat cell line*. J. Cell. Biochem., sous presse.
- 2- Eve Damiens, Joël Mazurier, Ikram El Yazidi, Maryse Masson, Isabelle Duthille, Geneviève Spik, Yolande Boilly-Marer (1998). *Effects of human lactoferrin on NK cell cytotoxicity against haematopoietic and epithelial tumour cells*. Biochim. Biophys. Acta, 1402: 277-287.

Par ailleurs, une partie de notre travail, ne figurant pas dans ce mémoire, a consisté en la participation à d'autres publications :

- 3- Eve Damiens, Ikram El Yazidi, Joël Mazurier, Elisabeth Ellass-Rochard, Isabelle Duthille, Geneviève Spik, Yolande Boilly-Marer (1998). *Role of heparan sulphate proteoglycans in the regulation of human lactoferrin binding and activity in the MDA-MB-231 breast cancer cell line*. Eur. J. Cell Biol., 77: 344-351.
- 4- Eve Damiens, Ikram El Yazidi, Joël Mazurier, Isabelle Duthille, Geneviève Spik, Yolande Boilly-Marer (1999). *Lactoferrin inhibits G1 cyclin-dependent kinases during growth arrest of human breast carcinoma cells*. J. Cell. Biochem., 74: 486-498.
- 5- Carine Fillebeen, Bénédicte Dehouck, Monique Benaïssa, Isabelle Dhennin-Duthille, Roméo Cecchelli, Annick Pierce (1999). *TNF α increases lactoferrin transcytosis through the blood-brain barrier*. J. Neurochem., 73: 2491-2500.

Autres publications dans des chapitres d'ouvrages

- 1- Isabelle Duthille, Maryse Masson, Geneviève Spik, Joël Mazurier (1998). *Lactoferrin stimulates the mitogen-activated protein kinase in the human lymphoblastic T Jurkat cell line*. Adv. Exp. Med. Biol., 443 : 257-260.
- 2- Isabelle Dhennin-Duthille, Eve Damiens, Maryse Masson, Dominique Legrand, Elisabeth Ellass-Rochard, Yolande Boilly-Marer, Joël Mazurier (2000). *Comparative studies of human and bovine lactoferrins effects on immune system* in "Lactoferrin : Structure, Functions and Applications", Elsevier press (Kei-chi Shimazaki, Hiroyuki Tsuda, Mamoru Tomita, Tamotsu Kuwata, Jean-Paul Perraudin, eds) 129-135.

Présentations (l'orateur est souligné)

Communications par affiches

- 1- Isabelle Duthille, Maryse Masson, Geneviève Spik, Joël Mazurier.
La lactotransferrine stimule la phosphorylation de polypeptides cytosoliques sur les résidus tyrosine et thréonine, et active l'enzyme MAP Kinase dans la lignée lymphoblastique T Jurkat.
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.

Communications orales

- 1- Isabelle Duthille, Maryse Masson, Geneviève Spik, Joël Mazurier.
La lactotransferrine stimule la phosphorylation de polypeptides cytosoliques sur les résidus tyrosine et thréonine, et active l'enzyme MAP Kinase dans la lignée lymphoblastique T Jurkat.
Colloque Lille-ULB. Université Libre de Bruxelles, Belgique, 9 janvier 1997.

- 2- Isabelle Duthille, Maryse Masson, Geneviève Spik, Joël Mazurier.
Lactoferrin stimulates the mitogen-activated protein kinase in the human lymphoblastic T Jurkat cell line.
Third International Conference on Lactoferrin. Le Touquet, France, 5-9 mai 1997.

- 3- Isabelle Duthille, Maryse Masson, Geneviève Spik, Joël Mazurier.
Lactoferrin activates mitogen-activated protein kinase and stimulates expression of CD4 in the human lymphoblastic T Jurkat cell line.
European Iron Club Meeting. Utrecht, The Netherlands, 9-12 juillet 1998.

- 4- Isabelle Duthille, Maryse Masson, Geneviève Spik, Joël Mazurier.
Lactoferrin activates mitogen-activated protein kinase and stimulates expression of CD4 in the human lymphoblastic T Jurkat cell line.
Société Française de Biochimie et Biologie Moléculaire, Colloque du groupe thématique "Phosphorylation des protéines". Arcachon, France, 21-23 septembre 1998.

- 5- Isabelle Duthille, Maryse Masson, Joël Mazurier.
Do bovine and human lactoferrins induce T-cell maturation by activating the mitogen-activated protein kinase pathway ?
Fourth International Conference on Lactoferrin. Sapporo, Japan, 18-22 mai 1999.

Généralités

LA LACTOFERRINE

I- DISTRIBUTIONS CELLULAIRE ET TISSULAIRE DE LA LACTOFERRINE

La lactoferrine est largement représentée dans l'organisme, et son origine est diverse puisqu'elle est à la fois un produit de sécrétion des cellules épithéliales et un composé des granules des leucocytes neutrophiles.

1- La lactoferrine issue des cellules épithéliales

1.1- Le lait

Dès 1939, Sørensen et Sørensen décrivent une fraction protéique rouge dans le lait de vache. La lactoferrine, protéine de couleur saumon, a plus tard été purifiée du lait humain (Montreuil *et al.*, 1960 ; Johansson, 1960) et du lait bovin (Groves, 1960). Le criblage de différentes espèces de mammifères a ensuite montré sa présence dans le lait de toutes les espèces étudiées sauf chez le rat, le chien et le lapin, et que sa concentration est la plus élevée chez l'humain (Masson et Heremans, 1971).

Le taux en lactoferrine du lait de femme varie en fonction de l'état nutritionnel maternel (Houghton *et al.*, 1985 ; Hennart *et al.*, 1991) et au cours de la lactation. En effet la concentration en lactoferrine est de 5-7 g/l dans le colostrum, puis diminue dans le lait de transition (environ 4 g/l) pour se stabiliser à 1-3 g/l dans le lait mature (Nagasawa *et al.*, 1972 ; Hirai *et al.*, 1990 ; Levay et Viljoen, 1995 pour revue générale). A titre de comparaison, le taux en lactoferrine durant la lactation établie chez les ruminants est très faible, puisqu'inférieure à 0,1 g/l (Harmon *et al.*, 1975 ; Sanchez *et al.*, 1988).

1.2- Les autres liquides de sécrétion

Après sa découverte dans le lait, la lactoferrine a été détectée dans de nombreux liquides biologiques tels que le liquide séminal (Heckman Rumke, 1969), le fluide synovial (Bennett *et al.*, 1973), la bile (Van Vugt *et al.*, 1975), les larmes (Broekhuysse, 1974 ; Mason et Taylor, 1978), la salive (Miyachi, 1984) et enfin dans les sécrétions des muqueuses sinusales (Fukami *et al.*, 1993).

La lactoferrine présente dans ces liquides de sécrétions provient en fait des glandes exocrines localisées dans les systèmes respiratoire, reproductif, et digestif (Inoue *et al.*, 1993). En effet la lactoferrine est retrouvée dans les sécrétions bronchiques (Biserte *et al.*, 1963 ; Masson *et al.*, 1965, 1966), dans les cellules épithéliales des canaux alvéolaires des glandes mammaires (Campbell *et al.*, 1992), et dans le tractus génital, à la fois chez l'homme (Wichmann *et al.*, 1989), et chez la femme notamment dans l'endomètre (Masson *et al.*, 1968). Enfin les épithéliums de l'appareil digestif tels que ceux des glandes salivaires (Miyachi, 1984), de l'estomac (Valnes *et al.*, 1984), du pancréas (Colomb *et al.*, 1976) et du duodénum (Isobe *et al.*, 1978) expriment la lactoferrine.

2- La lactoferrine issue des leucocytes

2.1- Le sang

La concentration plasmatique de la lactoferrine est relativement faible, de l'ordre de 1 à 2 $\mu\text{g/ml}$, à cause du mécanisme efficace de clairance hépatique de la lactoferrine (Karle *et al.*, 1979 ; Regoeczi *et al.*, 1985). Cependant ce taux peut varier jusque 1,6 mg/ml selon les études, et notamment selon les techniques de préparation du plasma et les méthodes de dosage utilisées (Antonsen *et al.*, 1993 ; Levay et Viljoen, 1995 pour revues générales). Ce taux augmente chez les patients atteints de leucémies myéloïdes chroniques (Bennett et Mohla, 1976 ; Olofsson *et al.*, 1977), et semble également être sous contrôle hormonal puisqu'il varie au cours de la grossesse (Sykes *et al.*, 1982) et chez les femmes ménopausées (Bennett et Mohla, 1976). Mais la lactoferrine plasmatique est surtout considérée comme un marqueur de l'inflammation, sa concentration étant fortement augmentée lors de maladies inflammatoires telles que l'arthrite rhumatoïde (Baynes *et al.*, 1986a ; Adeyemi *et al.*, 1990).

La corrélation entre le taux sanguin de la lactoferrine et la densité de neutrophiles circulants (Baynes *et al.*, 1986b) suggère une origine leucocytaire de la lactoferrine plasmatique (Olofsson *et al.*, 1977).

2.2- Les cellules myéloïdes

La lactoferrine est présente dans les leucocytes neutrophiles polymorphonucléaires (Masson *et al.*, 1969 ; Konttinen et Reitamo, 1970), mais il semblerait que 6 à 10 % des neutrophiles circulants ne soient pas marqués à la lactoferrine, suggérant l'existence de différentes populations de neutrophiles (Esaguy *et al.*, 1989). La lactoferrine de ces leucocytes est associée majoritairement aux granules secondaires spécifiques (Baggiolini *et al.*, 1970 ; Cramer *et al.*, 1985), et minoritairement à d'autres granules, probablement des granules tertiaires (Saito *et al.*, 1993). L'expression de la lactoferrine dans les cellules neutrophiles est également affectée lors de leucémies caractérisées par l'absence de granules secondaires, due à des défauts de maturation des cellules myéloïdes (Miyachi *et al.*, 1983 ; Panella *et al.*, 1991). De plus la localisation subcellulaire de la lactoferrine dans le médian- et trans-Golgi, ainsi que dans le réticulum endoplasmique, montre que la lactoferrine subit une maturation en empruntant la voie de sécrétion (Miyachi et Watanabe, 1987 ; Olsson *et al.*, 1988).

La lactoferrine, synthétisée par les neutrophiles et stockée dans leurs granules spécifiques, est actuellement couramment utilisée comme marqueur de dégranulation des neutrophiles lors de processus inflammatoires (Nuijens *et al.*, 1992 ; Martins *et al.*, 1995 ; Rebelo *et al.*, 1995 ; Arao *et al.*, 1999).

II- BIOSYNTHÈSE DE LA LACTOFERRINE

L'analyse de la région promotrice du gène de la lactoferrine, ainsi que l'étude de sa régulation dans différents tissus biologiques, a été menée de façons parallèle et comparative pour les lactoferrines murine et humaine.

1- Gène de la lactoferrine

Le clonage de l'ADN complémentaire de la lactoferrine murine (Pentecost et Teng, 1987) a permis la localisation chromosomique du gène de la lactoferrine sur le chromosome 9 murin (Teng *et al.*, 1987) et le chromosome analogue 3 humain (McCombs *et al.*, 1988).

1.1- Le gène de la lactoferrine murine

La lactoferrine murine est codée par un gène unique organisé en 17 exons, de tailles comprises entre 48 et 190 pb, entrecoupés de 16 introns mesurant de 0,2 à 4,3 kb (Teng *et al.*, 1987). L'organisation exons-introns du gène de la lactoferrine est très similaire à celle des gènes codant pour la sérotransferrine et l'ovotransferrine (Cunningham *et al.*, 1992), suggérant que les gènes codant pour les protéines de la famille des transferrines proviennent de la duplication d'un gène ancestral commun (Bowman *et al.*, 1988 ; Shirsat *et al.*, 1992).

L'analyse de la région 5' 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: une boîte TATA imparfaite (ATAAA), une séquence CAAT, et des séquences riches en GC homologues aux séquences consensus SP1 (Shirsat *et al.*, 1992). Cette région promotrice contient des éléments de réponse aux oestrogènes, aux acides rétinoïques et aux agents mitogènes. Un module composite de réponse aux oestrogènes (mERM) a, en effet, été identifié en position -350 à -328. Il est constitué d'une séquence imparfaite ERE ("Estrogen Response Element") chevauchant une séquence similaire à l'élément COUP ("Chicken Ovalbumin Upstream Element") qui répond au facteur de transcription COUP-TF (Liu et Teng, 1992). Ce module COUP/ERE contient également deux éléments de réponse aux acides rétinoïques RARE ("Retinoic Acid Response Element") (Lee *et al.*, 1995). Un deuxième module composite MRU ("Mitogen Response Unit") a ensuite été localisé de -75 à -40 en

amont du site d'initiation de la transcription, constitué d'une séquence EGFRE ("EGF Response Element") de réponse à l'EGF/TGF α ("Epidermal Growth Factor / Transforming Growth Factor"), ainsi que d'un élément CRE ("Cyclic-AMP Response Element") (Shi et Teng, 1994, 1996) (figure1, page 11).

1.2- Le gène de la lactoferrine humaine

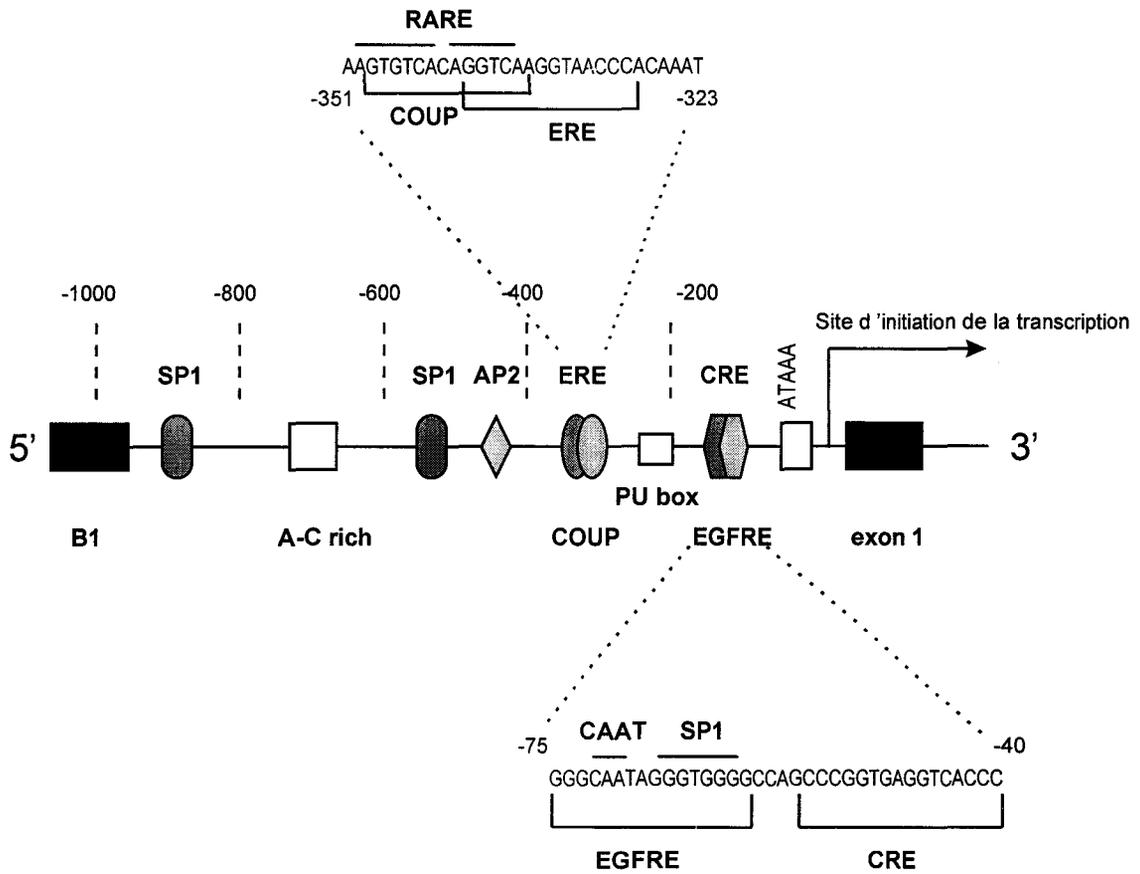
Le gène de la lactoferrine humaine a été localisé sur le chromosome 3 (p21.31-p21.32) (McCombs *et al.*, 1988 ; Kim *et al.*, 1998). Son organisation génomique est semblable à celui de la lactoferrine murine: 17 exons de 48 à 210 pb, entrecoupés de 16 introns de 0,8 à 3,3 kb (Kim *et al.*, 1998). Les gènes des lactoferrines humaine et murine présentent de fortes homologies: 49 % pour la région 5' flanquante du gène, et 70 % pour la région promotrice de -363 à +1 (Teng *et al.*, 1992).

Dans cette région promotrice, cinq éléments sont conservés par comparaison avec la lactoferrine murine: la boîte TATA imparfaite, la séquence CAAT, une séquence SP1 riche en GC, la boîte PU (site de fixation de Pu.1/Sp.1), et le module COUP/ERE situé de -362 à -328 (Teng *et al.*, 1992). Les modules COUP/ERE des gènes des deux lactoferrines étant très conservés, on peut s'attendre à la présence des éléments RARE dans le gène humain. La région promotrice du gène de la lactoferrine humaine ne contient pas de module MRU de réponse aux mitogènes, mais possède un module composite supplémentaire localisé de -396 à -376, et constitué des séquences consensus de reconnaissance des facteurs de transcription COUP, ELP ("Embryonic Long terminal repeat-binding Protein"), et HLH ("Helix Loop Helix") (Yang et Teng, 1994) (figure 2, page 12).

2- Régulation de l'expression du gène de la lactoferrine

De nombreuses études portant sur la distribution cellulaire et tissulaire de la lactoferrine ont montré que la lactoferrine est exprimée dans de nombreux tissus, notamment dans la moelle osseuse, la glande mammaire et l'utérus. Par ailleurs, l'expression de ce gène est régulée différemment selon le type cellulaire et le stade de différenciation.

Module de réponse aux oestrogènes



Module de réponse aux agents mitogènes

Figure 1: Représentation schématique des éléments régulateurs putatifs de la région 5' flanquante du gène de la lactoferrine murine (d'après Teng, 1995).

Module de réponse aux oestrogènes

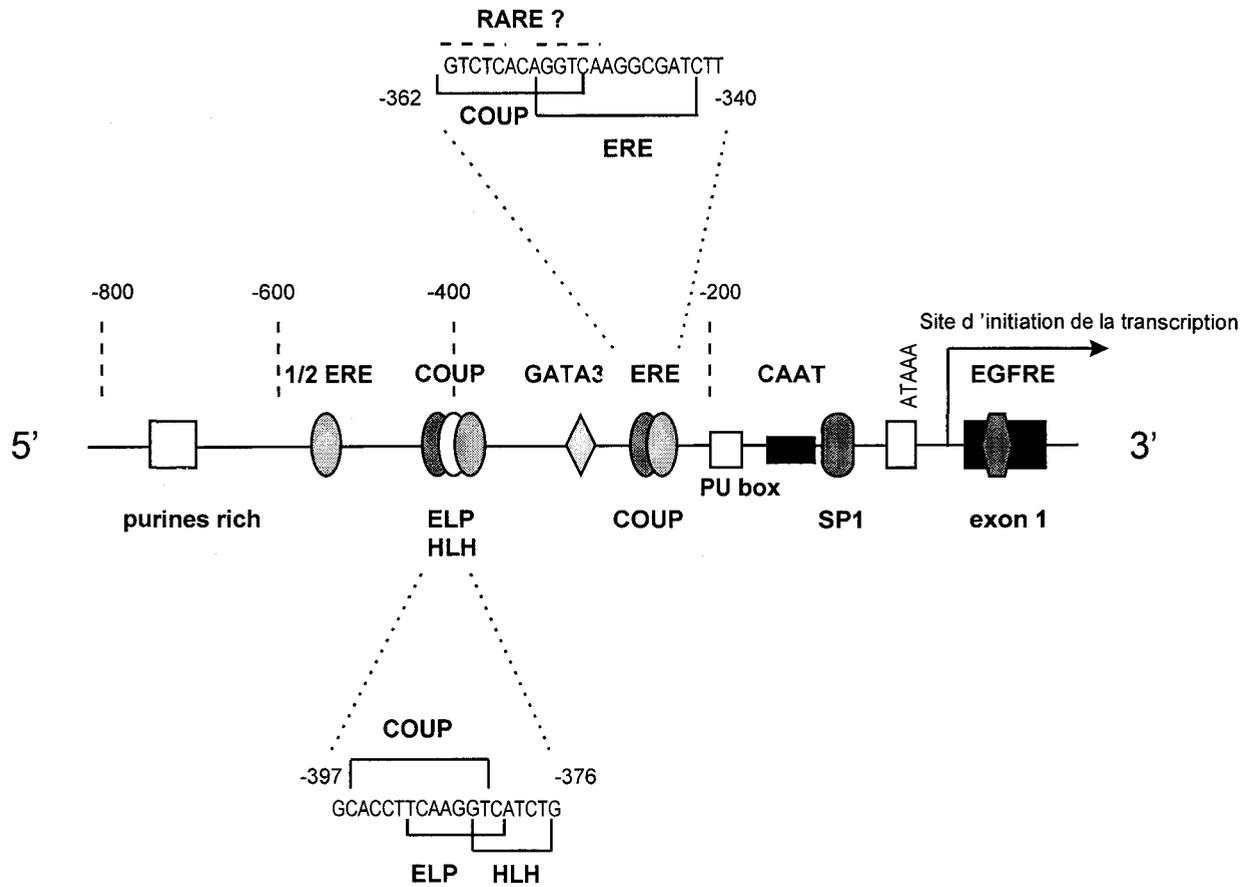


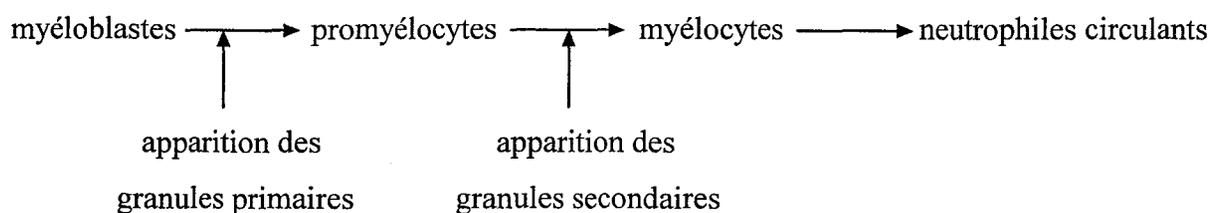
Figure 2 : Représentation schématique des éléments régulateurs putatifs de la région 5' flanquante du gène de la lactoferrine humaine.

2.1- La régulation au cours de la différenciation

L'expression du gène de la lactoferrine est modulée au cours de la différenciation des muqueuses et des cellules myéloïdes chez l'embryon, au cours de la myélopoïèse chez l'adulte, ou encore lors du processus de modifications morphologiques des cellules épithéliales.

2.1.1- La myélopoïèse

La localisation de la lactoferrine dans des lignées leucémiques humaines (Rado *et al.*, 1987 ; Johnston *et al.*, 1992a), ou dans les cellules myéloïdes d'individus sains ou atteints de leucémies touchant les différents stades de différenciation des granulocytes (Rado *et al.*, 1984 ; Cramer *et al.*, 1985 ; Hirata *et al.*, 1993), a montré que la lactoferrine est synthétisée au cours des étapes tardives de la maturation des cellules myéloïdes. Les ARNm et la protéine de la lactoferrine sont en effet absents des myéloblastes et promyélocytes, mais présents en grande quantité dans les myélocytes et les neutrophiles circulants.



La synthèse des ARNm de la lactoferrine débute donc à la transition promyélocyte-myélocyte, et coïncide avec le développement des granules secondaires (Bainton *et al.*, 1971). L'apparition des transcrits est accompagnée presque simultanément de la production de la lactoferrine qui s'accumule dans ces cellules au cours de leur différenciation jusqu'au début du stade ultime de maturation (Rado *et al.*, 1984). La corrélation des taux de transcrits et de protéines de la lactoferrine dans les différentes maladies touchant les cellules myéloïdes suggère une régulation transcriptionnelle de l'expression du gène de la lactoferrine (Lomax *et al.*, 1989 ; Johnston *et al.*, 1992a, b).

Le processus de maturation myélocytaire peut être régulé par les acides rétinoïques, qui sont notamment capables d'induire la différenciation des cellules promyélocytaires HL-60 en granulocytes (Breitman *et al.*, 1980, 1981). Hirata et coll. (1993) ont montré que la lignée

humaine promyélocytaire NB4 ne produit de la lactoferrine qu'après traitement à l'acide rétinoïque. Les acides rétinoïques et leurs récepteurs apparaissent donc comme régulateurs potentiels de la synthèse de la lactoferrine dans les cellules myéloïdes. Cette réponse aux acides rétinoïques pourrait s'expliquer par la présence d'un élément RARE fonctionnel dans la région 5' flanquante du gène de la lactoferrine (Lee *et al.*, 1995).

Un élément régulateur négatif a également été identifié dans la région promotrice du gène de la lactoferrine humaine, cet élément est reconnu par le facteur de transcription CDP/cut ("CCAAT displacement protein") (Khanna-Gupta *et al.*, 1997). Ce facteur régule aussi l'expression du gène de la protéine gp91-phox ("phagocyte-specific cytochrome heavy chain gene") qui est exclusivement produite dans les cellules myéloïdes différenciées (Orkin, 1989). Le rôle de ce facteur dans l'expression séquentielle des gènes de la gp91-phox et de la lactoferrine au cours de la maturation des neutrophiles reste à élucider (Khanna-Gupta *et al.*, 1997).

2.1.2- L'embryogenèse

La localisation spatio-temporelle de la lactoferrine durant l'embryogenèse a été réalisée par hybridation *in situ* et immunohistochimie chez l'embryon murin (Ward *et al.*, 1999). La lactoferrine est, dans un premier temps, exprimée au cours de la phase de préimplantation, c'est-à-dire depuis l'embryon constitué de 2 à 4 cellules jusqu'au stade de blastocyte. On ne retrouve ensuite la présence de lactoferrine que dans la deuxième moitié de la gestation (jour 11) dans les cellules myéloïdes lors de leur maturation, dans le foie foetal puis dans la rate et la moelle osseuse. La lactoferrine est également exprimée dans les épithéliums des systèmes respiratoire et digestif en développement. Le rôle de la lactoferrine dans l'embryogenèse est donc restreint au stade de préimplantation et au développement des systèmes de défense de l'organisme, principalement dans la différenciation des muqueuses et des cellules myéloïdes (Ward *et al.*, 1999).

Par ailleurs, l'expression de la lactoferrine dans les premiers stades de développement semble être régulée par les acides rétinoïques et les oestrogènes. En effet, le traitement de cellules souches embryonnaires murines, n'exprimant pas de lactoferrine, par des acides rétinoïques ou des oestrogènes, induit la synthèse d'un taux élevé de lactoferrine (Geng *et al.*, 1998).

2.1.3- Les modifications morphologiques

Close et coll. (1997) ont montré que les interactions entre les cellules et la matrice extracellulaire régulent l'expression du gène de la lactoferrine dans les cellules de lignées épithéliales mammaires de souris. En effet, lors de l'adhésion de ces cellules à un substrat ou lors de contacts intercellulaires, la production de lactoferrine est suspendue. Par contre, des changements de morphologie cellulaire, qui se manifestent par l'arrondissement des cellules, sont suffisants pour rétablir l'expression de la lactoferrine dans les cellules épithéliales mammaires murines (Close *et al.*, 1997).

La culture de cellules isolées de glandes mammaires bovines sur différents substrats a confirmé le fait que la nature de la matrice extracellulaire intervient dans la régulation de la morphologie cellulaire et de l'expression du gène de la lactoferrine (Talhouck *et al.*, 1998).

2.2- La régulation hormonale

La lactoferrine, constituant majeur des milieux de sécrétions, est synthétisée par les cellules épithéliales de la glande mammaire et de l'utérus. Ces deux organes sont sous contrôle hormonal, et la régulation différente du gène de la lactoferrine y est tissu-spécifique.

2.2.1- La glande mammaire

Le profil d'expression de la lactoferrine au cours de la lactation (Hirai *et al.*, 1990 ; Levay et Viljoen, 1995) est le même que celui de l'activité de la prolactine, et suit le profil inverse des taux de progestérones et d'oestrogènes circulants, suggérant une intervention de la prolactine et des oestrogènes, qui sont connus pour réguler les processus de reproduction et de lactation.

La régulation du gène de la lactoferrine dans les cellules mammaires est encore mal connue, cependant la prolactine est capable d'augmenter la synthèse de la lactoferrine dans des explants de glandes mammaires de souris en gestation (Green et Pastewka, 1978). Par contre, l'intervention des oestrogènes est controversée: d'une part, l'expression de la lactoferrine n'est pas affectée par les oestrogènes (Teng *et al.*, 1989), d'autre part, une étude systématique de

tissus mammaires humains a montré la présence de lactoferrine dans les tissus normaux et dans certaines formes de cancer, notamment dans les carcinomes oestrogéno-indépendants, suggérant l'existence d'une corrélation inversement proportionnelle entre le niveau d'expression de la lactoferrine et la présence de récepteurs aux oestrogènes (Campbell *et al.*, 1992).

2.2.2- L'utérus

Il est maintenant clairement établi que l'expression du gène de la lactoferrine dans l'utérus est sensible aux oestrogènes et à l'EGF (Teng, 1999 pour revue générale). La synthèse et la sécrétion de la lactoferrine dans l'utérus murin sont régulées par les oestrogènes de façon dépendante du temps et de la dose (Pentecost et Teng, 1987 ; Teng *et al.*, 1989). De plus, les taux d'ARNm et de protéines de la lactoferrine dans l'endomètre sont corrélés à la concentration plasmatique d'oestrogènes qui varie au cours du cycle menstruel (Newbold *et al.*, 1992 ; Walmer *et al.*, 1992). Cette influence des hormones oestrogéniques sur l'expression de la lactoferrine est également retrouvée dans l'endomètre utérin humain (Teng *et al.*, 1992).

Dans la région 5' flanquante du gène murin, la présence d'un module composite de réponse aux oestrogènes, mERM, constitué d'un élément ERE qui chevauche un élément COUP (Liu et Teng, 1991, 1992), aboutit à une compétition entre le récepteur aux oestrogènes et le facteur de transcription COUP-TF pour la fixation à leur séquence spécifique (Liu et Teng, 1992). De plus le facteur de transcription COUP-TF est capable de réprimer de manière compétitive la réponse aux oestrogènes (Liu *et al.*, 1993). L'expression de la lactoferrine murine est donc modulée par l'association de deux membres de la superfamille des récepteurs aux hormones stéroïdiennes et thyroïdiennes. Le mécanisme d'action des oestrogènes sur l'expression du gène de la lactoferrine humaine est différent et reste encore mal connu. Malgré la présence du module mERM, le facteur COUP-TF ne se fixe pas à l'élément COUP, qui diffère d'un seul nucléotide de celui du gène murin, et n'intervient donc pas dans la réponse aux oestrogènes (Teng *et al.*, 1992 ; Yang et Teng, 1994). Par ailleurs Yang et coll. (1996) ont mis en évidence la possible participation d'un récepteur nucléaire orphelin hERR1 ("Estrogen-Related Receptor") dans la stimulation du gène de la lactoferrine par les oestrogènes, via une interaction entre le récepteur aux oestrogènes et hERR1.

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 MRU qui répond à une stimulation par l'EGF (Shi et Teng, 1994). La distribution spatiale des éléments EGF-RE et CRE de ce module est essentielle à la réponse à l'EGF (Shi et Teng, 1996). CRE peut être un élément crucial pour le maintien d'une expression basale de la lactoferrine dans les surfaces sécrétrices (Teng, 1995 pour revue). De plus la séquence CAAT/SP1 présente dans l'élément EGF-RE semble être reconnue par un autre facteur de transcription modulant l'activité promotrice du gène de la lactoferrine, qui est IKLF ou "human Kruppel-like factor" 5 (Shi *et al.*, 1999).

2.3- La régulation transcriptionnelle

Une nouvelle forme d'ARNm de la lactoferrine humaine a été récemment décrite et appelée Δ Lf ARNm (Siebert et Huang, 1997). Le Δ Lf ARNm est le produit d'un épissage alternatif du gène de la lactoferrine, et ne diffère de l'ARNm de la lactoferrine que par son extrémité 5' terminale. On note l'absence d'une séquence peptide signal et la présence d'une séquence similaire à une séquence d'adressage nucléaire. Ces divergences suggèrent un trafic intracellulaire différent pour les produits de ces ARNm. Par ailleurs, les profils d'expression de ces deux ARNm ne sont pas identiques. Le Δ Lf ARNm est présent dans les tissus sains synthétisant le transcrit de la lactoferrine de sécrétion, mais il est absent des cellules des lignées cancéreuses correspondantes qui synthétisent de la lactoferrine de sécrétion. La delta lactoferrine, produit du Δ Lf ARNm, pourrait alors jouer un rôle important dans le processus de croissance cellulaire normale (Siebert et Huang, 1997).

III- STRUCTURE DE LA LACTOFERRINE

La lactoferrine est constituée d'une seule chaîne polypeptidique organisée en deux lobes qui possèdent chacun un site de fixation du fer. La lactoferrine est une glycoprotéine de masse moléculaire voisine de 80 kDa, principalement présente dans le lait sous forme apo, c'est-à-dire non saturée en fer. Toutes les études réalisées sur la lactoferrine humaine ont utilisé la lactoferrine isolée du lait. Cependant la lactoferrine leucocytaire, qui est identique à la lactoferrine du lait, du point de vue séquence peptidique, masse moléculaire, point isoélectrique et stabilité du complexe protéine-fer (Moguilevsky *et al.*, 1985), semble différer au niveau de la structure de ses glycannes (Derisbourg *et al.*, 1990).

1- Structure de la partie protéique

1.1- La séquence primaire

La séquence en acides aminés de la lactoferrine humaine a été déterminée directement par séquençage peptidique de la lactoferrine isolée du lait de femme (Metz-Boutigue *et al.*, 1984), ou par déduction après séquençage de l'ADN complémentaire correspondant (Powell et Ogden, 1990 ; Rey *et al.*, 1990). La lactoferrine humaine est constituée de 692 acides aminés et possède une masse peptidique d'environ 76 kDa (Rey *et al.*, 1990). Les moitiés N- et C-terminales, qui constituent les deux lobes de la lactoferrine, présentent 37 % d'homologies (Metz-Boutigue *et al.*, 1984).

Via leurs ADN complémentaires, les lactoferrines d'origine murine (Pentecost et Teng, 1987), bovine (Mead et Tweedie, 1990 ; Goodman et Schanbacher, 1991 ; Pierce *et al.*, 1991), et porcine (Alexander *et al.*, 1992 ; Lydon *et al.*, 1992) ont également été séquencées, et présentent respectivement 70 %, 69 %, et 70,7 % d'homologies avec la lactoferrine humaine.

1.2- La structure tridimensionnelle

La cristallisation de la lactoferrine humaine saturée en fer et son analyse par diffraction aux rayons X aux résolutions de 3,2 et 2,8 Å (Anderson *et al.*, 1987, 1989) ont montré que la lactoferrine est organisée en deux lobes N- (résidus 1-332) et C-terminaux (résidus 344-692). Ces deux lobes sont connectés par une courte hélice α , et peuvent être dissociés par digestion enzymatique. Dans le cas d'une digestion trypsique, les fragments Nt (30 kDa) et Ct (50 kDa) peuvent se réassocier pour former un complexe de 80 kDa qui possède les mêmes comportements chromatographique et spectroscopique que la lactoferrine native, suggérant des interactions non covalentes et réversibles entre les deux lobes (Legrand *et al.*, 1986). Chaque lobe est organisé en deux domaines d'environ 160 acides aminés: N1 (résidus 1-91 et 253-320) et N2 (résidus 92-252) pour le lobe Nt, et C1 (résidus 345-433 et 596-663) et C2 (résidus 434-595) pour le lobe Ct. Ces domaines présentent une structure en alternance de feuillets β et d'hélices α (Anderson *et al.*, 1987, 1989) (figure 3, page 20).

La lactoferrine est bien connue pour fixer avec une forte affinité deux ions ferriques, simultanément avec deux ions carbonates (Aisen et Listowsky, 1980). Cette forte affinité pour le fer serait due à la stabilité du complexe lactoferrine-fer, et au fait que la lactoferrine ne libère son fer qu'à des pH très acides (Mazurier et Spik, 1980). Le métal est fixé à l'interface des domaines N1 et N2 dans le lobe Nt, et les domaines C1 et C2 dans le lobe Ct. Le fer interagit avec les chaînes radicales de deux Tyr, une His, et un Asp. La fixation d'une molécule de fer ferrique se fait en coopération avec une molécule de bicarbonate CO_3^{2-} , qui est logée dans une poche chargée positivement formée par une Arg, une Thr et le Nt d'une hélice α (Anderson *et al.*, 1987, 1989 ; Baker *et al.*, 1987, 1994 ; Haridas *et al.*, 1995) (figure 4, page 21). Grâce à ses interactions avec la chaîne peptidique, le fer réalise un pontage entre les domaines et stabilise la molécule qui devient très résistante à la dénaturation et à la protéolyse (Mazurier *et al.*, 1983 ; Baker *et al.*, 1987 ; Legrand *et al.*, 1988). Par ailleurs, le mécanisme de fixation et les cinétiques de relargage du fer par la lactoferrine ont été récemment décrits par Pakdaman et coll. (1998). Ces auteurs démontrent que les différences de constantes de dissociation des transferrines pour le fer ne sont pas dues au processus de capture du métal, qui est identique pour toutes les transferrines, mais au mécanisme de libération du fer. Ce mécanisme nécessite une répulsion des deux domaines concernés, répulsion qui est affectée par la nature des acides aminés présents à la surface interdomaine.

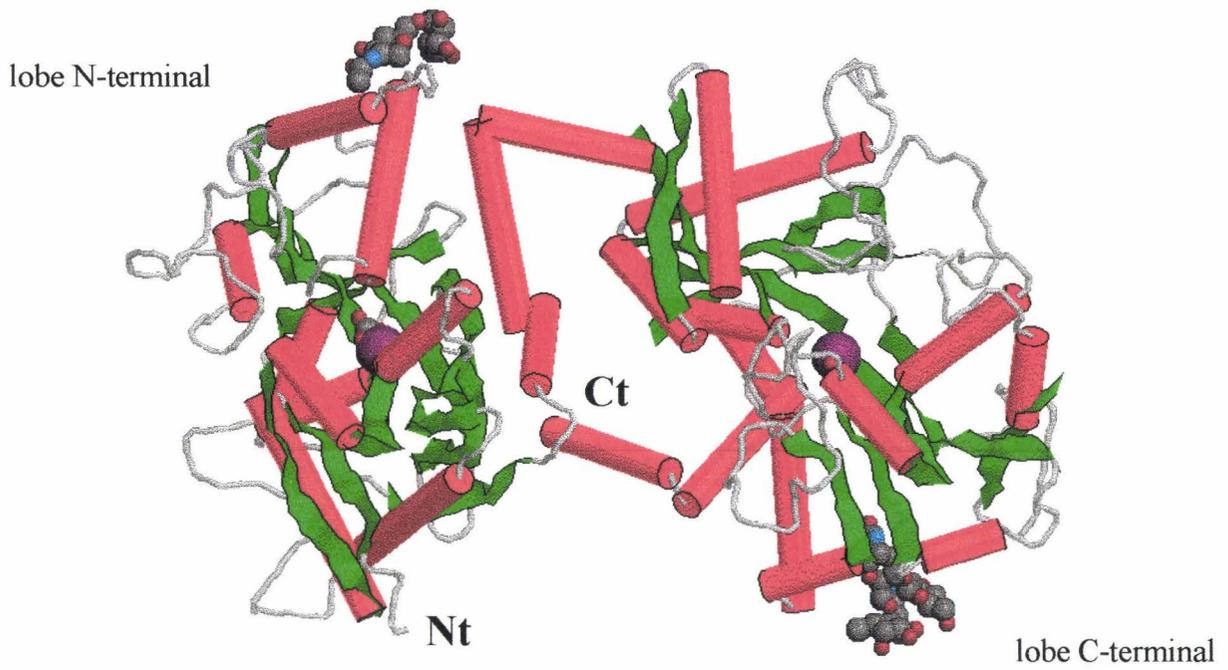


Figure 3: Structure tridimensionnelle de la lactoferrine humaine, représentation des atomes de fer (en violet) et des chaînes glycaniques (en gris).

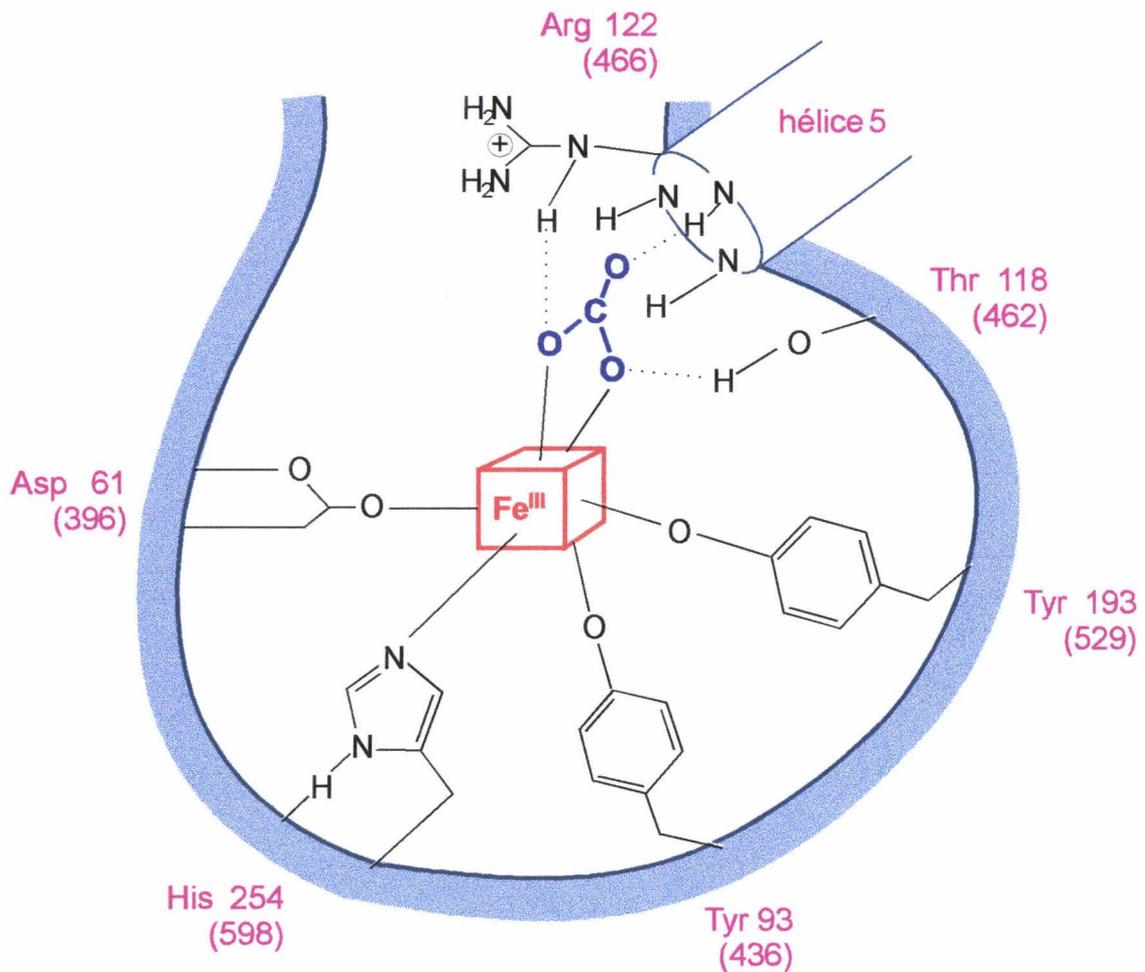


Figure 4: Représentation schématique du site de fixation du fer de la lactoferrine humaine dans le lobe Nt (les résidus équivalents du lobe Ct sont indiqués entre parenthèses) (d'après Anderson *et al.*, 1987, 1989 ; Baker *et al.*, 1994).

Ainsi l'absence de Lys, dans le cas des lactoferrines, défavorise la libération du fer, et augmente l'affinité apparente pour le métal.

L'apolactoferrine humaine a également été cristallisée et résolue de 2,8 Å, puis affinée à 2,0 Å (Anderson *et al.*, 1990 ; Jameson *et al.*, 1998). Dans la structure tridimensionnelle de l'apolactoferrine, le site de fixation du fer du lobe Nt est largement ouvert, alors que celui du lobe Ct reste fermé. La fixation du fer dans le lobe Nt est accompagné par une rotation de 54° du domaine N2, ce qui permet d'isoler le fer du milieu extérieur.

La détermination récente de la structure tridimensionnelle de la lactoferrine bovine à une résolution de 2,8 Å (Moore *et al.*, 1997) a permis de révéler que, malgré des séquences primaires assez différentes (69 % d'homologies) (Pierce *et al.*, 1991), les conformations des lactoferrines humaine et bovine sont similaires. Il subsiste cependant des différences, notamment au niveau de l'orientation relative des quatre domaines. Les lobes Nt et Ct de la lactoferrine bovine sont en effet plus fermés de respectivement 5,3° et 3,7° que ceux de la lactoferrine humaine. Les sites de fixation du fer sont identiques, bien qu'un acide aminé spécifique près du site soit substitué (Moore *et al.*, 1997 ; Baker *et al.*, 1998).

2- Structure des glycanes

De nombreuses études sur la structure des glycanes des transferrines ont mis en évidence 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 primaire des glycanes, entre les différentes espèces (Spik *et al.*, 1988).

La lactoferrine isolée du lait humain possède trois sites potentiels de N-glycosylation, de séquence Asn-X-Ser / Thr. La lactoferrine existe sous trois formes: monoglycosylée (5 % de la protéine), diglycosylée (9 %) et triglycosylée (85 %). Les glycanes sont branchés sur les résidus Asn en position 479 pour la forme monoglycosylée, 138, 479 et 624 pour la forme triglycosylée, et 138 et 479 pour la forme majoritaire diglycosylée (Van Berkel *et al.*, 1996). Ces deux glycanes majoritaires sont localisés dans les domaines N2 et C2 (figure 3, page 20), et sont de types N-acétyllactosaminiques biantennés, sialylés et fucosylés. Il existe une importante microhétérogénéité liée au nombre variable d'acides sialiques, à la présence ou non de fucose, et enfin à la polyantennarisation (Spik *et al.*, 1982, 1988). Le rôle des glycanes reste une énigme, mais il semblerait qu'ils interviennent dans la protection de la

protéine contre des agents de dégradation protéolytique (Spik, 1988 ; Van Berkel *et al.*, 1995 ; Baker *et al.*, 1998).

La structure primaire des glycannes de la lactoferrine bovine a également été déterminée et a révélé une plus grande diversité par rapport à la lactoferrine humaine (Coddeville *et al.*, 1992). Les sites d'attachement des N-glycannes sur la lactoferrine varient selon les espèces. Sur les cinq sites potentiels de la lactoferrine bovine, seuls trois sont glycosylés dans le lobe Ct (Asn³⁶⁸, Asn⁴⁷⁶, et Asn⁵⁴⁵) (Moore *et al.*, 1997). Deux glycannes sont de type N-acétyllactosaminique comme ceux de la lactoferrine humaine, et le troisième est de type oligomannosidique (Spik *et al.*, 1988).

IV- SITES DE FIXATION DE LA LACTOFERRINE À LA SURFACE DES CELLULES DE MAMMIFÈRES

La lactoferrine interagit avec des molécules de surface présentes sur de nombreuses cellules de mammifères, ainsi que sur des micro-organismes tels que les virus ou les bactéries. Les bactéries reconnaissent en effet la lactoferrine via leurs lipopolysaccharides (Ellison et Giehl, 1991 ; Appelmelk *et al.*, 1994), ou encore via des récepteurs bactériens qui sont spécifiques de la protéine et de l'espèce (Gray-Owen et Schryvers, 1996 pour revue). La lactoferrine est également capable de se fixer à un grand nombre de cellules de mammifères. L'interaction prédominante entre la lactoferrine et les différentes cellules fait intervenir un site de basse affinité constitué de molécules sulfatées appartenant à la famille des protéoglycannes. Un site de haute affinité a également été décrit à la surface des hépatocytes, des lymphocytes activés, et des cellules épithéliales de la glande mammaire. Il existe en fait différents récepteurs de la lactoferrine dont les propriétés physico-chimiques et les paramètres de fixation varient selon le type cellulaire.

Dans ce chapitre, nous nous intéresserons plus particulièrement aux protéoglycannes et aux récepteurs spécifiques de la lactoferrine identifiés et caractérisés à la surface des cellules de mammifères.

1- Récepteurs et devenir du complexe lactoferrine-récepteur

1.1- Le LRP ("Low density lipoprotein Receptor-related Protein")

Le LRP, présent sur de nombreuses cellules dont les hépatocytes et les cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique, a été identifié comme étant le récepteur spécifique de la lactoferrine à la surface de ces deux types cellulaires.

1.1.1 Les hépatocytes

Le foie est un organe essentiel à la régulation du taux de lactoferrine dans la circulation sanguine. En effet, après injection, la lactoferrine radiomarquée est rapidement capturée par le foie où elle est dégradée, alors que son fer persiste quelques semaines dans le foie, avant d'être

transféré dans la moelle osseuse et incorporé dans les érythrocytes (Bennett et Kokocinski, 1979). Cette accumulation de lactoferrine dans le foie est également observée chez le lapin (Karle *et al.*, 1979) et chez la souris (Imber et Pizzo, 1983). La nature des cellules du foie responsables de la capture de la lactoferrine est très controversée. Selon les techniques utilisées, la lactoferrine est retrouvée dans les cellules sinusoidales et dans les cellules de Kupffer (Courtoy *et al.*, 1984) ou dans les cellules parenchymateuses (Debanne *et al.*, 1985 ; Ziere *et al.*, 1992). Plus récemment, Peen et coll. (1998) ont montré qu'à la fois les hépatocytes et les cellules non-parenchymateuses, telles que les cellules endothéliales et les cellules de Kupffer, sont impliquées dans la clairance de la lactoferrine plasmatique, la spécificité du mécanisme variant selon le type cellulaire.

Le marquage de la lactoferrine a montré que sa fixation à la surface des cellules parenchymateuses ($K_d = 10 \mu\text{M}$, $n = 20 \times 10^6$ sites/cellule) est suivie de son internalisation dans la voie lysosomale (Ziere *et al.*, 1992). Sur ces cellules, la lactoferrine inhibe la capture des lipoprotéines portant de l'apolipoprotéine E, telles que les βVLDL ("Very Low Density Lipoprotein") et les chylomicrons résiduels, par le récepteur dit "remnant" dont la nature était mal connue (Huettinger *et al.*, 1988, 1992 ; Van Dijk *et al.*, 1991, 1992). Ce récepteur "remnant" a ensuite été suggéré puis identifié comme étant le LRP. En effet, le LRP est constitué de deux sous-unités, une sous-unité transmembranaire de 85 kDa et une sous-unité extracellulaire de 515 kDa qui fixe de nombreux ligands dont les principaux sont l'apoE ("apolipoprotein E") et l' α -2-macroglobuline (Brown *et al.*, 1991 pour revue). Le LRP interagit également avec la lactoferrine (Willnow *et al.*, 1992) et la RAP ("Receptor Associated Protein"). La RAP est une protéine de 39 kDa résidant dans le réticulum endoplasmique et fonctionnant comme une protéine chaperonne pour la mise en conformation et la sécrétion du LRP (Bu *et al.*, 1995 ; Bu et Rennke, 1996 ; Willnow *et al.*, 1996). De part sa fixation à plusieurs régions du LRP, RAP empêche la reconnaissance des différents ligands de ce récepteur (Krieger et Herz, 1994).

L'inhibition par la lactoferrine de l'internalisation des lipoprotéines portant de l'apoE, mais pas de l' α -2-macroglobuline (Huettinger *et al.*, 1988 ; Van Dijk *et al.*, 1991), introduit la notion de sites d'interaction distincts présents à la surface du LRP. En effet des études de fixation ont mis en évidence un site de reconnaissance commun à la lactoferrine et à l'apoE, alors que la lactoferrine et l' α -2-macroglobuline sont reconnues par des sites différents (Willnow *et al.*, 1992). Par ailleurs, l'inhibition compétitive, et non allostérique, de la fixation de la lactoferrine par RAP suggère que ces deux protéines, lactoferrine et RAP, interagissent

avec le même site du LRP (Vash *et al.*, 1998). Le LRP posséderait donc deux sites d'interaction à sa surface: un site reconnaissant la lactoferrine, l'apoE et la RAP, et un second site reconnaissant l' α -2-macroglobuline.

1.1.2- Les cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique

L'accumulation de la lactoferrine dans le cerveau lors de maladies neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson (Leveugle *et al.*, 1994, 1996 ; Fillebeen *et al.*, 1999c) pose le problème de l'origine de cette lactoferrine. Afin de répondre à cette question, Fillebeen *et coll.* (1999b) se sont intéressés au passage de la lactoferrine à travers la barrière hémato-encéphalique en utilisant un modèle *in vitro* de co-culture de cellules endothéliales de capillaires cérébraux et d'astrocytes. Les cellules endothéliales bovines possèdent des sites de fixation de haute ($K_d = 37,5$ nM, $n = 90000$ sites/cellule) et de basse affinité ($K_d = 2$ μ M, $n = 900000$ sites/cellules) pour la lactoferrine bovine, et internalisent le complexe lactoferrine-fer qui ne subit aucune dégradation. Les cellules endothéliales non différenciées ne possèdent que les sites de basse affinité, qui sont probablement des protéoglycannes, et n'internalisent pas la lactoferrine, suggérant qu'un récepteur spécifique est nécessaire au passage de la lactoferrine de la surface apicale à la surface abluminale. L'inhibition du transport de la lactoferrine par la protéine RAP a permis d'émettre l'hypothèse que le récepteur responsable de la transcytose de la lactoferrine serait le LRP (Fillebeen *et al.*, 1999b).

Par ailleurs, en conditions inflammatoires reproduites expérimentalement par traitement au TNF α ("Tumor Necrosis Factor"), le transport de la lactoferrine à travers la barrière hémato-encéphalique est fortement augmentée. Cette augmentation est transitoire et ne semble pas être due à une régulation de la densité du récepteur de la lactoferrine à la surface des cellules endothéliales (Fillebeen *et al.*, 1999a).

1.1.3- Le site d'interaction de la lactoferrine avec le LRP

Sur les cellules hépatiques, la lactoferrine est connue pour inhiber par compétition la capture des lipoprotéines portant des apoE. Par analogie avec la séquence de reconnaissance de l'apoE pour le LRP (Arg-X-X-Arg-Lys-Arg), la séquence Arg²⁵-Arg³¹ présente dans le

domaine N1 de la lactoferrine était suspectée (Huettinger *et al.*, 1992). La modification chimique des charges positives de la molécule par le 1,2-cyclohexanedione a confirmé l'implication de cette séquence riche en Arg et Lys dans l'interaction de la lactoferrine avec le LRP (Huettinger *et al.*, 1992 ; Ziere *et al.*, 1992). D'après la structure tridimensionnelle de la lactoferrine, les quatre Arg de l'extrémité N-terminale Arg²-Arg⁵ semblent également intervenir (Huettinger *et al.*, 1992). Cependant les Arg en position 2-5 seraient impliquées dans une association massive de faible affinité, probablement avec des protéoglycannes sulfatés, alors que la séquence 25-31 pourrait permettre une fixation de haute affinité et bloquer la fixation des chylomicrons résiduels au LRP (Ziere *et al.*, 1993) (figure 5B, page 28).

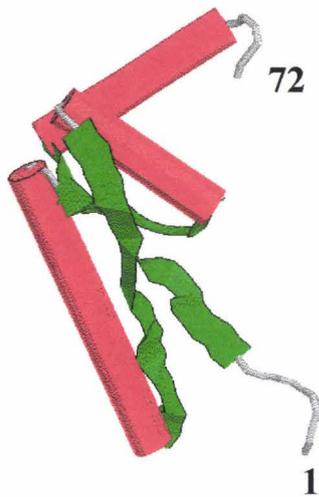
De plus, la délétion des chaînes glycaniques ou la compétition avec des sucres analogues ont montré que les glycanes de la lactoferrine ne sont pas impliqués dans la reconnaissance des cellules hépatiques (Huettinger *et al.*, 1992 ; Ziere *et al.*, 1992).

1.2- Le RHL-1 ("Rat Hepatic Lectine-1"), sous-unité majeure du récepteur des asialoglycoprotéines

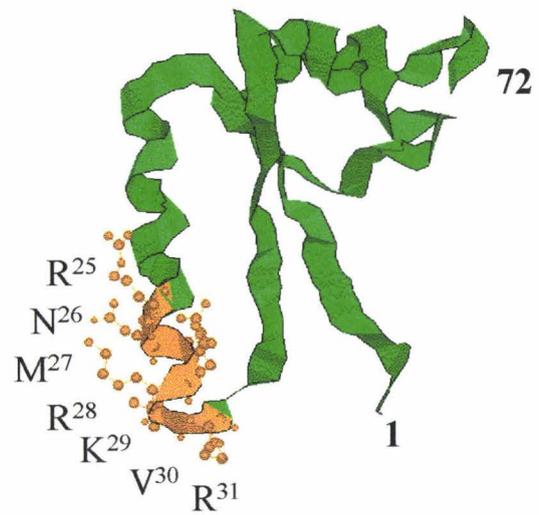
1.2.1- Les hépatocytes

Les hépatocytes isolés de rat possèdent deux sites de fixation de la lactoferrine bovine: un site de haute affinité ($K_d = 20 \text{ nM}$, $n = 1 \times 10^6$ sites/cellule) dépendant du calcium, et un site de basse affinité ($K_d = 1 \text{ } \mu\text{M}$, $n = 10 \times 10^6$ sites/cellule) indépendant du calcium (McAbee et Esbensen, 1991). Par chromatographie d'affinité, Hu et coll. (1993) ont montré que les sites de basse affinité pourraient être des protéoglycannes de type héparane sulfate.

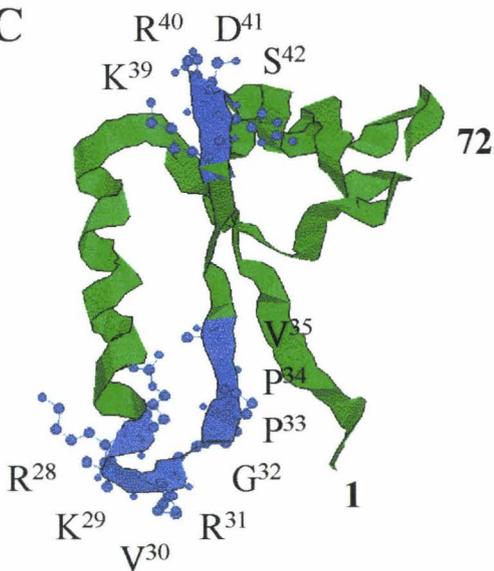
La fixation de la lactoferrine bovine aux hépatocytes n'est pas modulée par son taux de saturation en fer (McAbee et Esbensen, 1991), et présente une affinité plus élevée que celle de la lactoferrine humaine ($10 \text{ } \mu\text{M}$) (Ziere *et al.*, 1992). De plus, et contrairement à la lactoferrine humaine, la modification chimique des résidus Arg et Lys par le 1,2-cyclohexanedione n'affecte pas sa fixation à la surface des cellules (McAbee *et al.*, 1993). Ces résultats suggèrent que la lactoferrine bovine n'interagit pas avec le LRP, récepteur hépatique de la lactoferrine humaine. Cependant, le site de haute affinité dépendant du calcium a été caractérisé grâce à différentes techniques. Par pontage avec un réactif bifonctionnel ou par

A

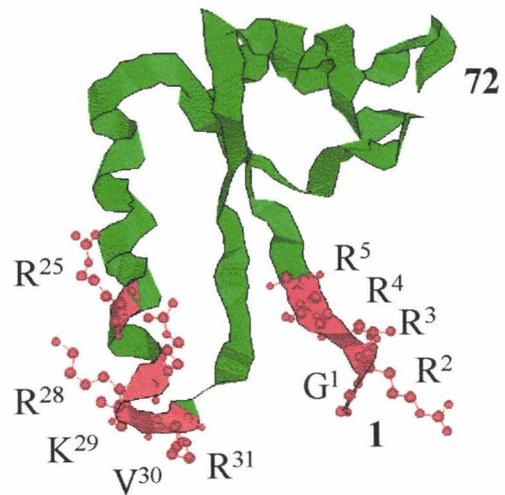
Structure conformationnelle de la région N-terminale (1-72) de la lactoferrine humaine

B

Site d'interaction de la lactoferrine avec le LRP

C

Site d'interaction de la lactoferrine avec le récepteur lymphocytaire et plaquettaire

D

Site d'interaction de la lactoferrine avec les protéoglycannes

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

chromatographie d'extraits membranaires hépatiques sur colonne de lactoferrine-agarose, un polypeptide de 45 kDa a été isolé. L'utilisation d'un anticorps anti-p45 bloquant l'endocytose de la lactoferrine a confirmé que la protéine p45 fonctionne comme le récepteur de la lactoferrine bovine (Bennatt et McAbee, 1997). Par homologies de séquences et par utilisation d'anticorps spécifiques, cette protéine de 45 kDa a finalement été identifiée comme étant le RHL-1, sous-unité majeure du récepteur des asialoglycoprotéines (Bennatt *et al.*, 1997).

Après fixation de la lactoferrine bovine aux sites de haute affinité des hépatocytes, 90 % du ligand sont internalisés par la voie d'endocytose faisant intervenir les puits recouverts de clathrine (McAbee et Esbensen, 1991 ; McAbee *et al.*, 1993). L'internalisation du complexe récepteur-lactoferrine est suivie du recyclage des sites de fixation et de 70 % de la lactoferrine sous forme intacte. Le reste des molécules endocytées est dégradé et relargué sous forme de peptides, alors que le fer est conservé par les cellules (McAbee *et al.*, 1993 ; McAbee, 1995). Les hépatocytes prennent donc le fer par un mécanisme d'endocytose du complexe lactoferrine-fer, et non par un transport membranaire actif (McAbee, 1995). Par ailleurs, l'environnement en fer des cellules affecte l'endocytose de la lactoferrine. En effet un excès de fer dans le milieu de culture augmente la fixation et l'internalisation de la lactoferrine, en régulant le nombre de récepteurs spécifiques à la surface des cellules (McAbee et Ling, 1997).

Les hépatocytes possèdent donc deux types de récepteurs de la lactoferrine qui présentent une spécificité d'espèce. En effet, la lactoferrine humaine est reconnue par le LRP, alors que la lactoferrine bovine interagit avec le RHL-1, tous deux présents à la surface des hépatocytes de rat. Cependant la réalisation de la majorité des études en système hétérologue pose le problème de la réalité physiologique de ces interactions.

1.2.2- Le site d'interaction de la lactoferrine avec le RHL-1

Après hydrolyse trypsique de la lactoferrine bovine, seul le fragment Ct isolé est fixé et internalisé par le RHL-1 (Sitaram et McAbee, 1997). De plus, des variants recombinants de la lactoferrine, tronqués de leur partie Nt, entrent encore en compétition avec la lactoferrine native pour la fixation sur les sites dépendants du calcium à la surface des hépatocytes (Sitaram *et al.*, 1998). Ces deux approches différentes montrent que la fixation de la lactoferrine au RHL-1 se fait via des déterminants non glycaniques contenus dans le lobe Ct. En effet l'action d'exoglycosidases, qui enlèvent les résidus galactosyl terminaux des chaînes glucidiques, n'empêche pas la fixation de la lactoferrine, montrant que l'interaction entre la

lactoferrine et le RHL-1 n'est pas due à l'activité lectinique du récepteur (Bennatt *et al.*, 1997). Cependant l'interaction de la lactoferrine avec les hépatocytes est inhibée en présence de lactose. Cette inhibition serait due à un masquage du site de fixation de la lactoferrine, et suggère que la lactoferrine pourrait se fixer sur le RHL-1 près du site de reconnaissance des glycanes (Bennatt *et al.*, 1997).

1.3- Le récepteur lymphocytaire

Un récepteur de haute affinité et spécifique de la lactoferrine a été caractérisé à la surface des lymphocytes humains activés par la PHA (phytohémagglutinine). Ce récepteur a également été retrouvé à la surface des cellules de la lignée humaine lymphoblastique T Jurkat, des plaquettes non activées, des cellules de la glande mammaire, et enfin de certaines cellules du système nerveux central.

1.3.1- Les lymphocytes

L'étude de l'interaction de la lactoferrine humaine avec les cellules lymphocytaires a débuté dès 1976 avec Van Snick et Masson qui ont suggéré une fixation de la lactoferrine sur les lymphocytes péritonéaux de souris. Cette étude a ensuite continué sur les cellules sanguines humaines, mais les avis étaient divergents. En effet la lactoferrine interagissait surtout avec une sous-population enrichie en lymphocytes B (Bennett et Davis, 1981 ; Butler *et al.*, 1990), alors que Birgens et coll. (1984) constataient une fixation équivalente de la lactoferrine sur les lymphocytes T et B. Enfin la lactoferrine a été détectée à la surface d'une population de lymphocytes T isolés du thymus (Gnezditskaya *et al.*, 1985).

Il s'avère finalement que l'expression du récepteur de la lactoferrine varie selon l'état de maturation ou d'activation des cellules. La fixation de la lactoferrine à la surface des cellules B augmente en effet au cours de leur maturation: les cellules à un stade précoce de maturation, telles que les cellules pré-B et les pré-plasmocytes, ne fixent pas la lactoferrine en surface, alors que les lymphocytes B immatures, représentant un stade plus avancé de maturation, expriment le récepteur de la lactoferrine (Butler *et al.*, 1990). Par ailleurs, les lymphocytes sanguins périphériques ne présentent pas de récepteur de la lactoferrine à leur surface, contrairement aux lymphocytes sanguins activés *in vitro* par différents agents mitogènes, ou

aux lymphocytes isolés des tissus déciduals qui sont activés *in vivo*. Les sous-populations exprimant le récepteur ont été identifiées et sont les suivantes: les cellules T $\alpha\beta$, $\gamma\delta$, CD4⁺, CD8⁺, les cellules NK CD56⁺, et les cellules B (Hammarström *et al.*, 1995 ; Mincheva-Nilsson *et al.*, 1997 ; Damiens *et al.*, 1998b).

Le récepteur de la lactoferrine n'apparaît donc sur les lymphocytes T sanguins qu'après activation par la PHA (Mazurier *et al.*, 1989). L'expression du récepteur est optimale après 2-3 jours de stimulation mitogène (Kd = 83 nM, n = 2x10⁶ sites/cellule), et n'est pas due à une redistribution cellulaire mais à une synthèse du récepteur. La purification du récepteur à la surface de ces cellules par chromatographie d'affinité sur colonne d'anticorps anti-lactoferrine a mis en évidence deux protéines de 100 et 110 kDa (Mazurier *et al.*, 1989). Sur la lignée humaine lymphoblastique T Jurkat, utilisée comme modèle expérimental dans notre laboratoire, le récepteur lymphocytaire a également été caractérisé (tableau 1, page 32) et purifié sous deux formes: une protéine de 95 kDa isolée du milieu de culture, et une protéine de 105 kDa présente à la surface des cellules (Bi *et al.*, 1994). La forme soluble semble être une forme tronquée des domaines cytoplasmique et transmembranaire du récepteur de 105 kDa. La production d'un anticorps monoclonal spécifique (DP5B3G10) a permis l'immunolocalisation du récepteur par des techniques de microscopie électronique et de fluorescence. La présence de récepteurs à la fois à la surface et dans des vésicules intracellulaires suggère une internalisation du complexe lactoferrine-récepteur (Bi *et al.*, 1994).

L'internalisation de la lactoferrine dans les cellules lymphocytaires a été montrée pour la première fois par Sato et coll. (1990) dans les lymphocytes B. Par microscopie électronique utilisant un anticorps dirigé contre la lactoferrine, celle-ci a été détectée à la surface et à l'intérieure des cellules, suggérant la capture et le relargage de la lactoferrine. Dans le modèle expérimental Jurkat, le devenir de la lactoferrine a été suivi par microscopies confocale et électronique (Bi *et al.*, 1996). La lactoferrine a ainsi été observée dans les vésicules intracellulaires spécifiques que sont les endosomes. Par ailleurs, la colchicine, inhibiteur de l'endocytose indépendante de la clathrine, n'affecte pas l'internalisation de la lactoferrine. Ces résultats montrent que l'endocytose de la lactoferrine dépend d'un récepteur spécifique via des puits recouverts de clathrine. Après endocytose, les cellules Jurkat relarguent dans le milieu de culture 60 à 70 % de la lactoferrine sous forme intacte, et 30 à 40 % de la lactoferrine sous forme dégradée par la voie lysosomale (Bi *et al.*, 1996).

référence	type cellulaire	Kd (nM)	sites / cellule
Van Snick et Masson, 1976	lymphocytes circulants	1050	$6,94 \times 10^6$
Birgens <i>et al.</i> , 1984	lymphocytes circulants	43	$1,2 \times 10^6$
Mazurier <i>et al.</i> , 1989	lymphocytes T activés par PHA	83	2×10^6
Rochard <i>et al.</i> , 1989	lymphocytes T activés par PHA	46	$0,3 \times 10^6$
Bi <i>et al.</i> , 1996	lignée lymphoblastique T Jurkat	40	$0,3 \times 10^6$
Legrand <i>et al.</i> , 1997	lignée lymphoblastique T Jurkat	70	$0,1 \times 10^6$

Tableau 1 : Paramètres de fixation de la lactoferrine humaine sur les lymphocytes humains.

1.3.2- Les plaquettes

Les premières études concernant l'interaction de la lactoferrine humaine avec les différentes populations de cellules sanguines humaines ont utilisé de la lactoferrine marquée à l' ^{125}I , et n'ont pas mis en évidence d'interaction avec les plaquettes (Bennett et Davis, 1981 ; Birgens *et al.*, 1984). Cependant, une fixation spécifique de la lactoferrine a plus tard été observée à la surface des plaquettes non activées par marquage de la lactoferrine sur ses glycanes par le FITC ("fluorescein 5'-isothiocyanate") (Leveugle *et al.*, 1993), mais le type de récepteur est controversé. En effet les paramètres de fixation déterminés par la méthode de Scatchard diffèrent selon le type de marquage de la lactoferrine. Nillesse et coll. (1994) ont détecté un seul type de site de fixation ($K_d = 242 \text{ nM}$, $n = 125000 \text{ sites/cellule}$) avec de la ^{125}I -lactoferrine, alors qu'un site de haute affinité ($K_d = 73,5 \text{ pM}$, $n = 40 \text{ sites/cellule}$) et un site de basse affinité ($K_d = 813 \text{ pM}$, $n = 135 \text{ sites/cellule}$) ont été déterminés par Maneva et coll. (1993) qui ont marqué la lactoferrine au ^{59}Fe . Ces derniers auteurs ont également montré que la lactoferrine bovine entre en compétition avec l'humaine mais avec des affinités plus faibles ($K_d = 1,53 \text{ nM}$ pour $n = 150 \text{ sites/cellule}$, et $K_d = 12,5 \text{ nM}$ pour $n = 360 \text{ sites/cellule}$).

Le récepteur putatif de la lactoferrine à la surface des plaquettes non activées a été purifié sur anticorps anti-lactoferrine immobilisés et caractérisé. Les propriétés physico-chimiques et immunologiques de ce récepteur sont très proches du récepteur isolé des lymphocytes T activés par la PHA. Ces mêmes auteurs (Leveugle *et al.*, 1993) ont également décrit une conséquence biologique à la fixation de la lactoferrine au récepteur plaquettaire, puisqu'elle inhibe l'agrégation plaquettaire induite par l'ADP.

Le récepteur de la lactoferrine a également été recherché sur des précurseurs hématopoïétiques, et notamment sur la lignée mégacaryoblastique Dami. Cette lignée cellulaire est une population hétérogène constituée de cellules de petite taille qui sont peu différenciées, et de cellules de grosse taille qui sont des cellules blastes polyploïdes à un stade de différenciation plus avancé (Greenberg *et al.*, 1988). Le marquage de la lactoferrine sur ses glycanes par la fluorescéine et sa détection au cytofluorimètre ont montré que seule la population de cellules de grosse taille exprime le récepteur à leur surface. Le récepteur apparaît en fait au cours de la différenciation des cellules de petite taille en cellules polyploïdes (Nillesse *et al.*, 1994).

1.3.3- Les cellules épithéliales de la glande mammaire

La présence du récepteur de la lactoferrine a été étudiée sur les cellules épithéliales mammaires à différents stades de différenciation: des cellules non malignes immortalisées (HBL-100), les cellules HBL-100 transformées en cellules tumorales par l'oncogène *hst*, et des cellules de carcinomes mammaires (T47D, MCF-7, MDA-MB-231) (Rochard *et al.*, 1992). La technique de cytofluorimétrie en flux avec la lactoferrine marquée à la fluoescéïne a mis en évidence des sites de fixation à la surface de toutes les lignées cellulaires mammaires étudiées. Ces observations ont été confirmées par le calcul des paramètres de fixation de la lactoferrine marquée à l'¹²⁵I grâce à la méthode de Scatchard (tableau 2, page 35). En effet les lignées normales (HBL-100) et cancéreuses (T47D, MCF-7) présentent un site dont l'affinité est du même ordre de grandeur que celle du récepteur lymphocytaire, alors que les cellules MDA-MB-231 possèdent un site de plus basse affinité. De plus, sur toutes les cellules mammaires sauf les MDA-MB-231, le site de haute affinité est reconnu par l'anticorps dirigé contre le récepteur lymphocytaire de la lactoferrine. Ces résultats suggèrent donc que les cellules épithéliales mammaires, quel que soit leur état de cancérisation, expriment un récepteur de la lactoferrine possédant des déterminants antigéniques communs avec le récepteur lymphocytaire. Contrairement à la transferrine sérique, la lactoferrine ne peut donc pas être considérée comme un marqueur de progression tumorale (Rochard *et al.*, 1992).

Plus récemment, lors de l'étude de l'effet de la lactoferrine sur la prolifération des cellules cancéreuses mammaires, Damiens et coll. (1998a) ont décrit deux types de sites de fixation à la surface des cellules MDA-MB-231: un site de basse affinité ($K_d = 680 \text{ nM}$, $n = 3,9 \times 10^6$ sites/cellule) et un site de haute affinité ($K_d = 45 \text{ nM}$, $n = 2,9 \times 10^5$ sites/cellule). Par comparaison avec les cellules hématopoïétiques, ces cellules présentent à leur surface un taux élevé de protéoglycannes, notamment des héparanes et chondroïtines sulfates (Chandrasekaran et Davidson, 1979). Ces nombreuses molécules sulfatées peuvent masquer le site de haute affinité, ce qui expliquerait l'absence de récepteur de la lactoferrine à la surface des cellules MDA-MB-231, observée par Rochard et coll. (1992).

lignée cellulaire	stade de cancérisation	Kd (nM)	sites / cellule
HBL-100	non malignes	216	$1,4 \times 10^6$
T47D	carcinomes	120	$1,2 \times 10^6$
MCF-7	carcinomes	190	$1,28 \times 10^6$
MDA-MB-231	carcinomes	960	$4,8 \times 10^6$

Tableau 2 : Paramètres de fixation de la lactoferrine humaine sur les cellules épithéliales mammaires à différents stades de cancérisation (Rochard *et al.*, 1992).

1.3.4- Les cellules du système nerveux central

Une des caractéristiques de la maladie de Parkinson est la dégradation des neurones dopaminergiques, associée à un stress oxydatif. La formation des radicaux libres impliqués est en effet catalysée par le fer qui s'accumule dans le mésencéphale lors de cette maladie neurodégénérative. Afin de déterminer s'il y a corrélation entre l'augmentation du fer et la présence de récepteur de la lactoferrine, l'expression de ce récepteur a été étudiée sur des coupes de tissus cérébraux par des techniques d'immunohistochimie avec l'anticorps polyclonal dirigé contre le récepteur lymphocytaire de la lactoferrine (Faucheux *et al.*, 1995). Dans le mésencéphale humain, le récepteur de la lactoferrine a été localisé sur les neurones, les microvaisseaux cérébraux, et parfois les cellules gliales. Dans le cas de patients atteints de la maladie de Parkinson, le marquage est augmenté, surtout dans les régions où la perte des neurones dopaminergiques est sévère et où le fer s'accumule. La corrélation entre l'expression du récepteur de la lactoferrine et l'accumulation du fer suggère l'implication de ce récepteur dans la capture neuronale du métal, ainsi que sa contribution à la dégénérescence des neurones dopaminergiques (Faucheux *et al.*, 1995).

1.3.5- Le site d'interaction de la lactoferrine avec le récepteur lymphocytaire

Le fragment Nt (résidus 4-281) de la lactoferrine se fixe au récepteur lymphocytaire avec la même affinité que la lactoferrine native (44 et 46 nM, respectivement), alors que le fragment Ct (282-703) et le domaine N2 (91-247) ne sont pas reconnus par les lymphocytes stimulés par la phytohématagglutinine (Rochard *et al.*, 1989). Ces résultats suggèrent une localisation du site de reconnaissance du récepteur dans le lobe Nt, et plus précisément dans le domaine N1 (4-90, 258-281). Les modifications de la lactoferrine par marquage au FITC sur la Lys²⁶⁴ ou au SASD ("sulfosuccinimidyl 2-(p-azidosalicylamido)ethyl-1,3'-dithiopropionate") sur la Lys⁷⁴ inhibent la fixation, ce qui confirme l'implication du domaine N1 (Legrand *et al.*, 1991, 1992). La modélisation moléculaire de ces lactoferrines modifiées montre que les marqueurs FITC et SASD se situent à la surface de la molécule et masquent les résidus 4-6, ainsi que deux boucles accessibles aux solvants: 28-34 et 38-45 (Legrand *et al.*, 1992).

L'appartenance de ces deux boucles au site de fixation du récepteur lymphocytaire a été démontré par les travaux de Leveugle et coll. (1993) réalisés sur les plaquettes. En effet le fragment Nt ainsi que deux peptides synthétiques, la séquence 20-37 et le térapeptide KRDS (Lys³⁹-Arg-Asp-Ser⁴²), induisent le même effet que la lactoferrine native, c'est-à-dire une inhibition de l'agrégation plaquettaire (figure 5C, page 28).

Plus récemment, l'utilisation combinée des méthodes QSAR ("Quantitative Structure Activity Relationship") et CoMFA ("Comparative Molecular Fields Analysis") a montré l'importance de l'établissement de liaisons hydrogène dans l'interaction spécifique lactoferrine-récepteur. Ces méthodes ont permis de définir deux régions intervenant dans la reconnaissance du récepteur. La première, constituée des résidus Arg³, Gln⁷, Asn¹³, Gln²³, Arg²⁴, Gln⁵⁰, et Asn⁵⁵, serait impliquée dans la spécificité d'espèce, alors que la seconde, constituée des acides aminés Pro¹⁴, Phe²⁰, Asp⁴³, Ser⁴⁴, Pro⁴⁵, et Gln⁴⁷, interviendrait dans la force de liaison au récepteur (Elass *et al.*, 1996a, b).

2- Protéoglycannes

Les protéoglycannes, composants de la matrice extracellulaire intervenant dans les interactions cellules-cellules, sont constitués d'un noyau protéique et d'une ou plusieurs chaînes GAG (glycosaminoglycannes) de type héparine, héparane sulfate, chondroïtine sulfate, ou dermatane sulfate. Ces protéoglycannes fixent des molécules biologiquement actives afin de les séquestrer, de les présenter à leur récepteur spécifique, ou encore de moduler leur activité (Jackson *et al.*, 1991 ; Wight *et al.*, 1993 pour revues).

2.1- L'héparine

Une des premières propriétés décrites pour la lactoferrine est sa capacité à fixer des molécules polyanioniques telles que les GAG sulfatés et notamment l'héparine. Cette propriété a d'ailleurs été largement utilisée pour purifier la lactoferrine sur colonne d'héparine-sépharose (Blackberg et Hernell, 1980). Zou et coll. (1992) ont caractérisé cette interaction et montré que la fixation de l'héparine à la lactoferrine peut être inhibée par les héparanes sulfates et chondroïtines sulfates.

L'interaction de la lactoferrine avec l'héparine joue un rôle dans des phénomènes biologiques importants comme le processus de coagulation sanguine. Ce processus fait en effet intervenir la thrombine dont l'activité peut être régulée négativement par le système héparine-antithrombine. En cas d'inflammation, la lactoferrine libérée par les neutrophiles neutralise les GAG impliqués (héparine, héparanes sulfates et dermatanes sulfates) et provoque ainsi l'inhibition des mécanismes anticoagulants (Wu *et al.*, 1995). Un autre effet de l'interaction lactoferrine-héparine est l'inhibition, par compétition, du complexe héparine/RMCP-1 ("Rat Mast Cells Protease-1") qui possède une activité protéase à sérine. La présence de cette chymase RMCP-1 dans les granules secondaires des mastocytes et sa libération lors de l'activation de ces cellules suggèrent que cette enzyme pourrait jouer un rôle dans l'inflammation (Pejler, 1996).

2.2- Les protéoglycannes membranaires

Sur certaines cellules, les sites de basse affinité ont été caractérisés et identifiés aux protéoglycannes. Le traitement des cellules avec des enzymes dégradant les GAG, comme l'héparinase et la chondroïtinase, ou avec le chlorate de sodium, inhibiteur métabolique de la sulfatation des protéoglycannes (Keller *et al.*, 1989), a permis de montrer que la lactoferrine interagit avec des protéoglycannes différents selon le type cellulaire.

Sur les cellules parenchymateuses du foie, la fixation de la lactoferrine est altérée par la chondroïtinase, démontrant l'implication des GAG de type chondroïtine sulfate dans l'interaction de la lactoferrine avec les hépatocytes (Ziere *et al.*, 1993, 1996). Ces auteurs suggèrent également que ces protéoglycannes forment une étape essentielle lors de la capture de molécules par le LRP. En ce qui concerne les lymphocytes, et plus particulièrement les cellules lymphoblastiques T Jurkat, l'action du chlorate diminue le nombre de sites de fixation, suggérant que 80 % des sites présents à la surface cellulaire seraient des sites de basse affinité, probablement constitués de molécules sulfatées (Legrand *et al.*, 1997). Enfin, plus récemment, il a été montré que l'interaction de la lactoferrine avec les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 est inhibée par l'héparinase et le chlorate. Ces différents traitements réduisent en effet la fixation à la fois sur les sites de basse et de haute affinité. Ces résultats suggèrent que la présence de molécules sulfatées, notamment des héparanes sulfates, est nécessaire à l'interaction de la lactoferrine avec son récepteur à la surface de ces cellules mammaires (Damiens *et al.*, 1998a).

2.3- Le site d'interaction de la lactoferrine avec les protéoglycannes

L'étude de la fixation à l'héparine et aux chondroïtines sulfates de peptides synthétiques comprenant les 33 premiers résidus de la lactoferrine humaine démontre l'intervention de deux séquences basiques: Gly¹-Arg-Arg-Arg-Arg-Ser⁶ et Arg²⁸-Lys-Val-Arg³¹. Mann et coll. (1994) suggèrent en effet que ces deux régions, qui sont juxtaposées à la surface de la molécule, agissent en synergie pour former un site fonctionnel de reconnaissance des GAG. La fixation sur ligand immobilisé de lactoferrine humaine modifiée sur les 5 premiers résidus N-terminaux confirme le rôle décisif joué par les Arg en position 2 à 5 dans les interactions lactoferrine-héparine (Van Berkel *et al.*, 1997). Ces résultats sont controversés par Wu et coll. (1995) qui proposent, après analyse de la structure cristallographique de la lactoferrine humaine, un motif structural unique représentant le domaine de fixation des GAG, et constitué de l'Arg⁵ associée à la Lys²⁹ et aux Arg en position 25, 28, et 31 (figure 5D, page 28). Plus récemment, le passage d'un hydrolysate tryptique de lactoferrine bovine sur colonne d'héparine immobilisée a permis d'isoler un peptide identifié par analyse séquentielle au fragment 17-41 Nt de la lactoferrine bovine. La séquence impliquée serait surtout Arg²⁵-Met-Lys-Lys²⁸, avec la contribution de Lys¹⁸-Cys-Arg-Arg²¹ et Arg³⁸-Arg³⁹ (Shimazaki *et al.*, 1998).

Enfin, une étude de fixation de variants de la lactoferrine humaine obtenus par protéolyse tryptique (hLf^{2N}, hLf^{3N}, hLf^{4N}) ou par mutagenèse dirigée (hLf^{5N}) a été réalisée sur la lignée humaine lymphoblastique T Jurkat (Legrand *et al.*, 1997). La délétion séquentielle des Arg terminales modifie progressivement les paramètres de fixation de la lactoferrine: augmentation de l'affinité et diminution du nombre de sites par cellule. De plus la culture des cellules Jurkat en présence de chlorate, qui inhibe la sulfatation, provoque une diminution du nombre de sites de fixation pour la lactoferrine native et hLf^{3N}, mais pas pour hLf^{5N} (tableau 3, page 40). Ces résultats montrent que les Arg²-Arg-Arg⁴, mais pas l'Arg⁵, sont impliquées dans la reconnaissance de molécules sulfatées, probablement des protéoglycannes, mais n'interviennent pas dans l'interaction avec le récepteur lymphocytaire de la lactoferrine humaine, présent à la surface des cellules Jurkat (Legrand *et al.*, 1997). Par ailleurs, la lactoferrine bovine est également capable d'interagir avec des molécules de surface anioniques telles que les protéoglycannes ou les GAG (Ziere *et al.*, 1993 ; Mann *et al.*, 1994; Wu *et al.*, 1995).

variant	résidus délétés	sans chlorate		avec chlorate	
		Kd (nM)	sites / cellule	Kd (nM)	sites / cellule
hLf		69	102 000	62	62 450
hLf ^{2N}	Gly ¹ -Arg ²	65	75 000		
hLf ^{3N}	Gly ¹ -Arg ³	57	35 600	57	21 100
hLf ^{4N}	Gly ¹ -Arg ⁴	41	17 500		
hLf ^{5N}	Gly ¹ -Arg ⁵	12	16 500	28	20 700

Tableau 3 : Fixation de la lactoferrine humaine (hLf) à la surface des cellules Jurkat : constantes de dissociation et nombre de sites par cellule (Legrand *et al.*, 1997).

V- RÔLES BIOLOGIQUES DE LA LACTOFERRINE

La lactoferrine étant une protéine fixant le fer, les premières fonctions biologiques qui lui ont été attribuées sont associées à cette propriété. Le faible degré de saturation de la lactoferrine des fluides biologiques et sa très forte affinité pour le fer permettent d'expliquer l'activité bactériostatique de la lactoferrine, qui entre en compétition avec les sidérophores pour la séquestration du fer nécessaire à la croissance bactérienne. La lactoferrine a également été proposée pour jouer un rôle dans la régulation de la capture du fer par les muqueuses intestinales, et dans la modulation des dommages oxydatifs par inhibition de la formation de radicaux libres.

En dehors de sa capacité à chélater le fer, la lactoferrine est un élément clé des processus inflammatoire et immunitaire. La lactoferrine est en effet impliquée dans l'inflammation, notamment en destabilisant la membrane bactérienne, en modulant l'activation du complément, en favorisant la migration et le recrutement des polymorphonucléaires, en régulant la prolifération et la différenciation des cellules impliquées, et enfin en inhibant la production de cytokines (Lönnerdal et Iyer, 1995 ; Baveye *et al.*, 1999 pour revues générales).

Dans ce chapitre, nous nous intéresserons au rôle de la lactoferrine dans la réponse immunitaire et, plus particulièrement, à son implication dans la modulation de la prolifération et de la maturation des cellules sanguines, dans la régulation de l'activité cytotoxique des cellules NK et monocytes, et enfin dans la production de cytokines par les différentes cellules impliquées dans ce processus.

1- Modulation de la prolifération cellulaire

L'effet de la lactoferrine sur la prolifération cellulaire dépend de l'état de la cellule. Elle présente en effet une activité proliférative sur les cellules saines telles que les lymphocytes, les fibroblastes ou encore certaines cellules épithéliales. Cependant, la lactoferrine exerce une activité anti-proliférative sur les cellules cancéreuses, puisqu'elle est capable de réduire la croissance tumorale.

1.1- L'effet prolifératif de la lactoferrine

Le colostrum humain présente une activité facteur de croissance sur des lignées lymphocytaires B et T humaines ainsi que sur des cellules isolées de cryptes intestinales de rat (Hashizume *et al.*, 1983 ; Nichols *et al.*, 1987). La protéine possédant cette activité a été isolée par ces équipes et identifiée à la lactoferrine par des approches électrophorétiques et immunologiques. L'effet stimulateur de la prolifération par la lactoferrine humaine (concentration variant de 2 à 50 µg/ml) a été mis en évidence *in vitro* sur différentes lignées cellulaires en présence d'un milieu pauvre ou dépourvu en sérum (0 à 1 %). La lactoferrine active ainsi la croissance de cellules lymphocytaires B: O-2, 9P-13-2, SP2/O (Sato *et al.*, 1990). Elle augmente également l'incorporation de thymidine dans l'ADN de cellules macrophagiques murines P388D1 (Oria *et al.*, 1988), de lymphocytes sanguins activés à la PHA (Mazurier *et al.*, 1989), de cellules fibroblastiques embryonnaires murines BALB/c3T3 (Azuma *et al.*, 1989), des cellules de la lignée intestinale de rat IEC-18 (Hagiwara *et al.*, 1995), et enfin de la lignée lymphoblastique T Jurkat (Bi *et al.*, 1997). Par ailleurs, de nombreux auteurs ont démontré que la lactoferrine bovine agissait de la même manière que la lactoferrine humaine sur la prolifération cellulaire (Hashizume *et al.*, 1983 ; Oria *et al.*, 1988 ; Azuma *et al.*, 1989 ; Hagiwara *et al.*, 1995 ; Oguchi *et al.*, 1995).

Le mécanisme d'action de la lactoferrine sur la prolifération cellulaire n'est pas encore élucidé et le rôle du fer reste controversé: selon le type cellulaire, l'activité facteur de croissance de la lactoferrine serait indépendante ou dépendante de son taux de saturation en fer. En effet l'étude de la distribution intracellulaire du fer dans les cellules macrophagiques P388D1 a montré que, malgré sa fixation à la surface des cellules, la lactoferrine est incapable de donner son fer aux cellules (Oria *et al.*, 1988). De plus la lactoferrine sous forme non saturée (apo-lactoferrine) ou saturée en fer (lactoferrine diférique) présente exactement le même effet prolifératif sur les cellules myoblastiques L6 (Byatt *et al.*, 1990), sur les entérocytes isolés de cryptes de rat (Nichols *et al.*, 1990) et sur la lignée intestinale de rat IEC-18 (Hagiwara *et al.*, 1995), suggérant une activité mitogène de la protéine elle-même. Cependant, d'autres études ont suggéré que la lactoferrine pourrait agir par l'intermédiaire de son fer, en apportant aux cellules cet élément indispensable à la croissance cellulaire. En effet, seule la forme saturée en fer de la lactoferrine provoque une augmentation de la synthèse d'ADN dans les cellules fibroblastiques BALBc/3T3, la lignée épithéliale intestinale humaine

CaCo-2 et les cellules lymphoblastiques Jurkat (Azuma *et al.*, 1989 ; Oguchi *et al.*, 1995 ; Bi *et al.*, 1997).

Contrairement à toutes ces observations, la lactoferrine peut également se révéler être un agent anti-prolifératif. En effet, indépendamment de son taux de saturation en fer et de la concentration de sérum, la lactoferrine bovine diminue la croissance des lignées cellulaires épithéliales mammaires bovines MAC-T et MAC-E (Rejman *et al.*, 1992 ; Hurley *et al.*, 1994). Les cellules MAC-T sont capables de se différencier et de sécréter des composants spécifiques du lait. En inhibant la croissance de ces cellules, la lactoferrine permettrait le développement et la différenciation des glandes mammaires.

Cependant toutes ces études ont été réalisées *in vitro*, ce qui pose le problème de la réalité physiologique de l'effet prolifératif de la lactoferrine. En effet, malgré une stimulation de la prolifération d'une lignée cellulaire myoblastique L6 de rat, la lactoferrine n'a aucun effet sur la croissance musculaire de l'animal entier (Byatt *et al.*, 1990).

1.2- L'effet anti-prolifératif de la lactoferrine

L'effet anti-prolifératif de la lactoferrine sur les cellules tumorales est souvent associé *in vivo* à une inhibition de la dissémination métastatique. Ces deux activités différentes sont englobées dans ce qu'on appelle l'effet anti-tumoral de la lactoferrine que nous allons développer dans ce paragraphe.

La première activité anti-tumorale de la lactoferrine humaine a été décrite chez la souris par Bezault et coll. (1994). La lactoferrine inhibe la croissance de tumeurs solides induites par injection de cellules tumorales fibroblastiques NIH3T3 rp1A, et de fibrosarcomes induits par le méthylcholanthrène. Elle réduit également la dissémination métastatique pulmonaire due aux cellules de mélanomes B16-F10 (Bezault *et al.*, 1994). Cette activité anti-proliférative a ensuite été étudiée pour la lactoferrine bovine sur la carcinogenèse de différents organes chez le rat ou la souris. L'effet de la lactoferrine a été analysé sur des tumeurs induites par traitements chimiques ou par injection de cellules tumorales, et sur des métastases expérimentales induites par injection de cellules tumorales métastatiques. La lactoferrine inhibe ainsi le nombre d'adénocarcinomes de côlon induits par l'azoxyméthane (Sekine *et al.*, 1997a, b), et la croissance de tumeurs du côlon et leurs métastases pulmonaires dues à des implants sous-cutanés de cellules intestinales métastatiques Co26Lu (Iigo *et al.*, 1999). La lactoferrine exerce également son activité anti-proliférative sur les tumeurs du poumon et de

l'oesophage de rat atteints de cancer "multi-organes" (Usida *et al.*, 1999), et son activité anti-métastatique sur les métastases du foie et du poumon induites par les cellules de mélanomes B16-BL6 et de lymphomes L5178Y-ML25 (Yoo *et al.*, 1997).

Alors que l'implication du fer dans cet effet anti-prolifératif de la lactoferrine est controversée (Bezault *et al.*, 1994 ; Yoo *et al.*, 1997), le rôle des cellules NK semble faire l'unanimité. En effet, l'élimination de l'activité des cellules NK par prétraitement des animaux avec des anticorps anti-asialo GM1 annule l'activité de la lactoferrine (Bezault *et al.*, 1994). De même la lactoferrine augmente *in vitro* l'activité cytotoxique des cellules NK isolées de la rate (Sekine *et al.*, 1997a) ou du sang (Iigo *et al.*, 1999). La participation des cellules NK à l'effet anti-prolifératif de la lactoferrine a été étudiée plus précisément sur la lignée cancéreuse mammaire MDA-MB-231. Les résultats ont montré que la lactoferrine agit à deux niveaux: elle augmente l'activité cytotoxique des cellules NK vis-à-vis des cellules tumorales, et sensibilise les cellules cancéreuses à la lyse en bloquant leur prolifération (Damiens *et al.*, 1998b, 1999).

2- Modulation de la maturation

Après sa libération par les leucocytes polymorphonucléaires, la lactoferrine sérique peut affecter la maturation des cellules sanguines. Elle régule négativement l'hématopoïèse, et plus particulièrement la granulopoïèse, et intervient dans la réponse immune en accélérant la maturation des cellules B et T immatures ainsi que la synthèse d'anticorps.

2.1- La régulation de l'hématopoïèse

L'hématopoïèse est un processus complexe et dynamique qui est régulé par de nombreuses biomolécules possédant la capacité de stimuler ou d'inhiber la croissance et le développement des cellules progénitrices hématopoïétiques (Broxmeyer et Williams, 1988). Parmi les molécules stimulant *in vitro* la myélopoïèse, c'est à dire la formation des colonies de granulocytes et de monocytes/macrophages, se trouvent les glycoprotéines de la famille des CSF ("Colony-Stimulating Factor"), ainsi que l'Il-1 (interleukine-1) et l'Il-6. De nombreux inhibiteurs ont également été recensés dont trois glycoprotéines fixant le fer: la transferrine, l'AIF ("acidic isoferitin") et enfin la lactoferrine (Broxmeyer *et al.*, 1978, 1983). La

lactoferrine régule négativement la myélopoïèse en inhibant la production de GM-CSF ("Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor") par les monocytes, ou de manière indirecte via des cellules accessoires (figure 6, page 46).

En absence de lymphocytes T, la lactoferrine diminue la production et la sécrétion de GM-CSF par les monocytes/macrophages (Broxmeyer *et al.*, 1978, 1983). Cet effet direct de la lactoferrine pourrait s'expliquer par la présence de récepteurs spécifiques à la surface des cellules de la lignée phagocytaire mononucléaire (Van Snick et Masson, 1976 ; Bennett et Davis, 1981 ; Birgens *et al.*, 1983). L'étude des macrophages péritonéaux de souris a en effet montré que les cellules répondant à la lactoferrine sont des sous-populations macrophagiques fixant spécifiquement la lactoferrine à leur surface (Broxmeyer *et al.*, 1986).

L'effet indirect de la lactoferrine consiste à diminuer la production et la sécrétion par les monocytes/macrophages de monokines qui induisent la production de GM-CSF par des cellules dites "accessoires" telles que les lymphocytes T, les fibroblastes et les cellules endothéliales (Bagby *et al.*, 1981, 1983a, b). Un des facteurs produits par les monocytes et influençant la sécrétion de GM-CSF par les cellules accessoires a été identifié à l'Il-1 (Zucali *et al.*, 1987). Par inhibition de la libération d'Il-1 la lactoferrine supprime indirectement la production de GM-CSF (Zucali *et al.*, 1989), et réduit la survie des cellules souches des granulocytes/macrophages et des érythroïdes en culture (Hangoc *et al.*, 1991).

La régulation de l'expression du GM-CSF par la lactoferrine a été étudiée plus récemment par Penco et coll. (1995). Ces auteurs suggèrent une régulation du gène du GM-CSF au niveau transcriptionnel par la lactoferrine qui agirait alors comme un facteur de transcription.

2.2- La maturation des lymphocytes B et T immatures

L'effet de la lactoferrine sur les lymphocytes T immatures a été étudié sur des cellules isolées du thymus de souris (Zimecki *et al.*, 1991). L'addition de thymocytes CD4⁺CD8⁻ préincubés avec la lactoferrine à une culture de splénocytes augmente la réponse humorale en augmentant le nombre de cellules synthétisant des anticorps. Le même type d'expérience réalisée *in vivo*, par injection intrapéritonéale de lactoferrine ou de thymocytes traités à la lactoferrine, conduit également à une stimulation de la réponse immune humorale. Par ailleurs, après incubation d'une nuit avec 2 ou 10 µg/ml de lactoferrine, la détection d'antigènes de surface par cytométrie en flux montre que les thymocytes CD4⁺CD8⁻ acquièrent

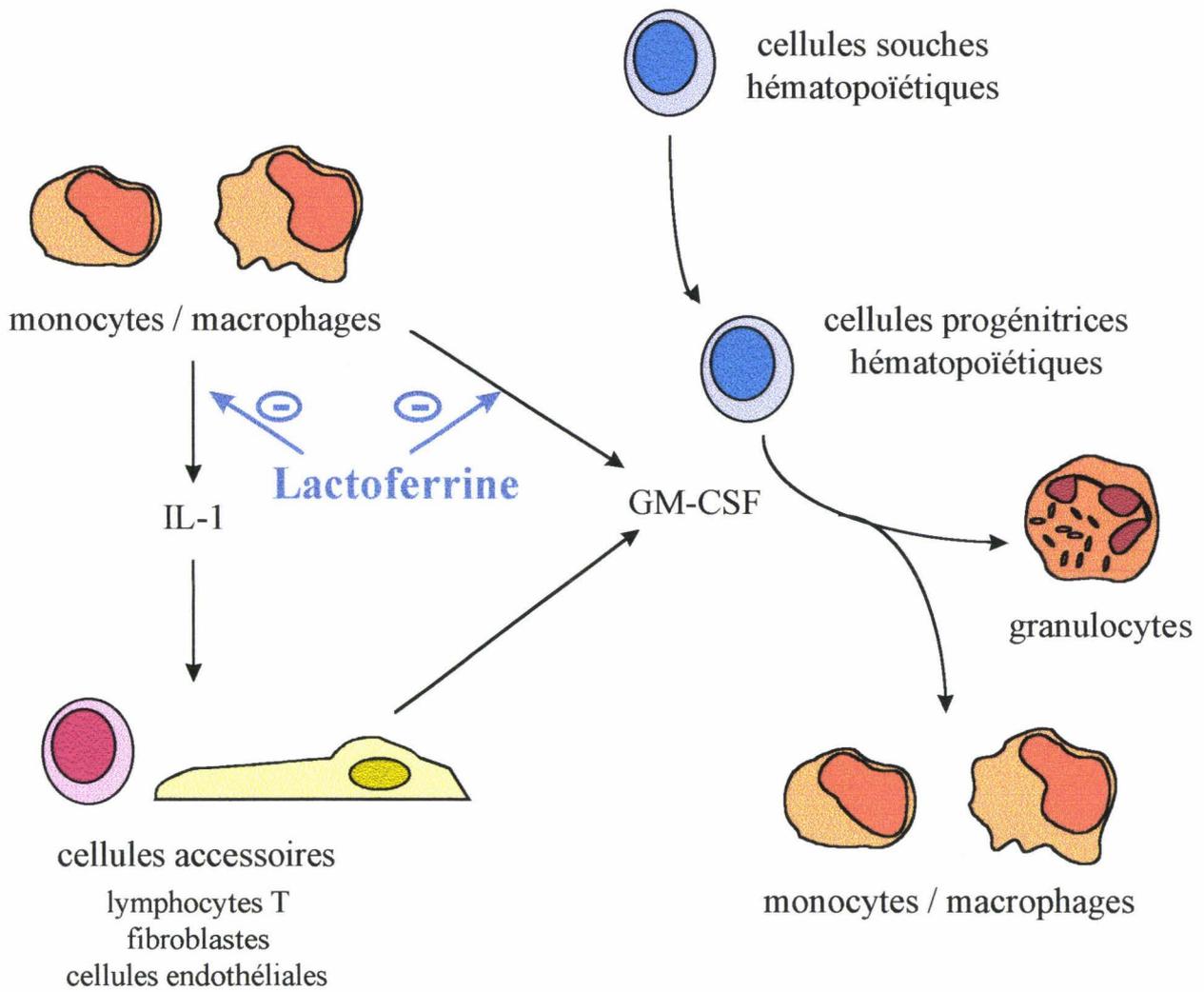


Figure 6: Rôle de la lactoferrine dans la régulation de l'hématopoïèse.

l'antigène CD4 caractéristique des lymphocytes T auxiliaires. Ces résultats suggèrent que la lactoferrine stimule la réponse immune par un mécanisme impliquant la maturation des cellules T (Zimecki *et al.*, 1991).

L'utilisation de la lignée lymphoblastique T Jurkat a ensuite permis une étude plus approfondie de ce processus de différenciation des cellules T immatures (Bi *et al.*, 1997). Alors qu'en milieu appauvri en sérum (1 %) la lactoferrine active la prolifération de ces cellules, en milieu complet contenant 10 % de sérum la lactoferrine présente un effet stimulateur de leur différenciation. Cet effet se traduit par une augmentation du pourcentage de cellules dans la phase G0/G1 du cycle cellulaire, et une diminution du volume cellulaire, de l'incorporation de thymidine tritiée, ainsi que de la densité du marqueur de prolifération CD71. Ces modifications sont également accompagnées de l'apparition de l'antigène de surface CD4. Dans des conditions physiologiques et en présence de lactoferrine, les cellules T immatures entrent donc progressivement en état de quiescence et amorcent leur maturation en cellules T CD4⁺ (Bi *et al.*, 1997).

Par ailleurs, l'effet de la lactoferrine sur les cellules B spléniques a également été étudié sur des cellules isolées de souriceaux (Zimecki *et al.*, 1995). Dans ces conditions expérimentales, la lactoferrine agit comme facteur de maturation des cellules B en induisant des changements phénotypiques et fonctionnels. Après traitement par la lactoferrine, les cellules immatures IgM⁺IgD⁻ acquièrent en effet le marqueur de surface IgD, marqueur caractéristique de leur maturation. En présence de lactoferrine, les cellules B immatures de souris immunodéficientes ou de souriceaux deviennent également fonctionnelles, c'est-à-dire présentatrices d'antigènes (Zimecki *et al.*, 1995).

2.3- La modulation de la synthèse d'anticorps

Chez la souris adulte, la lactoferrine humaine présente un effet suppresseur de la réponse humorale des cellules B spléniques, en diminuant le nombre de cellules synthétisant des anticorps de type IgM (Duncan et McArthur, 1981). Cette diminution est proportionnelle à l'augmentation de la concentration en lactoferrine (10^{-10} à 10^{-5} M). La séparation des cellules spléniques en cellules adhérentes (macrophages) et non-adhérentes (lymphocytes) montre que les cellules affectées par la lactoferrine sont les cellules adhérentes. Ces travaux réalisés *in vitro* suggèrent que la lactoferrine module la réponse humorale par un mécanisme indirect faisant intervenir les macrophages. Le mode d'action de la lactoferrine semblerait identique à

celui conduisant à l'inhibition de la production de GM-CSF: inhibition de la libération par les monocytes d'agents responsables de l'induction de la synthèse d'anticorps par les lymphocytes B (Duncan et McArthur, 1981). Cependant, les mêmes travaux réalisés *in vivo* par Zimecki et coll. (1991) montrent, d'une part, une augmentation de la réponse immune humorale chez les souris et, d'autre part, que cette modulation est due à une maturation des lymphocytes T.

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

Lors du mécanisme de défense de l'organisme, la réponse immunitaire non spécifique fait intervenir des cellules présentant une activité cytolytique vis-à-vis des cellules étrangères. Parmi les cellules sanguines, il existe deux grands types de cellules possédant cette activité et pouvant être affectées par la lactoferrine: les cellules NK et les monocytes.

3.1- Les cellules NK

Les premières études réalisées *in vitro* sur la cytotoxicité des cellules sanguines ont montré que la lactoferrine n'affectait pas l'activité cytotoxique de la population lymphocytaire totale (Nishiya et Horwitz, 1982 ; Horwitz *et al.*, 1984 ; McCormick *et al.*, 1991). Cependant le traitement sélectif des cellules NK et LAK ("Lymphokine-Activated Killer") par la lactoferrine augmente sensiblement leur activité vis-à-vis de cellules cibles tumorales (Shau *et al.*, 1992). Ces résultats ont été obtenus par addition de lactoferrine (0,75 à 750 µg/ml) au début du test de cytotoxicité, lors de la mise en présence des cellules effectrices et des cellules cibles. Damiens et coll. (1998b) ont retrouvé cet effet sur les cellules NK à faible concentration en lactoferrine (10 µg/ml), alors que pour une plus forte concentration (100 µg/ml) l'effet de la lactoferrine est influencé par le phénotype des cellules cibles: augmentation de la cytolysse de lignées cancéreuses épithéliales et diminution de la cytolysse de lignées tumorales hématopoïétiques.

Cette observation pourrait s'expliquer par le fait que la lactoferrine puisse agir sur l'activité des cellules NK à la fois en modulant la cytotoxicité de ces cellules effectrices, et en sensibilisant les cellules cibles à la lyse (Damiens *et al.*, 1998b). En effet, le pré-traitement des cellules NK par la lactoferrine augmente leur activité cytolytique pour de faibles

concentrations en lactoferrine (10-25 µg/ml), et la diminue pour de fortes concentrations (50-100 µg/ml) qui semblent être toxiques pour les cellules. Cet effet direct de la lactoferrine sur les cellules NK pourrait être dû à la présence d'un récepteur spécifique à leur surface (Hammarström *et al.*, 1995). Par ailleurs, le pré-traitement des cellules cibles tumorales par la lactoferrine (25-100 µg/ml) module leur sensibilité à la lyse selon leur phénotype: pas de modification de la susceptibilité à la lyse de cellules hématopoïétiques (Jurkat et K-562), mais augmentation de celle de cellules épithéliales mammaires (MCF-7 et HBL-100) et de côlon (HT-29) (Damiens *et al.*, 1998b). L'étude approfondie du mode d'action de la lactoferrine sur les cellules cibles a été réalisée sur les cellules de carcinome mammaire MDA-MB-231 (Damiens *et al.*, 1999). La lactoferrine induit ainsi un arrêt de croissance de ces cellules en modulant l'expression et l'activité de protéines régulatrices de la transition G1-S du cycle cellulaire.

La modulation de l'activité des cellules NK par la lactoferrine a également été observée *in vivo* chez la souris par différentes équipes. L'inactivation des cellules NK par pré-traitement des animaux avec des anticorps anti-asialo GM1 diminue l'effet anti-tumoral de la lactoferrine envers des tumeurs solides et des métastases expérimentales (Bezault *et al.*, 1994). De plus, un test de cytotoxicité réalisé sur des cellules NK isolées de la rate de souris pré-traitées à la lactoferrine montre une nette inhibition de l'activité cytolytique de ces cellules (Sekine *et al.*, 1997). Ces résultats suggèrent l'implication des cellules NK dans les activités anti-tumorale (Bezault *et al.*, 1994 ; Sekine *et al.*, 1997a) et anti-virale (Shimizu *et al.*, 1996) de la lactoferrine. Par ailleurs, contrairement à l'hypothèse de Damiens et coll. (1998b), Shimizu et coll. (1996) proposent un effet indirect de la lactoferrine sur les cellules NK: la lactoferrine affecterait les lymphocytes T en modulant la production de cytokines responsables de l'activation des cellules NK.

3.2- Les monocytes

Nishiya et Horwitz (1982) ont montré que la lactoferrine peut augmenter sélectivement l'activité cytotoxique des monocytes sanguins séparés par adhésion au plastique, sans stimuler la cytotoxicité des lymphocytes. Cependant la fraction adhérente étant constituée d'une faible proportion de cellules NK (6 %), la délétion de ces cellules contaminantes a permis de vérifier que l'activité cytolytique des monocytes était bien augmentée spécifiquement par la lactoferrine (Horwitz *et al.*, 1984). Le pré-traitement des cellules adhérentes à la lactoferrine

aboutit également à une augmentation de leur cytotoxicité, démontrant ainsi un effet direct de la lactoferrine sur les monocytes (Nishiya et Horwitz, 1982 ; McCormick *et al.*, 1991).

Parallèlement à la stimulation de l'activité cytolytique des cellules monocytaires, la lactoferrine diminue leur activité ADCC ("Antibody Dependent Cell Cytotoxicity") (Nishiya et Horwitz, 1982). Ces effets opposés de la lactoferrine sur les mécanismes de cytotoxicité des monocytes ne sont pas encore expliqués.

4- Mécanisme d'action de la lactoferrine

Les différents effets de la lactoferrine se traduisent par une modulation de la synthèse de protéines, que ce soient des protéines membranaires ou des protéines de sécrétion. La régulation de la transcription des gènes de ces protéines peut se faire directement grâce à une activité facteur de transcription de la lactoferrine, ou via un signal de transduction induit par fixation de la lactoferrine sur son récepteur.

4.1- L'activité facteur de transcription

Parmi les nombreuses molécules qui interagissent avec la lactoferrine se trouvent les acides nucléiques. La lactoferrine se fixe fortement à l'ADN simple ou double brin, qu'il soit en solution ou immobilisé sur matrice solide (Bennett et Davis, 1982 ; Van Berkel *et al.*, 1997 ; Kanyshkhova *et al.*, 1999). Grâce à cette caractéristique, la lactoferrine peut d'ailleurs être isolée de fluides biologiques, tels que le lait, sur colonne d'ADN immobilisé (Hutchens *et al.*, 1989).

Cependant en 1992, Garré et coll. suggèrent que cette interaction entre la lactoferrine et l'ADN peut avoir une importance biologique. Ces auteurs ont en effet observé que la fixation spécifique de la lactoferrine à la surface des cellules humaines leucémiques K562 est suivie de son internalisation et de sa translocation jusqu'au noyau. De plus, la lactoferrine semble se fixer *in vitro* à de l'ADN d'extraits nucléiques de ces cellules (Garré *et al.*, 1992). Cette hypothèse a ensuite été confirmée en 1995 par deux équipes différentes qui suggèrent une activité facteur de transcription de la lactoferrine. Après incubation de la lactoferrine avec des oligonucléotides aléatoires, l'ADN fixé à la lactoferrine est isolé, amplifié plusieurs fois par PCR ("Polymerase Chain Reaction"), cloné et séquencé (He et Furmanski, 1995).

L'alignement de ces séquences montre que la lactoferrine interagit fortement ($K_d = 1,24 \times 10^{-8} \text{ M}$) avec trois séquences consensus: (1) GGCACCTT(G/A)C, (2) TAGA(A/G)GATCAAA, et (3) ACTACAGTCTACA. Pour déterminer la conséquence fonctionnelle de cette fixation de la lactoferrine à l'ADN, les séquences consensus sont placées dans un vecteur contenant un promoteur faible suivi du gène reporteur CAT ("Chloramphenicol Acetyl Transferase"), qui est ensuite transfecté par électroporation dans les cellules K562. Une forte activation transcriptionnelle du gène reporteur est observée pour les séquences (1) et (3) dans un milieu d'incubation contenant de la lactoferrine (He et Furmanski, 1995). Par ailleurs, dans le cadre de l'étude de l'implication de la lactoferrine dans la myélopoïèse, Penco et coll. (1995) ont démontré que la lactoferrine inhibe la sécrétion de GM-CSF par les fibroblastes embryonnaires en régulant directement la transcription du gène. Dans ces cellules, la production d'ARNm du GM-CSF induite par l'IL-1 β est supprimée après transfection d'un vecteur d'expression de la lactoferrine. De plus, des expériences de cotransfection de ce même vecteur et d'un vecteur constitué du promoteur du GM-CSF suivi du gène CAT montrent que la lactoferrine réduit l'activité du promoteur du GM-CSF (Penco *et al.*, 1995). Ces différents travaux suggèrent une nouvelle fonction de la lactoferrine, et apportent un des premiers exemples d'une nouvelle classe de molécules sécrétées, telles que le FGF-2 ("Fibroblast Growth Factor") (Almaric *et al.*, 1994), le VEGF ("Vascular Endothelial Growth Factor") (Li et Keller, 2000), ou encore l'angiogénine (Hu *et al.*, 2000), qui activeraient l'expression de gènes dans des cellules cibles par fixation directe à l'ADN.

Une telle activité ferait appel à un mécanisme particulier, au cours duquel les activateurs de transcription seraient sécrétés par des cellules, capturés par leurs cellules cibles, et transportés intacts jusqu'au noyau où ils stimuleraient l'expression de gènes (Baeuerle, 1995). Dans le cas de la lactoferrine, sa translocation dans le noyau n'a pas réellement été démontrée. Cette étude a été réalisée uniquement dans les cellules K562, où la localisation nucléaire de la lactoferrine a été observée par traitement des cellules à la lactoferrine marquée au ^{14}C , extraction du noyau par fractionnement cellulaire, séparation des protéines nucléaires par SDS-PAGE ("Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis") puis révélation des protéines marquées (Garré *et al.*, 1992).

Cependant cette activité facteur de transcription pourrait s'expliquer par les travaux plus récents de Siebert et Huang (1997) qui ont découvert une nouvelle forme d'ARNm de la lactoferrine humaine appelée ΔLf ARNm. Ce transcrit diffère de celui de la lactoferrine par l'absence d'une séquence peptide signal et la présence d'une séquence d'adressage nucléaire,

suggérant une localisation cytoplasmique et/ou nucléaire de la protéine delta lactoferrine. L'activation directe de la transcription pourrait alors être attribuée à la delta lactoferrine, alors que la lactoferrine de sécrétion serait responsable de la modulation des processus inflammatoire et immunitaire en affectant les différentes cellules impliquées via un signal de transduction.

4.2- L'activation de signaux de transduction

L'induction d'un signal de transduction par la lactoferrine a été décrite pour la première fois par Goretzki et Mueller (1998) lors de l'étude des effets intracellulaires des ligands du LRP. Le traitement par la lactoferrine de lignées cellulaires humaines, les cellules de mélanome M21 et les cellules de carcinome hépatique HepG2, cause une élévation de la concentration intracellulaire en AMPc et une stimulation de la PKA ("AMPc-dependent Protein Kinase") ainsi que d'une activité GTPase. De plus l'addition de la protéine RAP, antagoniste des différents ligands du LRP, annule l'activation de la PKA, démontrant la nécessité d'une interaction lactoferrine-LRP pour déclencher le signal. Ces résultats suggèrent que la fixation de la lactoferrine au LRP induit une voie de transduction dépendante de la PKA via une protéine G hétérotrimérique (Goretzki et Mueller, 1998).

Une étude différente a été menée avec des monocytes péritonéaux murins, pour lesquels la lactoferrine est capable d'inhiber la croissance des parasites *Toxoplasma gondii* intracellulaires (Tanaka *et al.*, 1998). Par immunorévélation des protéines macrophagiques avec un anticorps monoclonal anti-P-Tyr, une protéine de 30 kDa a été détectée après activation des cellules par la lactoferrine. Cette phosphorylation est supprimée par la génistéine, un inhibiteur des protéines tyrosine kinases, qui annule également l'effet anti-prolifératif de la lactoferrine sur les parasites. Ces travaux démontrent que, sur les monocytes, la lactoferrine induit la phosphorylation d'une protéine qui semble associée à l'arrêt de croissance des *Toxoplasma gondii* intracellulaires (Tanaka *et al.*, 1998).

Par ailleurs, le mécanisme moléculaire intracellulaire impliqué dans l'inhibition de la prolifération des cellules de carcinome mammaire MDA-MB-231 a été approfondi par Damiens et coll. (1999). Le traitement de ces cellules par la lactoferrine provoque un arrêt de croissance avec un blocage du cycle cellulaire à la transition G1-S. Cet arrêt en phase G1 est associé à une diminution du taux protéique de Cdk2 ("Cycline-Dependent Kinase") et de la cycline E, corrélée à l'inhibition de l'activité kinase de la Cdk2. L'activité Cdk4 est également

diminuée, alors que l'expression de p21^{CIP1}, un inhibiteur de Cdks, est augmentée. De plus la lactoferrine maintient la protéine du rétinoblastome pRb dans sa forme hypophosphorylée. La lactoferrine exerce donc son effet anti-prolifératif en modulant l'expression ou l'activité des protéines régulatrices de la transition G1-S du cycle cellulaire (Damiens *et al.*, 1999).

5- Conclusion

Nous avons montré, lors des paragraphes précédents, que la lactoferrine module la prolifération lymphocytaire, diminue la croissance tumorale, régule négativement la granulopoïèse, accélère la maturation des cellules B et T, affecte la production d'anticorps, et enfin augmente l'activité cytotoxique des cellules NK et des monocytes. Ces nombreux rôles apparents sont dûs à différentes études réalisées sur des systèmes cellulaires isolés, et ont en fait le même but : stimuler la réponse immunitaire (figure 7, page 54).

Tous ces processus étant régulés par des cytokines, la lactoferrine semble moduler la réponse immunitaire en affectant la production et la sécrétion de ces cytokines. La lactoferrine inhibe en effet la sécrétion par les cellules phagocytaires mononucléaires d'Il-1, qui régule elle-même la synthèse de GM-CSF par les cellules accessoires lors du processus de granulopoïèse (Zucali *et al.*, 1989). Elle agit également sur les monocytes/macrophages en stimulant la sécrétion en cascade de cytokines: le TNF- α , puis l'Il-8 et le NO ("Nitric Oxide") (Sorimachi *et al.*, 1997). De plus, une culture mixte de cellules lymphocytaires réagit à la lactoferrine par une inhibition de la prolifération ainsi que par une inhibition de la sécrétion séquentielle de TNF- α , d'Il-1 et d'Il-2 (Crouch *et al.*, 1992).

En conclusion, il apparaît que la lactoferrine soit capable d'interagir avec les cellules effectrices de l'immunité naturelle (monocytes/macrophages, leucocytes, et cellules NK) et de l'immunité spécifique (lymphocytes T, et cellules présentatrices d'antigènes: lymphocytes B et macrophages). Elle semble agir sur ces cellules en modulant directement ou indirectement leurs activités dans les processus inflammatoire et immunitaire. Cependant, les effets de la lactoferrine restent relativement controversés, et les mécanismes d'action, au niveau moléculaire et intracellulaire, demeurent mal définis.

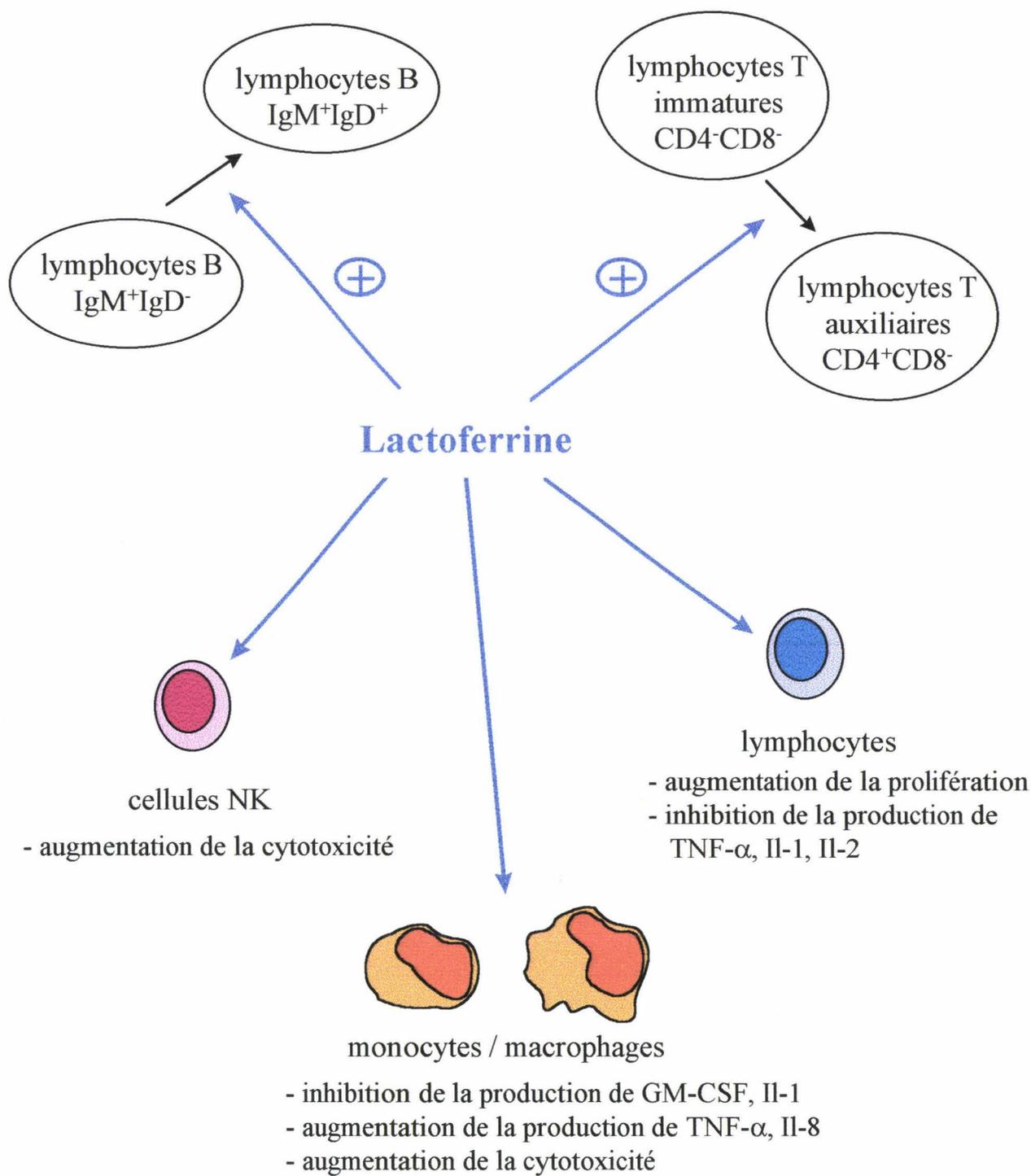


Figure 7: Rôle de la lactoferrine dans la réponse immunitaire.

Travaux personnels

PARTIE I

MODE D'ACTION DE LA LACTOFERRINE HUMAINE SUR LES CELLULES LYMPHOBLASTIQUES T JURKAT

-A-

EFFET DE LA LACTOFERRINE SUR LES CELLULES JURKAT

I- INTRODUCTION

La lactoferrine est bien connue pour être impliquée dans les processus inflammatoire, antitumoral et immunitaire. Lors du processus d'immunomodulation, elle intervient, entre autres, dans la différenciation des cellules B et T immatures : les thymocytes murins CD4⁺ CD8⁻ acquièrent l'antigène de surface CD4, phénotype caractéristique des cellules T auxiliaires (Zimecki *et al.*, 1991). De la même manière, en présence de lactoferrine, les cellules B spléniques murines montrent un changement phénotypique dans la balance des marqueurs de surface IgM et IgD, ce qui est caractéristique de la maturation des cellules B immatures (Zimecki *et al.*, 1995).

Pour approfondir nos connaissances concernant l'effet de la lactoferrine sur l'expression du CD4 lors de la maturation des cellules T immatures, nous avons utilisé la lignée lymphoblastique T Jurkat. Ces cellules, qui expriment le récepteur lymphocytaire de la lactoferrine (Bi *et al.*, 1994 ; Legrand *et al.*, 1997), ainsi qu'une faible densité d'antigène CD4 à la surface cellulaire, constituent un bon modèle expérimental pour notre étude. Des expériences préliminaires réalisées dans notre laboratoire ont en effet montré que la lactoferrine induit une maturation des cellules T Jurkat en augmentant la densité de surface de CD4, en diminuant celle du CD71, et en bloquant la prolifération cellulaire (Bi *et al.*, 1997).

Avant de présenter nos résultats concernant l'effet de la lactoferrine sur l'expression du gène et de la densité de surface du CD4, ainsi que sur le cycle cellulaire des cellules Jurkat, nous allons rappeler brièvement la structure du gène et sa régulation au cours du processus de développement des cellules T, ainsi que le rôle du CD4 dans la réponse immunitaire.

1- Gène du CD4

Le gène du CD4 est situé sur le chromosome 12 humain et le chromosome 6 murin (Ansari-Lari *et al.*, 1996 ; Bruniquel *et al.*, 1997). Les études concernant la structure et la régulation du gène du CD4 ont surtout été réalisées sur le gène murin, qui est à l'heure actuelle mieux connu que le gène humain (Ellmeier *et al.*, 1999 pour revue générale).

Par analogie avec le gène murin, le gène du CD4 humain est également régulé par un promoteur et des régions activatrice et inhibitrice (figure 8, page 57). Le promoteur est un fragment d'environ 1100 pb situé immédiatement en 5' du site d'initiation de la transcription du gène, et possède deux sites de fixation des membres de la famille Ets (situés à -1060 et -40) et un site reconnu par les facteurs de transcription de la famille ATF/CRE ("Activating Transcription Factor / cyclic AMP Response Element") (Salmon *et al.*, 1993 ; Flamand *et al.*, 1998). La région activatrice est localisée à 6,5 kb en amont du gène du CD4, elle est homologue à la région proximale murine (Blum *et al.*, 1993), et contient trois sites de fixation de protéines nucléaires, appelés CD4-1, CD4-2 et CD4-3 (Sawada et Littman, 1993). La séquence CD4-2 représente un site consensus de reconnaissance de facteurs nucléaires spécifiques des lymphocytes T formant le complexe TCF1/LEF 1 ("T Cell Factor / Lymphoid Enhancer Factor") (Clevers et van de Wetering, 1997), alors que CD4-1 et CD4-3 possèdent des motifs reconnus par les facteurs de transcription de la famille bHLH ("basic Helix-Loop-Helix") (Murre *et al.*, 1989). Enfin le gène du CD4 peut être soumis à une régulation négative par la région inhibitrice qui est localisée dans le premier intron du gène. Elle présente 77 % d'homologie avec la région inhibitrice murine, et possède 2 sites de fixation de protéines nucléaires (Duncan *et al.*, 1996). Par ailleurs, aucune étude ne signale la présence d'un site de fixation de la lactoferrine dans le promoteur du gène du CD4.

Les nombreuses études réalisées sur le gène du CD4 humain et murin montrent que la combinaison du promoteur et des régions activatrices et inhibitrices est nécessaire et suffisante pour réguler la transcription du gène du CD4. Les travaux suggèrent également qu'il est hautement improbable qu'un mécanisme post-transcriptionnel puisse jouer un rôle dans l'expression du CD4.

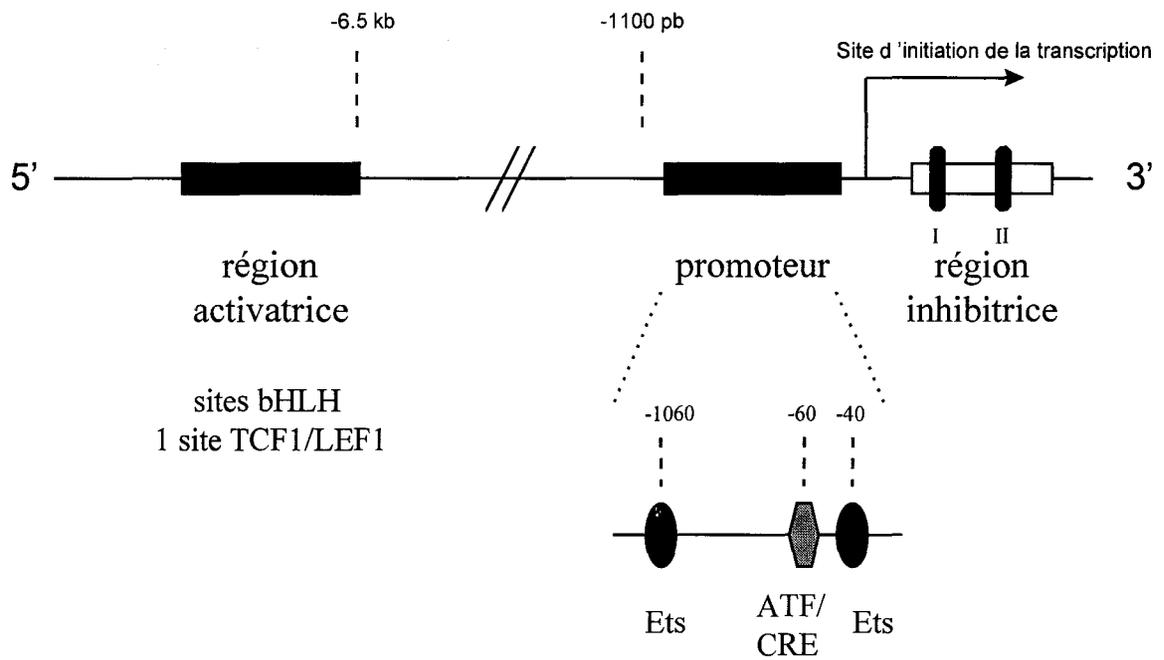


Figure 8 : Structure du gène du CD4 humain.

2- Régulation du gène du CD4 lors du développement des cellules T

Le développement des cellules T immatures se fait en 3 grandes étapes faisant intervenir les cellules double négatives, les cellules double positives et les cellules simple positives (figure 9, page 59). Les cellules immatures double négatives $CD4^-CD8^-$ représentent 1 à 5 % des thymocytes totaux et peuvent être divisées en sous-populations selon l'étape développementale, c'est-à-dire selon l'expression en surface des molécules CD44, récepteur des acides hyaluroniques, et CD25, chaîne α du récepteur de l'IL-2. Les cellules passent alors du phénotype $CD44^+25^-$ (progéniteurs lymphoïques thymiques) à $CD44^+25^+$ (cellules pro-T) puis $CD44^-25^+$ (cellules pré-T) et enfin $CD44^-25^-$. Le réarrangement fonctionnel et l'expression du gène de la chaîne β du TCR (" T Cell Receptor "), qui commence à l'étape des cellules pré-T, conduisent à la formation d'un complexe pré-TCR fonctionnel dont les signaux provoquent la prolifération et l'expansion de ces thymocytes en un processus appelé β sélection.

Les signaux transmis par le pré-TCR permettent également le réarrangement et l'expression du gène de la chaîne α du TCR, ainsi que l'expression des corécepteurs CD4 et CD8. Les cellules progressent donc dans le stade double positif, qui constitue 80 à 90 % des thymocytes, pour aboutir à des thymocytes $CD4^+CD8^+$ exprimant un complexe $TCR\alpha\beta$ mature à leur surface.

Le développement des cellules double positives en simple positives dépend du complexe $TCR\alpha\beta$ fonctionnel et de son interaction avec les complexes CMH/peptides antigéniques (complexe majeur d'histocompatibilité), et fait intervenir deux processus qui sont la sélection positive et la sélection négative. La sélection positive consiste en l'expansion et en la différenciation finale des thymocytes dont le TCR réagit spécifiquement avec les CMH I et CMH II. En effet, lorsque les thymocytes possèdent un TCR qui reconnaît le complexe CMH I-peptide, les cellules vont réguler négativement l'expression de l'antigène de surface CD4 et devenir des simple positives $CD8^+$. De la même manière, l'interaction du TCR avec le complexe CMH II-peptide aboutit à la formation de cellules $CD4^+$. Quant à la sélection négative, elle consiste en l'élimination par apoptose des thymocytes dont le TCR est peu spécifique pour les CMH-peptides ou trop spécifique pour le CMH seul. Alors que les mécanismes moléculaires intervenant dans la sélection négative sont loin d'être connus, ceux

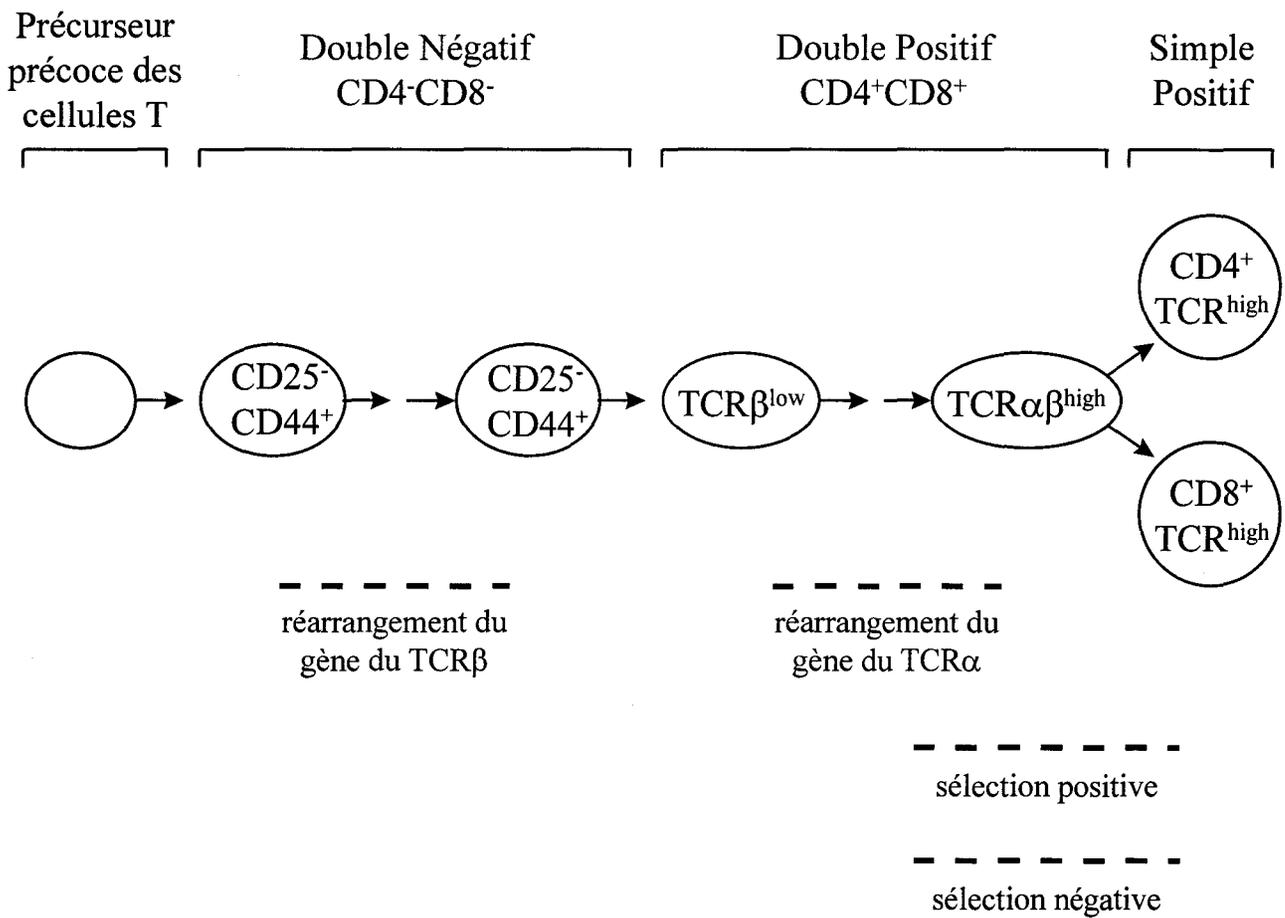


Figure 9 : Les grandes étapes du développement des thymocytes. Le développement des cellules T est caractérisé par les processus surlignés en pointillés (d'après Sebzda *et al.*, 1999).

impliqués dans la sélection positive ont été largement étudiés. Cependant les différents modèles proposés pour la sélection positive sont continuellement remis en question (Chan *et al.*, 1998 ; Saito et Watanabe, 1998 ; Sebzda *et al.*, 1999 pour revues générales).

3- Rôle du CD4 dans la réponse immunitaire

Lors du déclenchement de la réponse immunitaire par intrusion de cellules étrangères (cellules tumorales, greffons, bactéries, virus...), ces dernières libèrent des antigènes qui sont endocytés et hydrolysés en peptides antigéniques par les cellules présentatrices d'antigènes telles que les macrophages. Ces cellules présentent les peptides aux lymphocytes T cytotoxiques CD8⁺ grâce au CMH I, et aux lymphocytes T auxiliaires CD4⁺ grâce au CMH II. Les CMH sont en fait reconnus par le complexe TCR/CD3 des lymphocytes T, mais la spécificité de la reconnaissance des CMH I et II est due aux corécepteurs CD4 et CD8. En réponse à la présentation des antigènes, les cellules CD4⁺ sécrètent des cytokines : l'interleukine-2 nécessaire à l'activation des cellules CD8⁺, et d'autres cytokines qui activent les éosinophiles et les macrophages. Le contenu des granules relargués par les éosinophiles et les radicaux libres libérés par les macrophages contribuent à la lyse des cellules étrangères. Ces cellules étrangères peuvent également être directement tuées par les lymphocytes T cytotoxiques CD8⁺ activés (Pardoll et Topalian, 1998 pour revue générale).

Les cellules T CD4⁺ jouent en fait le rôle de chef d'orchestre de cette réponse immunitaire spécifique, puisqu'elles sont indispensables à l'activation des lymphocytes T cytotoxiques, et qu'elles permettent la lyse des cellules étrangères grâce à l'activation des éosinophiles et des macrophages (figure 10, page 61).

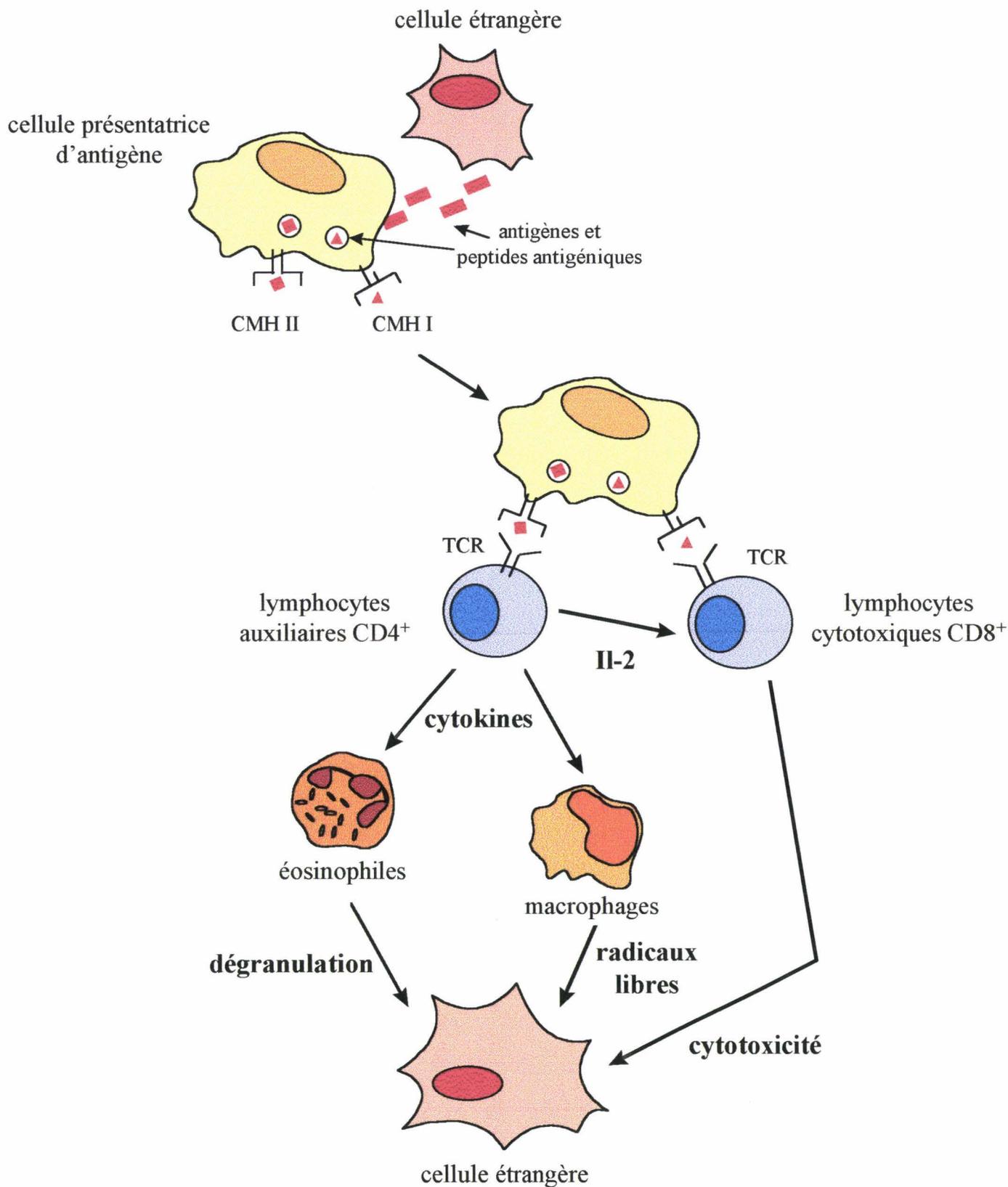


Figure 10: Rôle des cellules T CD4+ dans la réponse immunitaire (d'après Pardoll et Topalian, 1998).

II- RÉSULTATS

1- Régulation de la densité de surface de l'antigène CD4

Afin d'étudier l'effet de la lactoferrine sur l'expression du CD4 en surface, les cellules Jurkat sont traitées pendant différentes périodes de temps (de 0 à 72 h) avec des concentrations allant de 0 à 100 $\mu\text{g/ml}$ de lactoferrine. L'antigène de surface est ensuite détecté par cytofluorimétrie en flux après incubation des cellules avec un anticorps anti-CD4 puis un second anticorps marqué au FITC.

La figure 11 (page 63) montre que les cellules non traitées révélées par l'anticorps anti-CD4 présentent une fluorescence plus élevée (moyenne de fluorescence de 379) que celles détectées avec l'anticorps isotype contrôle (moyenne de fluorescence de 356), indiquant que les cellules Jurkat possèdent à leur surface une densité de base non négligeable d'antigènes CD4. L'expression basale de ce marqueur est augmentée après 48 h de traitement en présence de lactoferrine à une concentration de 10 $\mu\text{g/ml}$ (moyenne de fluorescence de 407). Par ailleurs, dans les mêmes conditions expérimentales, la forskoline, connue pour réguler la transcription du gène du CD4, est utilisée comme témoin positif. Nous avons effectivement observé que la forskoline, après 48 h d'incubation à une concentration de 10 μM , augmente considérablement (4 fois) la densité de CD4 à la surface des cellules.

Nous avons également regardé l'effet du temps d'incubation en traitant les cellules pendant des périodes de temps variant de 0 à 72 h avec 10 $\mu\text{g/ml}$ de lactoferrine, et nous avons observé une réponse optimale pour 48 h d'incubation (résultats non présentés). La même expérience a ensuite été réalisée pendant 48 h avec des concentrations croissantes en lactoferrine (de 0 à 100 $\mu\text{g/ml}$) (figure 12, page 64). On observe alors que l'expression du CD4 n'est pas affectée par de faible (1 $\mu\text{g/ml}$) et forte (100 $\mu\text{g/ml}$) concentrations en lactoferrine, alors qu'elle est nettement stimulée par 10 $\mu\text{g/ml}$ de lactoferrine (2,4 fois).

Ces expériences nous montrent que la lactoferrine augmente l'expression de l'antigène CD4 à la surface des cellules Jurkat, et que cet effet dépend du temps d'incubation et de la concentration en lactoferrine. Cet effet est maximal après 48 h de traitement avec 10 $\mu\text{g/ml}$ de lactoferrine (125 nM). A cette concentration, tous les sites de fixation de haute affinité de la lactoferrine à la surface des cellules Jurkat est saturée, la constante de dissociation de la lactoferrine pour ces cellules étant de 60 à 70 nM (Legrand *et al.*, 1997).

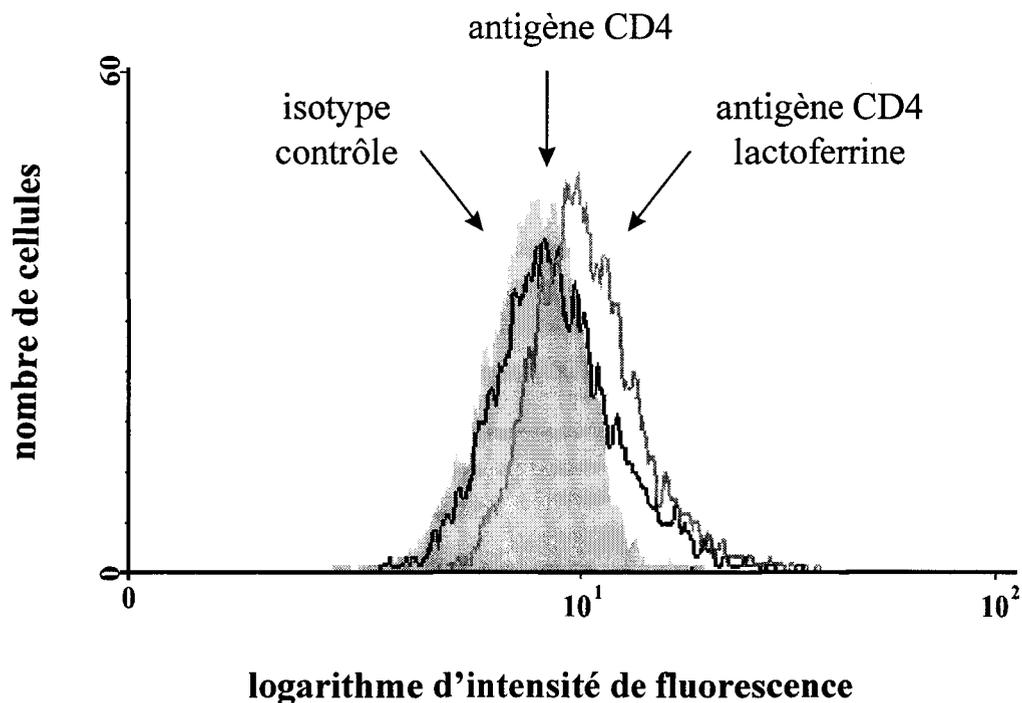


Figure 11 : Régulation de la densité de surface de l'antigène CD4 par la lactoferrine.

Les cellules Jurkat (2×10^5) sont cultivées dans du milieu complet RPMI, et traitées ou non avec $10 \mu\text{g/ml}$ de lactoferrine pendant 48 h. L'antigène CD4 est détecté par cytofluorimétrie en flux à l'aide d'un anticorps monoclonal anti-CD4. L'expérience a été réalisée plusieurs fois, et nous montrons le résultat le plus représentatif exprimé en variations de logarithme d'intensité de fluorescence: *pic gris plein*, isotype contrôle ; *pic noir*, antigène CD4 sur les cellules non traitées ; *pic gris*, antigène CD4 sur les cellules traitées.

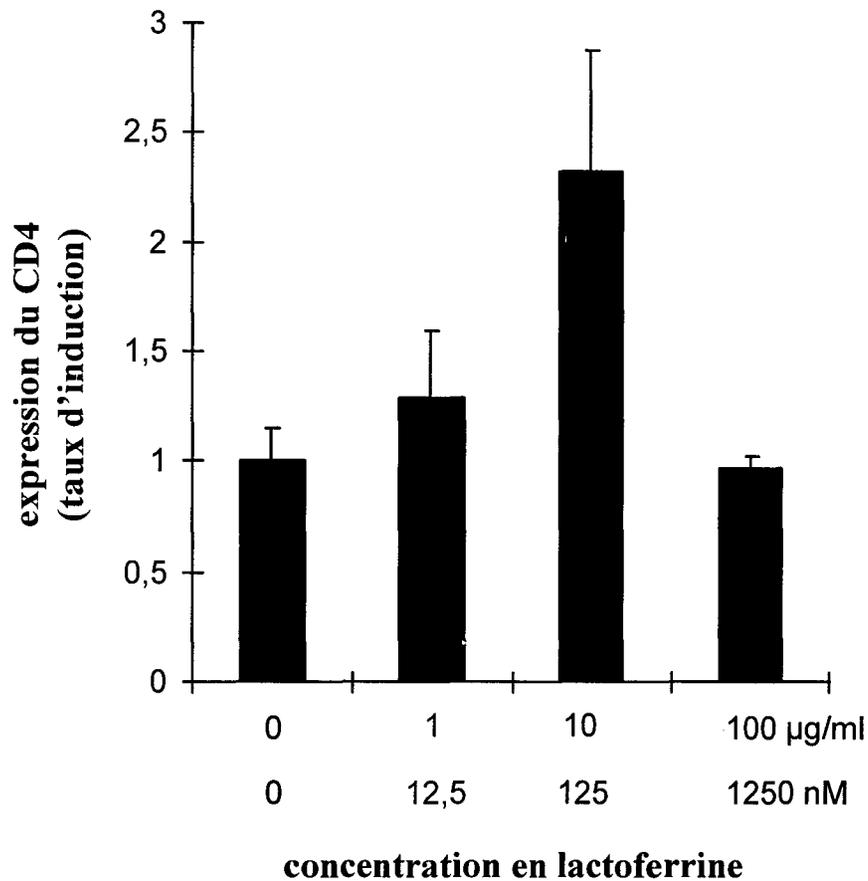


Figure 12 : Effet dose-dépendant de la lactoferrine sur l'expression du CD4.

Les cellules Jurkat sont traitées pendant 48 h avec différentes concentrations en lactoferrine, avant l'analyse de l'expression du CD4 par cytofluorimétrie en flux. Les variations de la densité du CD4 sont calculées comme expliqué dans l'appendice technique, et exprimées en taux d'induction par rapport aux cellules non traitées. Cet histogramme représente la moyenne de trois expériences distinctes ($P < 0,05$, Student's *t*-test).

2- Régulation de l'expression du gène du CD4

L'augmentation de la densité de surface du CD4, que nous avons observée, peut être régulée au niveau de la transcription du gène ou au niveau de la traduction des ARNm. Parmi les nombreuses études réalisées sur la régulation du CD4, deux équipes différentes ont montré que l'expression du CD4 à la surface des thymocytes immatures ou des cellules T matures est régulée au niveau transcriptionnel (Sawada et Littman, 1991 ; Sawada *et al.*, 1994 ; Siu *et al.*, 1994). Afin d'étudier l'effet de la lactoferrine sur l'expression du gène du CD4 dans les cellules lymphoblastiques T Jurkat, nous nous sommes intéressée à la synthèse des ARNm du CD4, ainsi qu'à l'activité du promoteur du gène du CD4. Pour cela, nous avons détecté les ARNm du CD4 par RT-PCR ("RetroTranscription-Polymerase Chain Reaction") à l'aide de sondes oligonucléotidiques spécifiques, et étudié l'activité luciférase de vecteurs contenant le promoteur minimal du CD4 suivi du gène reporter de la luciférase.

2.1- Détection des ARNm par RT-PCR

Afin de détecter les ARNm du CD4, les cellules (5×10^6) sont incubées avec 10 $\mu\text{g/ml}$ de lactoferrine pendant des périodes de temps variant de 0 à 48 h. L'ARN total est extrait des cellules, rétrotranscrit et amplifié par PCR à l'aide de couples d'amorces spécifiques de la GAPDH (glycéraldéhyde-3-phosphodéhydrogénase) humaine et du CD4 humain (figure 13, page 66).

Au cours de ces expériences de RT-PCR, nous avons utilisé la GAPDH comme contrôle interne. La détection de ce gène constitutivement exprimé permet de vérifier l'homogénéité des échantillons au niveau de la quantité d'ARN total. Dans les cellules non traitées, on observe la présence du transcrit du CD4 dont l'intensité augmente au cours du temps et atteint un maximum après 48 h d'incubation. Ce profil d'expression se retrouve dans les cellules traitées par la lactoferrine avec une intensité plus forte pour 48 h de traitement par rapport au contrôle. Le graphe obtenu en ramenant l'intensité de CD4 par rapport à celle du témoin interne GAPDH confirme que la lactoferrine présente un effet activateur de la synthèse de l'ARNm de CD4 uniquement pour 48 h d'incubation des cellules. Les statistiques réalisées sur trois expériences différentes montrent qu'à ce temps d'activation la lactoferrine induit un signal 1,5 fois plus fort que les cellules non traitées.

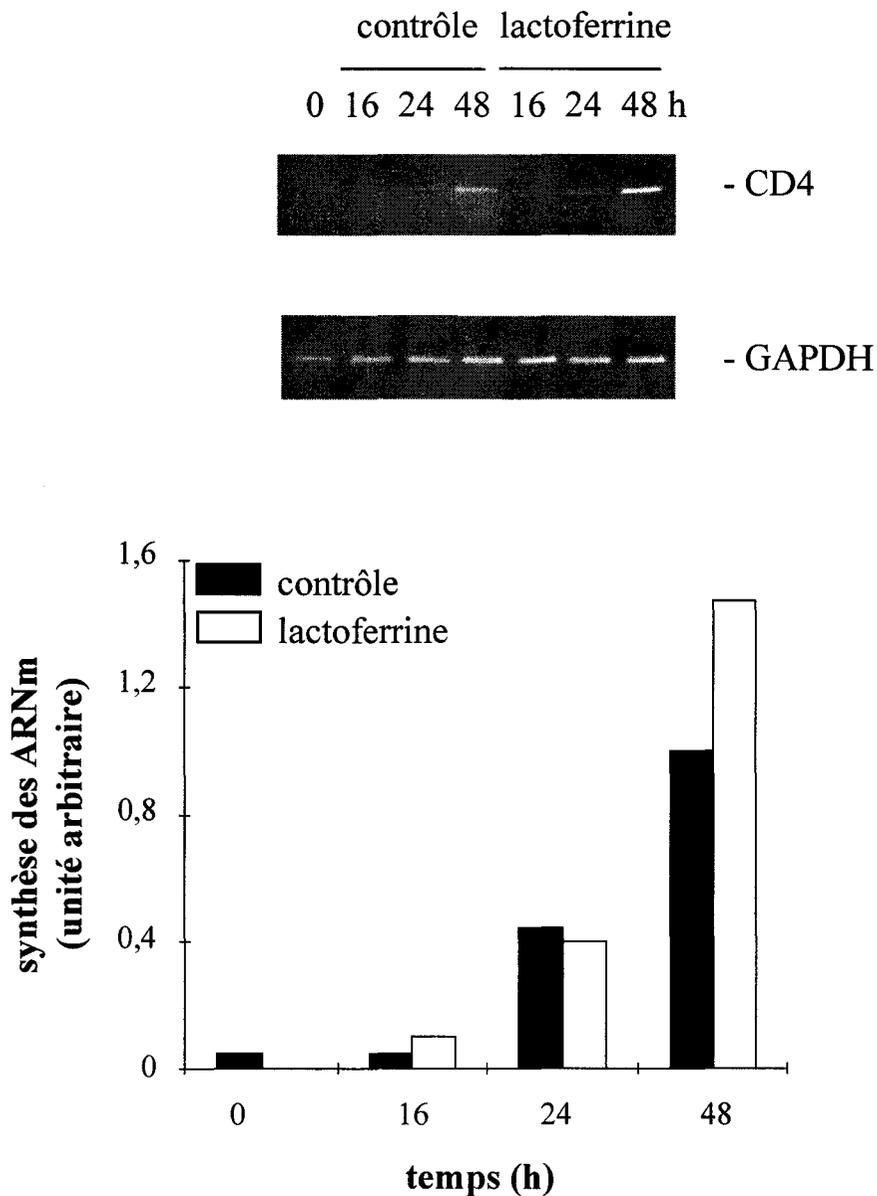


Figure 13 : Augmentation du taux de transcrits du CD4 par la lactoferrine.

Les cellules Jurkat (5×10^6) sont incubées en présence de $10 \mu\text{g/ml}$ de lactoferrine pendant des périodes de temps allant de 0 à 48 h. Les ARN sont ensuite extraits des cellules, rétrotranscrits et amplifiés par PCR à l'aide d'oligonucléotides spécifiques dirigés contre la GAPDH et le CD4. *En haut*, les produits d'amplification sont visualisés sur gel d'agarose marqué au BET. *Le graphe* représente la quantification des bandes de l'ARNm du CD4 ramenée à l'intensité des bandes de GAPDH correspondantes. L'expérience a été réalisée trois fois, et nous montrons le résultat le plus représentatif.

Nous avons donc démontré que la présence de lactoferrine dans le milieu d'incubation provoque une augmentation de la synthèse des ARNm du CD4. Cet effet dépend du temps d'incubation et présente un maximum après 48 h de traitement des cellules avec une concentration de 10 µg/ml de lactoferrine.

2.2- Régulation du promoteur du gène du CD4

Les cellules Jurkat sont transfectées par électroporation par le plasmide pGL3b, -1076CD4p ou pGL3c puis remises en culture pendant une nuit. Après incubation en présence de lactoferrine, les cellules sont lysées, et l'activité luciférase analysée au luminomètre. Avant de réaliser cette expérience, il a fallu mettre au point les différents paramètres en faisant varier la quantité de plasmide, les conditions d'électroporation et la densité des cellules. Les conditions expérimentales optimales ainsi obtenues sont les suivantes : 5×10^6 cellules sont transfectées par un seul choc électrique (200 V, 1500 µF) avec 15 µg de plasmide, remises en suspension dans 5 ml de milieu complet, puis traitées par 10 µg/ml de lactoferrine pendant 48 h avant d'être lysées (figure 14, page 68).

Dans les cellules non traitées par la lactoferrine, l'activité luciférase du vecteur -1076CD4p, contenant le promoteur minimal du CD4, est 2,5 fois plus élevée que celle du vecteur contrôle pGL3b qui ne contient pas le promoteur du CD4, indiquant que les cellules Jurkat présentent une activité de base non négligeable du promoteur du CD4 (figure 14A). En présence de lactoferrine, l'activité du vecteur pGL3 n'est pas modifiée, alors que celle du vecteur -1076CD4p est augmentée d'un facteur 1,5. L'étude statistique de quatre expériences distinctes confirme l'activation du promoteur du CD4 par la lactoferrine, avec un taux d'induction moyen de 1,6 (figure 14B). Par ailleurs, le vecteur pGL3b faisant figure de témoin négatif, nous avons également utilisé un témoin positif qui est le vecteur pGL3c. Ce vecteur contient les séquences promotrices et activatrices de SV-40, et permet de vérifier l'efficacité de la transfection. Ce vecteur possède en effet une activité luciférase 8 fois plus forte que le vecteur pGL3b (figure 14A).

Cette expérience montre donc que le vecteur -1076CD4p, contenant le promoteur du gène du CD4 et transfecté dans les cellules Jurkat, présente une activité luciférase de base qui est augmentée après 48 h de traitement des cellules avec 10 µg/ml de lactoferrine.

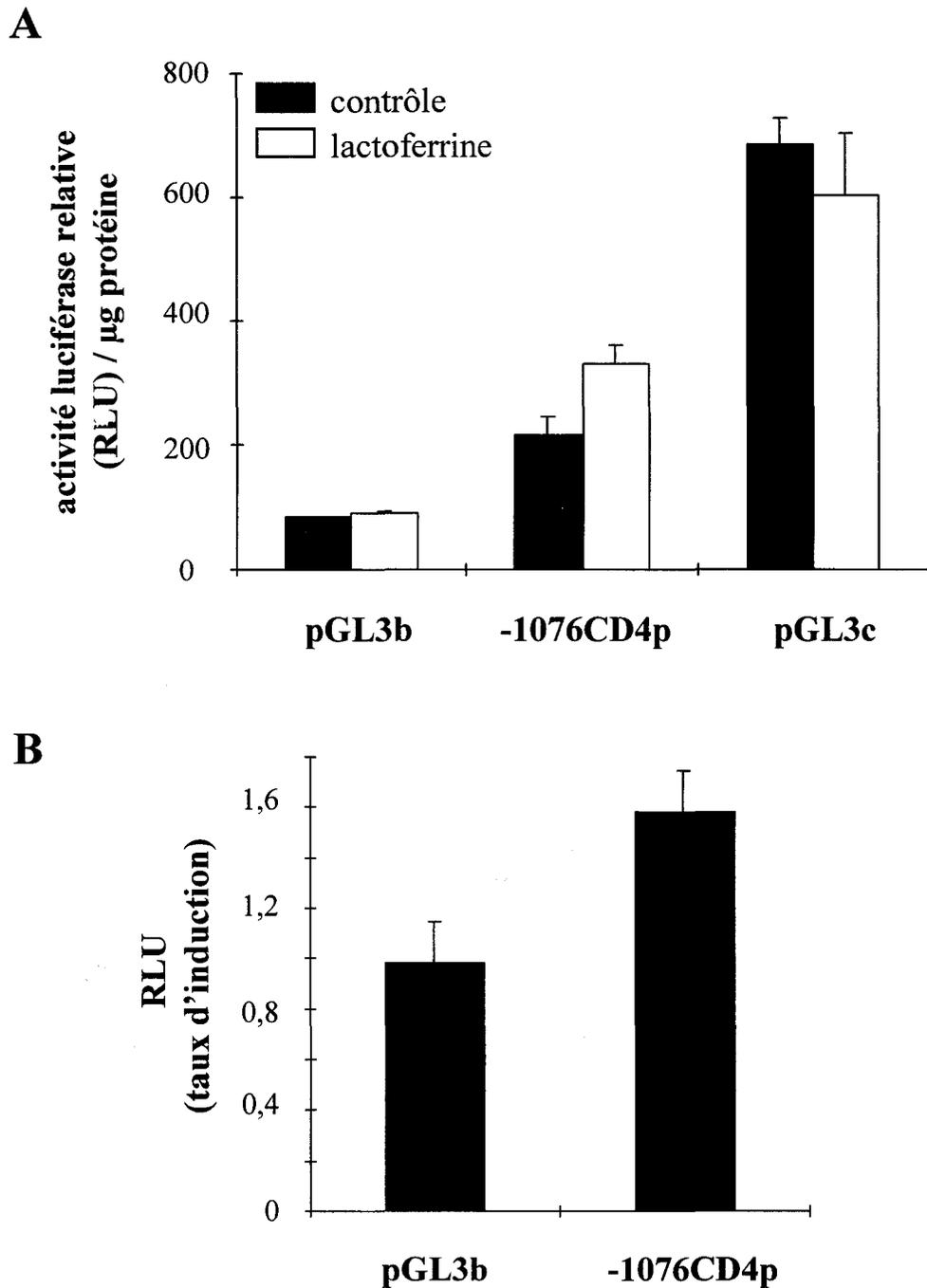


Figure 14 : Activation du promoteur du gène du CD4 par la lactoferrine.

Les cellules Jurkat (5×10^6) sont transfectées par électroporation avec 15 μg de plasmide pGL3b, -1076CD4p, ou pGL3c puis remises en suspension dans du milieu complet. Après une nuit d'incubation, la lactoferrine est ajoutée à une concentration de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pendant 48 h. Les cellules sont ensuite lysées, et l'activité luciférase est lue en présence de luciférine par un luminomètre. L'expérience a été réalisée quatre fois en double exemplaire, et les résultats sont exprimés **(A)** en activité luciférase relative (RLU)/ μg protéine, et nous montrons l'expérience la plus représentative; **(B)** en taux d'induction de RLU par rapport au contrôle, et nous représentons la moyenne des quatre expériences ($P < 0,005$, Student's *t*-test).

L'ensemble des résultats concernant l'étude de l'expression du gène du CD4 a donc démontré que la lactoferrine régule la densité de surface du CD4 en agissant au niveau de la transcription de son gène. En effet, l'activité du promoteur du gène du CD4 ainsi que le taux de transcrits du CD4 sont augmentés en présence de lactoferrine dans le milieu d'incubation.

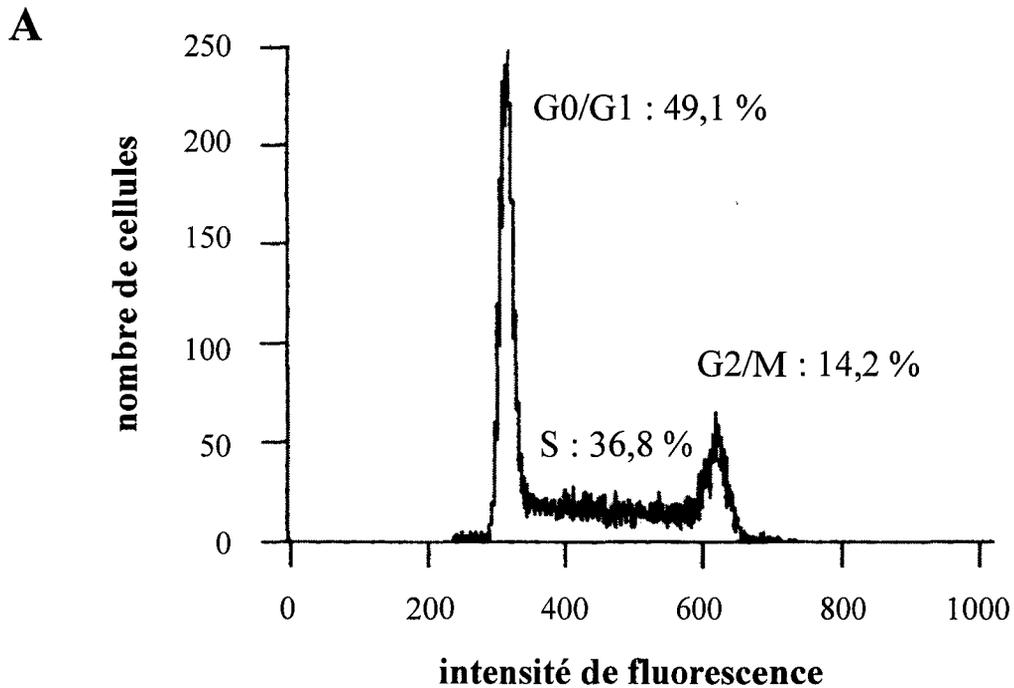
3- Régulation du cycle cellulaire

Pour l'analyse du cycle cellulaire, les cellules Jurkat sont incubées pendant des périodes de temps de 0, 24 ou 48 h avec la lactoferrine à une concentration de 10 µg/ml. La distribution des cellules dans les différentes phases du cycle est analysée par cytofluorimétrie en flux après marquage des cellules à l'iodure de propidium (figure 15, page 70).

La majorité des cellules Jurkat non traitées sont en phase G1 (environ 50 % des cellules) qui est une phase de préparation à la réplication de l'ADN (figure 15A). Le reste de la population est répartie entre les phases S (environ 35 %) et G2/M (environ 15 %) qui sont, respectivement, les phases de réplication de l'ADN et de division cellulaire par le mécanisme de mitose. De plus, cette répartition des cellules dans les trois phases du cycle n'est pas modifiée par la présence de lactoferrine dans le milieu d'incubation (figure 15B).

Par ailleurs, nous avons analysé la densité de surface du CD71, récepteur de la transferrine utilisé comme marqueur de prolifération, par détection au cytofluorimètre à l'aide d'un anticorps monoclonal anti-CD71 et d'un second anticorps marqué au FITC. Les résultats, non représentés, montrent que le traitement des cellules par la lactoferrine pendant 24 ou 48 h ne modifie pas la densité du CD71 à la surface cellulaire.

Les expériences décrites ci-dessus, réalisées dans les mêmes conditions expérimentales que pour l'étude de la régulation de la densité de surface du CD4 (10 µg/ml de lactoferrine pendant 48 h), révèlent que la prolifération des cellules Jurkat n'est pas affectée par la lactoferrine. En effet, aucune modification de la répartition des cellules dans le cycle cellulaire, ni de la densité de surface du marqueur CD71 n'est observée.



B

traitement des cellules	cellules dans les phases du cycle cellulaire (%)		
	G1	S	G2/M
contrôle	51,8 ± 2,1	34,4 ± 3,6	13,8 ± 4,7
lactoferrine	50,3 ± 1,9	35,1 ± 3,8	14,7 ± 4,9

Figure 15 : Effet de la lactoferrine sur la distribution des cellules dans le cycle cellulaire.

Les cellules Jurkat (1×10^6) sont incubées en absence (A,B) ou en présence (B) de 10 $\mu\text{g/ml}$ de lactoferrine pendant 48 h. La distribution des cellules dans les phases du cycle est visualisée par cytofluorimétrie en flux. Les résultats sont exprimés (A) en intensité de fluorescence, (B) en pourcentage de cellules dans les différentes phases et représentent la moyenne de trois expériences distinctes.

III- DISCUSSION

Lors de cette étude nous avons montré que la lactoferrine affecte l'expression du gène du CD4 et la densité de ce marqueur à la surface des cellules lymphoblastiques T Jurkat. De plus, cet effet n'est pas accompagné par un arrêt de la prolifération cellulaire, comme le suggèrent l'analyse de la densité de surface du CD71 et celle du cycle cellulaire.

Des études précédentes ont déjà montré que la lactoferrine présente des effets différents sur les lymphocytes T immatures selon les conditions expérimentales. Dans des conditions non-physiologiques, c'est-à-dire en milieu dépourvu de fer, la lactoferrine humaine augmente la prolifération des lymphocytes activés par la PHA et des cellules lymphoblastiques T Jurkat (Mazurier *et al.*, 1989 ; Bi *et al.*, 1997). Inversement, en présence de sérum de veau foetal (10 %) dans le milieu de culture, la lactoferrine favorise la maturation des cellules T en augmentant l'expression de l'antigène de surface CD4 dans les thymocytes murins double négatifs et dans les cellules humaines Jurkat. Cet effet a été observé après une nuit de traitement des thymocytes isolés par 2 ou 10 $\mu\text{g/ml}$ de lactoferrine (Zimecki *et al.*, 1995). Dans le cas des cellules Jurkat, le marqueur CD4 n'apparaît qu'après 3 jours et atteint un maximum après 12 jours de culture en présence de 100 $\mu\text{g/ml}$ de lactoferrine (Bi *et al.*, 1997). Parallèlement à l'augmentation de CD4, les mêmes auteurs ont observé une diminution du marqueur de prolifération CD71 et une incorporation de thymidine tritiée. Les résultats que nous avons obtenus, en utilisant les cellules Jurkat comme modèle expérimental, montrent qu'une dose unique de lactoferrine régule la densité de surface de CD4 de manière dépendante du temps d'incubation et de la concentration en lactoferrine : cet effet est optimal après 48 h de traitement des cellules avec 10 $\mu\text{g/ml}$ de lactoferrine. De plus, pendant ce temps relativement court par rapport à l'étude de Bi et coll. (1997), nous n'avons pas observé de diminution de la densité de surface de l'antigène CD71, ni de modification de la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire.

Les résultats que nous avons obtenus indiquent également que la lactoferrine augmente la synthèse des ARNm du CD4 et l'activité promotrice du gène du CD4, bien que le taux d'induction soit relativement faible (1,5 fois), suggérant que la densité de surface du CD4 est régulée au niveau transcriptionnel. Peu de choses sont connues sur les événements nucléaires impliqués dans le développement des thymocytes, et les facteurs de transcription intervenant

dans la régulation du CD4 par la lactoferrine restent à identifier. Ces facteurs de transcription pourraient être ceux dont les sites de fixation ont été caractérisés dans le gène du CD4 humain, c'est-à-dire Ets, ATF, bHLH, ou TCF1/LEF1 (Ellmeier *et al.*, 1999 pour revue générale), ou encore les facteurs des familles Egr ("Early growth Response") et Fos/Jun dont l'implication dans le passage des thymocytes double négatifs aux double positifs ainsi que dans la sélection positive a été montrée récemment (Shao *et al.*, 1997 ; Chen *et al.*, 1999).

Dans cette première partie de notre travail, nous avons donc démontré que la lactoferrine augmente la densité de l'antigène CD4 à la surface des cellules Jurkat grâce à une régulation transcriptionnelle positive du gène, suggérant que la lactoferrine pourrait intervenir principalement à deux niveaux dans la maturation des cellules T : le passage des thymocytes double négatifs $CD4^-CD8^-$ aux double positifs $CD4^+CD8^+$, et des double positifs aux simple positifs $CD4^+CD8^-$. Ces résultats confirment les travaux de Zimecki et coll. (1991) montrant que la lactoferrine accélère la maturation des cellules T immatures en cellules T de type auxiliaire. La lactoferrine activerait ainsi la réponse immunitaire, puisque les cellules T $CD4^+$ sont indispensables à l'activation des cellules T cytotoxiques $CD8^+$ et des monocytes/macrophages responsables de la lyse des cellules étrangères (Pardoll et Topalian, 1998 pour revue générale).

-B-

SIGNAL DE TRANSDUCTION IMPLIQUÉ DANS LA RÉGULATION DU CD4 PAR LA LACTOFERRINE

I- INTRODUCTION

Le mécanisme intracellulaire induit par la lactoferrine et aboutissant à l'expression du gène de l'antigène de surface CD4 dans les cellules lymphoblastiques T Jurkat n'est pas encore connu, mais selon la littérature, deux hypothèses peuvent être émises :

- une activité facteur de transcription de la lactoferrine elle-même après sa translocation dans le noyau (He et Furmanski, 1995 ; Baeuerle, 1995).
- l'induction d'un signal de transduction après fixation de la lactoferrine à son récepteur (Goretzki et Mueller, 1998 ; Tanaka *et al.*, 1998).

Dans le cas des cellules Jurkat, l'étude de l'internalisation de la lactoferrine a révélé l'absence de cette protéine dans le noyau (Bi *et al.*, 1996), permettant ainsi de rejeter l'hypothèse d'une activité facteur de transcription de la lactoferrine. Nous nous sommes alors intéressés à la transmission d'un signal en nous focalisant sur des événements qui sont connus pour jouer un rôle crucial dans la régulation de l'expression du CD4 lors de la maturation des thymocytes. De nombreuses études ont en effet été réalisées sur les signaux de transduction influençant deux grandes étapes de la maturation : le passage des cellules doubles négatives aux doubles positives, et celui de doubles positives aux simples positives. La première étape est contrôlée par le complexe pré-TCR qui induit un signal aboutissant à l'expression des corécepteurs CD4 et CD8, et dans lequel sont impliquées les protéines Lck et Erk (Michie *et al.*, 1999). La seconde étape consiste en une sélection positive ou négative des thymocytes doubles positifs, le type de sélection étant déterminé par la reconnaissance du complexe CMH/peptide antigénique par le TCR/CD3. Alors que la sélection positive est régulée par Lck, la cascade Ras/MAP Kinase (Erk1 et Erk2) et la voie de la phospholipase C γ , la sélection négative est influencée par Lck, la protéine kinase C, la calcineurine et la p38 MAP Kinase (Mariathasan *et al.*, 1999 ; Sebzda *et al.*, 1999).

Les cellules Jurkat exprimant le complexe TCR/CD3 à leur surface, nous nous sommes référés au signal de transduction induit par l'activation de ce complexe lors de la reconnaissance antigénique, afin de regarder l'effet de la lactoferrine sur les flux calciques, la phosphorylation des protéines, et l'activité MAP Kinase.

Signal de transduction transmis par le complexe TCR/CD3 dans les lymphocytes T

Le récepteur de l'antigène des lymphocytes T se présente en fait sous la forme d'un complexe TCR/CD3. Le TCR a pour fonction de reconnaître et de fixer spécifiquement les peptides antigéniques présentés par le CMH, et il est constitué d'un hétérodimère formé de deux chaînes α et β . Le CD3, associé de façon non covalente au TCR, est responsable de la transmission des signaux externes vers l'intérieur de la cellule, et il est composé des chaînes γ , δ , ϵ , et ζ (Clevers *et al.*, 1988 ; Franck *et al.*, 1990 ; Weiss et Littman, 1994 pour revue générale).

La stimulation antigénique du complexe TCR/CD3 est suivie au niveau intracellulaire par un ensemble d'événements biochimiques précoces, dont l'activation de trois protéines tyrosine kinases. Il s'agit de la protéine $p59^{fyn}$, associée aux chaînes ϵ , δ et γ du CD3, de la ZAP-70 ("Zeta Associated Protein") associée à la chaîne ζ du CD3, ainsi que de la $p56^{lck}$ associée au CD4 ou au CD8. La séquence proposée de cette cascade de protéines tyrosine kinases est la suivante: activation des kinases de la famille Src telle que la $p56^{lck}$, phosphorylation des motifs tyrosine de la chaîne ζ du CD3, puis recrutement, phosphorylation et activation de la ZAP-70 (Iwashima *et al.*, 1994 ; Weil *et al.*, 1995). La ZAP-70 ainsi activée phosphoryle sur des résidus tyrosine une protéine de 36 kDa, appelée p36 ou LAT ("Linker for Activation of T cells"). Cette protéine permet de coupler le TCR à ses deux voies de transduction qui sont la voie de la PLC (phospholipase C) et la voie Ras/MAP Kinase ("Mitogen-Activated Protein Kinase") (van Leeuwen et Samelson, 1999 pour revue générale). En effet la protéine cytosolique LAT stimule la phosphorylation de la PLC sur des résidus sérine et tyrosine (Park *et al.*, 1991), régulant ainsi la voie des phospho-inositides et la voie dépendante du calcium. Par ailleurs, les résidus tyrosine phosphorylés de LAT sont reconnus par le domaine SH2 ("Src Homology") de la protéine adaptatrice Grb2 ("Growth factor Receptor Bound protein") dont le domaine SH3 peut lui-même s'associer à deux effecteurs :

une molécule de 75 kDa et le facteur Sos ("Son of Sevenless"). Le complexe p36-Grb2-Sos stimule alors la voie Ras/MAP Kinase qui aboutit à l'activation des cellules T (Buday *et al.*, 1994).

Lors du processus d'activation des cellules T, la transcription des gènes de l'Il-2 et de son récepteur nécessite l'interaction coopérative de plusieurs facteurs de transcription (dont NF-AT, NF-KB, AP-1), et la convergence des voies de transduction citées ci-dessus. Ces différentes étapes sont résumées dans la figure 16 (page 76).

1- La voie de la phospholipase C

La PLC est responsable de l'hydrolyse du phosphatidylinositol-4,5-biphosphate membranaire, ou PIP₂, en deux seconds messagers : le DAG (diacylglycérol) qui reste au niveau de la membrane, et l'IP₃ (inositol-1,4,5-triphosphate) qui devient cytosolique (Berridge et Irvine, 1987). En présence de calcium, le DAG active la PKC (protéine kinase C) qui est alors transloquée dans la membrane où elle peut phosphoryler différentes enzymes et protéines sur des résidus sérine ou thréonine, telles que Raf-1 (Nishizuka, 1986). Quant à l'IP₃, il se fixe à un récepteur spécifique du réticulum endoplasmique, et stimule la libération du calcium qui s'y trouve (Streb *et al.*, 1983). L'augmentation de la concentration cytoplasmique en calcium permet la régulation de nombreuses protéines enzymatiques dépendantes du calcium, telles que la calcineurine ou la PKC. La calcineurine, sérine phosphatase appelée également PP2B, active ensuite la sous-unité cytosolique du NF-AT, facteur de transcription spécifique des lymphocytes T, permettant ainsi sa translocation dans le noyau. Par ailleurs, l'action combinée de la calcineurine et de la PKC favorise l'activation de NF-KB : phosphorylation de l'inhibiteur cytoplasmique I-KB, puis libération et translocation de NF-KB dans le noyau sous une forme active (Weiss et Littman, 1994 ; Szamel et Resch, 1995 pour revues générales) (figure 16, page 76).

2- La voie Ras/MAP Kinase

Après stimulation du récepteur, le facteur Sos, inclus dans le complexe p36-Grb2-Sos, catalyse l'échange GTP/GDP sur la p21^{ras}, un des membres de la famille des petites protéines G. Cette protéine, située à la surface cytoplasmique de la membrane plasmique, passe d'une

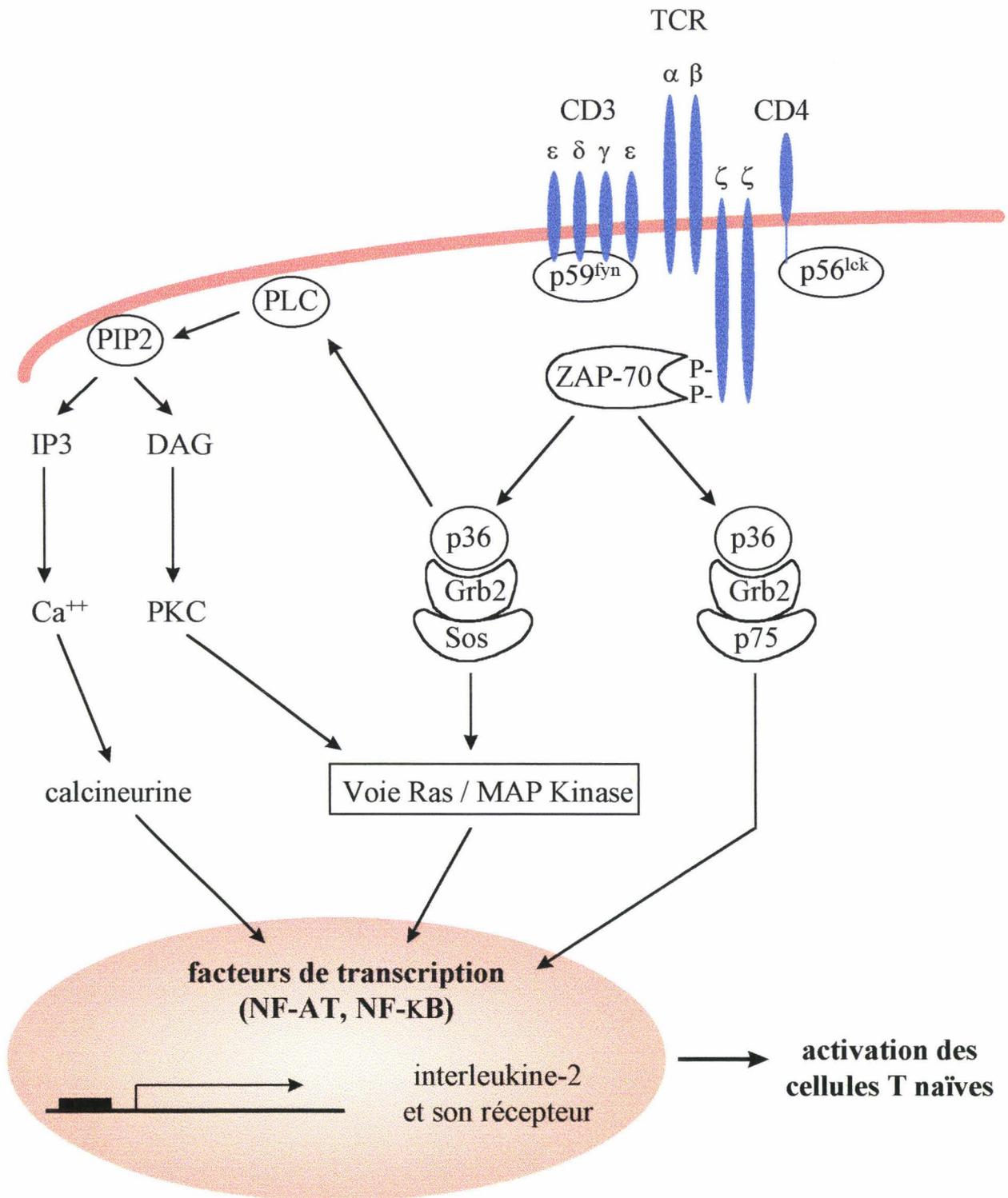


Figure 16: Voies de transduction du signal menant à l'activation des lymphocytes T naïfs après stimulation du complexe TCR/CD3 (d'après Weiss et Littman, 1994 ; Szamel et Resch, 1995).

forme inactive GDP à une forme active GTP. La p21^{ras} ainsi activée phosphoryle la sérine thréonine kinase Raf-1 (Morrison *et al.*, 1993) qui reconnaît spécifiquement la MAP Kinase Kinase (MAPKK ou MEK) (Crews et Erikson, 1992). Raf-1 active alors les isoformes MEK1 et MEK2 de la MAP Kinase Kinase par phosphorylation sur des résidus sérine et thréonine (Zheng et Guan, 1994). La MAP Kinase, qui possède deux isoformes p42 MAP Kinase et p44 MAP Kinase, appelées également Erk1 et Erk2 ("Extracellular regulated kinase") (Boulton *et al.*, 1991), est à son tour activée par la MAP Kinase Kinase par phosphorylation sur les résidus tyrosine et thréonine (Seger *et al.*, 1991). La MAP Kinase est alors transloquée sous forme active dans le noyau où elle peut agir sur de nombreux facteurs de transcription tels que c-Jun, c-Fos, c-Myc, ou Elk1 (Bokemeyer *et al.*, 1996 pour revue générale). Dans le cas du signal de transduction transmis par le complexe TCR/CD3 dans les lymphocytes T, la voie Ras/MAP Kinase active plus particulièrement c-Fos, c-Jun et la sous-unité nucléaire du NF-AT (Cantrell, 1996) (figure 17, page 78).

Par ailleurs, il semblerait que la cinétique d'activation de la MAP Kinase puisse intervenir dans le devenir physiologique de la cellule. En effet, l'activation de cette enzyme peut être transitoire ou soutenue, et aboutir à deux phénomènes différents qui sont la différenciation et la prolifération des cellules. Les premières études concernant ce sujet ont été réalisées sur les cellules humaines de phéochromocytomes PC12, et ont montré que la stimulation transitoire de la MAP Kinase par l'EGF aboutit à la prolifération cellulaire, alors que l'activation soutenue de la MAP Kinase par le NGF ("Nerve Growth Factor") provoque sa translocation au noyau et l'initiation de la transcription de gènes impliqués dans la différenciation des cellules (Traverse *et al.*, 1992 ; Marshall, 1995). Cependant des études plus récentes révèlent qu'en fait le rôle de la cinétique d'activation de la MAP Kinase dans le devenir de la cellule n'obéit pas à des règles précises, mais qu'il dépend du stimulus et du type cellulaire. En effet, une activation soutenue de la MAP Kinase peut conduire à une différenciation (York *et al.*, 1998 ; Hu *et al.*, 2000), ou à une prolifération (Mitchell *et al.*, 1999 ; Orsini *et al.*, 1999 ; Sergeant *et al.*, 2000).

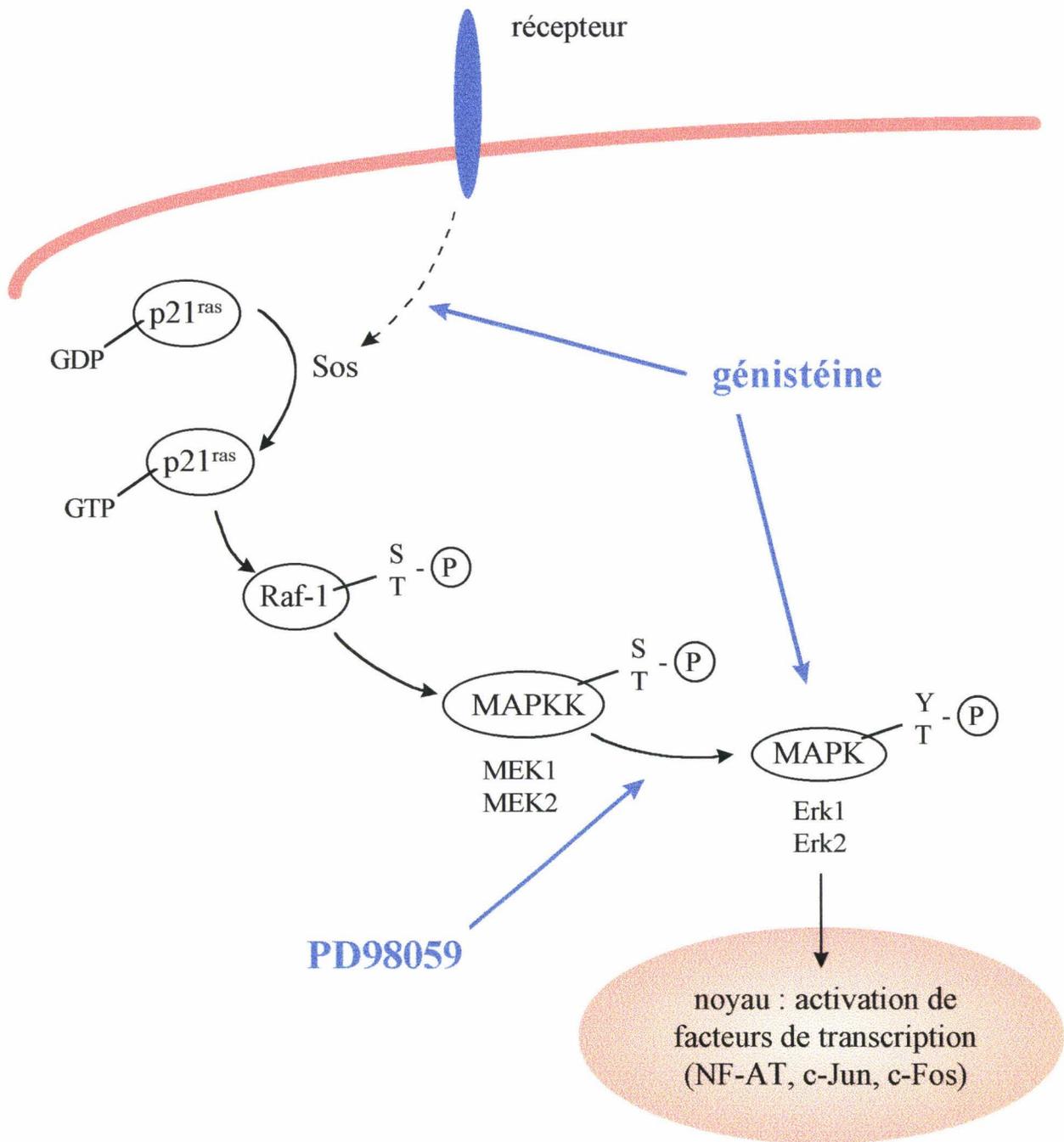


Figure 17 : Voie Ras / MAP Kinase, et action des inhibiteurs génistéine et PD98059 sur cette voie.

Afin d'élucider certaines étapes du signal de transduction induit par la lactoferrine, nous avons, dans un premier temps, regardé l'effet de celle-ci sur deux messagers intracellulaires qui sont les flux calciques et la phosphorylation des protéines sur leurs résidus tyrosine. L'activité catalytique de la MAP Kinase, qui est une enzyme clé des signaux de transduction associés à de nombreux récepteurs, a également été étudiée. Cette activité a ensuite été corrélée à la phosphorylation des protéines et à l'expression du CD4 grâce à deux inhibiteurs : la génistéine, inhibiteur des tyrosine kinases, et le PD98059, inhibiteur spécifique de la cascade MAP Kinase. Finalement nous avons montré l'implication d'une autre kinase, la p56^{lck}, dans la régulation du CD4 par la lactoferrine en utilisant la lignée cellulaire J.CaM1.6 qui est une lignée Jurkat déficiente en l'expression de Lck.

II- RÉSULTATS

1- Régulation des flux calciques

Afin de regarder si la lactoferrine active la phospholipase C, qui régule elle-même la voie des phospho-inositides et la voie dépendante du calcium, nous avons mesuré les concentrations calciques cytosoliques, et analysé leurs variations sous l'action de la lactoferrine. Pour cela, après chargement en Fluo3-AM (Fluo 3-AcetoxyMethyl ester), les cellules Jurkat subissent différents traitements en présence (figure 18A, page 81) ou en absence (figure 18B, page 81) de calcium dans le milieu d'incubation. Les flux calciques sont mesurés au cytofluorimètre en flux grâce à la fluorescence émise par le Fluo3-AM lorsqu'il est complexé au calcium.

Nous avons utilisé comme témoin positif la réponse déclenchée par l'activation du complexe TCR/CD3 par l'anticorps monoclonal anti-CD3. La fixation de l'anticorps anti-CD3 (0,1 µg/ml) sur son récepteur induit en effet deux flux calciques : le premier flux est rapide (2 mn), intense, et insensible à la concentration extracellulaire en calcium, alors que le second flux est tardif (10 mn), de plus faible amplitude, et disparaît lorsque les cellules sont incubées dans un milieu dépourvu en calcium (figure 18A et B). Selon Partiseti et coll. (1994), qui ont déjà décrit ces flux calciques, le premier flux résulte de la libération des réserves calciques après activation de la phospholipase C, et le second correspond à un flux membranaire tardif.

Dans le cas de la lactoferrine, la réponse optimale est obtenue pour une concentration en lactoferrine de 10 µg/ml, et elle est constituée d'un seul flux calcique qui est de faible amplitude et qui apparaît après 8 mn de stimulation. Ce flux, similaire au second flux induit par l'anti-CD3, disparaît également en absence de calcium dans le milieu extracellulaire (figure 18A et B).

Ces résultats montrent que la lactoferrine déclenche un flux tardif de faible amplitude qui correspond à une entrée de calcium extracellulaire à travers la membrane plasmique. Par comparaison avec les variations de flux calciques induites par l'anti-CD3, nous pouvons conclure que la lactoferrine ne provoque pas la libération du calcium du réticulum endoplasmique, et donc n'active pas directement la voie de la phospholipase C.

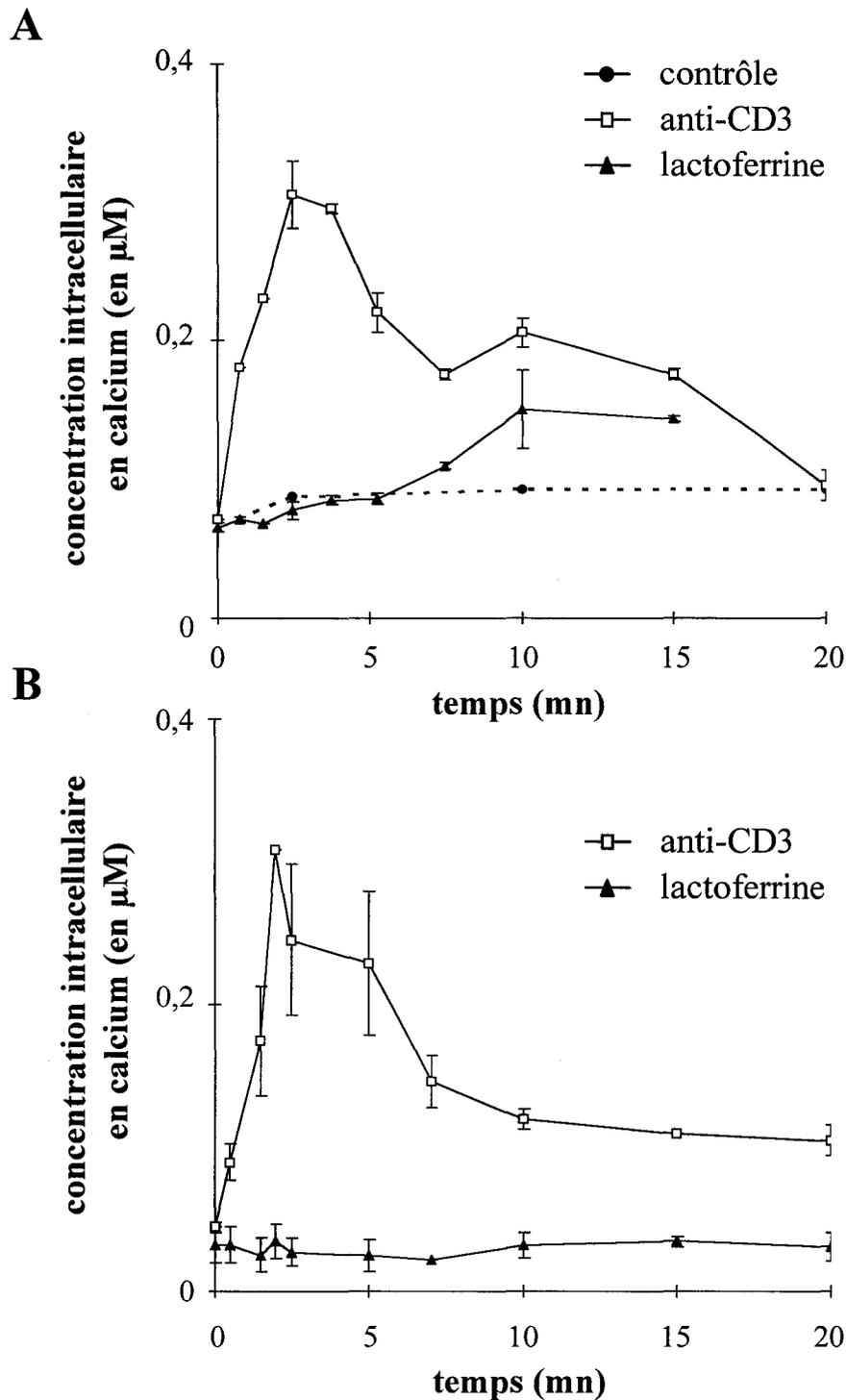


Figure 18 : Etude des variations de flux calciques induites par la lactoferrine.

Les cellules (2×10^6) sont incubées avec du Fluo3-AM avant d'être activées par $0,1 \mu\text{g/ml}$ d'anti-CD3, $10 \mu\text{g/ml}$ de lactoferrine, ou non activées. L'expérience est réalisée en présence (A) ou en absence (B) de calcium dans le milieu d'incubation. La variation de fluorescence est visualisée au cytofluorimètre en flux. Les résultats expriment la moyenne de quatre expériences distinctes.

2- Induction d'une cascade de phosphorylation sur les résidus tyrosine de protéines cytosoliques

Après l'étude des flux calciques, nous nous sommes intéressés à la phosphorylation des protéines cytosoliques, qui est un autre événement intracellulaire fondamental impliqué dans de nombreuses voies de transduction. Les cellules Jurkat sont traitées pendant des périodes de temps variant de 0 à 45 mn par la lactoferrine à une concentration de 10 µg/ml, concentration pour laquelle nous avons précédemment observé une réponse optimale pour la régulation de la densité de surface de l'antigène CD4. Après lyse des cellules, les protéines phosphorylées sur les résidus tyrosine sont séparées par SDS-PAGE et détectées par immunorévélation à l'aide d'un anticorps monoclonal anti-P-Tyr (figure 19, page 83).

Dans les cellules non traitées (première piste de la figure 19), la présence de cinq protéines phosphorylées sur leurs résidus tyrosine est détectée : p52, p55, p67, p72 et p100. Dès 5 mn de stimulation par la lactoferrine, on observe une augmentation de la phosphorylation de ces protéines, ainsi que l'apparition de nombreuses autres protéines phosphorylées. Ce phénomène de phosphorylation sur les résidus tyrosine est transitoire, atteignant des maximums compris entre 5 et 20 mn de traitement, selon les protéines (figure 19). Nous pouvons ainsi classer les protéines phosphorylées en trois groupes : le premier groupe (p47, p52, p55, p57, p59, p94, p100) est rapidement phosphorylé avec un maximum à 5-10 mn, alors que le second groupe (p37, p39, p61, p67, p69, p72, et p87) montre clairement un maximum de phosphorylation après 10 mn d'incubation. Tandis que la phosphorylation de toutes ces protéines revient à un niveau basal après 20 mn de stimulation, les protéines du troisième groupe (p32 et p34) sont phosphorylées plus lentement et atteignent un maximum à 20 mn. Enfin, il est intéressant de noter que la phosphorylation des deux premiers groupes de protéines augmente à nouveau après 30 mn, mais avec une plus faible amplitude, et diminue après 45 mn de traitement par la lactoferrine.

Ces résultats indiquent que la lactoferrine active une cascade de phosphorylation sur les résidus tyrosine de nombreuses protéines cytosoliques. Cet événement est transitoire et présente un maximum de phosphorylation après 5 à 10 mn d'incubation avec la lactoferrine, avec un rebond après 30 mn de traitement des cellules. Les nombreuses protéines rapidement phosphorylées indiquent que les premiers événements impliqués dans le signal de transduction induit par la lactoferrine sont régulés par des protéines tyrosine kinases.

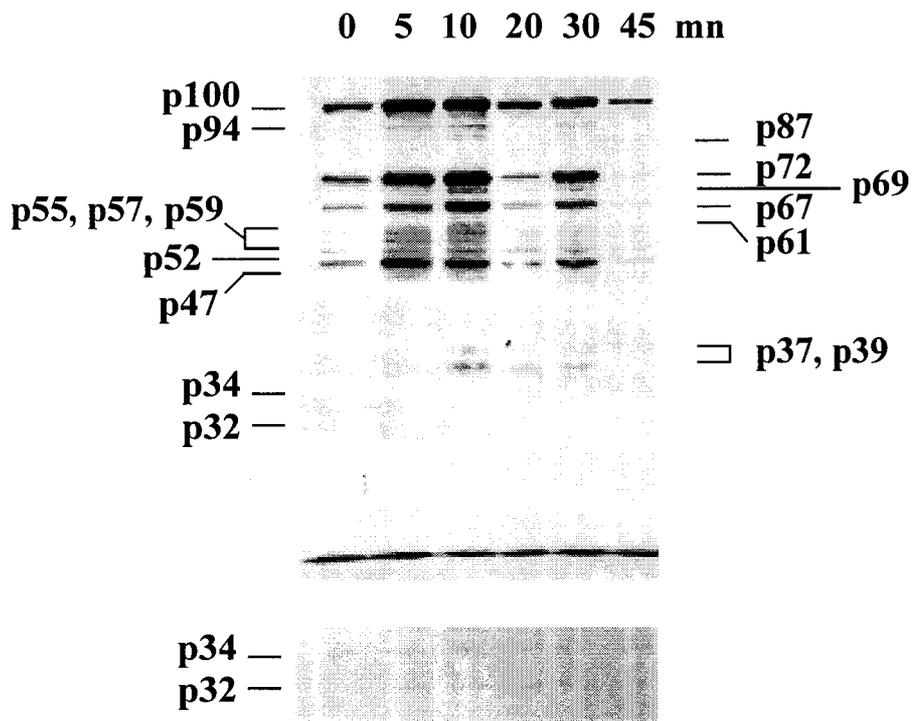


Figure 19 : Induction de la phosphorylation sur les résidus tyrosine de protéines cytosoliques par la lactoferrine.

Les cellules Jurkat (1×10^6) sont incubées aux temps indiqués avec $10 \mu\text{g/ml}$ de lactoferrine. Après lyse des cellules, les protéines sont séparées par SDS-PAGE et détectées par immunorévélation à l'aide d'anticorps monoclonal anti-P-Tyr. Cette expérience a été réalisée trois fois. Nous montrons le résultat le plus représentatif, ainsi que la surexposition de la partie basse de la nitrocellulose.

3- Activation de la MAP Kinase

Le grand nombre de protéines phosphorylées, suite au traitement des cellules par la lactoferrine, nous a amené à étudier l'activation de l'enzyme MAP Kinase. En effet, cette protéine est une enzyme clé des signaux de transduction induits par de nombreux récepteurs, notamment lors des processus de différenciation et de prolifération cellulaires. La MAP Kinase possède deux isoformes, p44^{Erk1} et p42^{Erk2} (Boulton *et al.*, 1991), et elle est activée par phosphorylation sur ses résidus Tyr²⁰² et Thr²⁴⁰ (Seger *et al.*, 1991). Afin de regarder l'effet de la lactoferrine sur cette enzyme nous avons étudié, d'une part, son activité, c'est-à-dire sa capacité à phosphoryler la MBP ("Myelin Basic Protein") qui est un de ses substrats spécifiques et, d'autre part, sa phosphorylation à l'aide d'anticorps dirigés contre les résidus Tyr²⁰² et Thr²⁴⁰ phosphorylés.

3.1- Stimulation de l'activité MAP Kinase

Pour l'analyse de l'activité MAP Kinase, nous avons utilisé trois méthodes complémentaires basées sur l'incorporation *in vitro* de ³²P-PO₄ sur un substrat exogène qui est la MBP.

La première méthode consiste à fractionner le lysat cellulaire sur colonne de DEAE-Sephrose et à éluer la MAP Kinase par un tampon contenant 0,22 M de NaCl. Nous avons vérifié la présence de l'enzyme en séparant les protéines de chaque fraction obtenue après chromatographie, par SDS-PAGE, suivie d'un transfert sur membrane de nitrocellulose (figure 20, page 85). Par révélation de la membrane au rouge Ponceau, on observe que le lavage à 0,02 M en NaCl permet le décrochage de nombreuses protéines de la colonne, alors que la fraction obtenue par élution à 0,22 M en NaCl ne contient que quatre protéines, dont une de masse 42 kDa (figure 20A). L'immunorévélation de la membrane par un anticorps polyclonal anti-MAP Kinase confirme la présence des deux isoformes Erk1 et Erk2 dans les fractions éluées par des tampons contenant 0,22 et 1 M de NaCl. La fraction éluee à 0,22 M de NaCl contient en fait 50 % des Erk2 totales et 75 % des Erk1 totales (figure 20B). Pour des raisons de concentration en sels, seule la fraction contenant 0,22 M de NaCl est utilisée pour réaliser le test de l'activité enzymatique. Ces résultats nous indiquent également que les deux

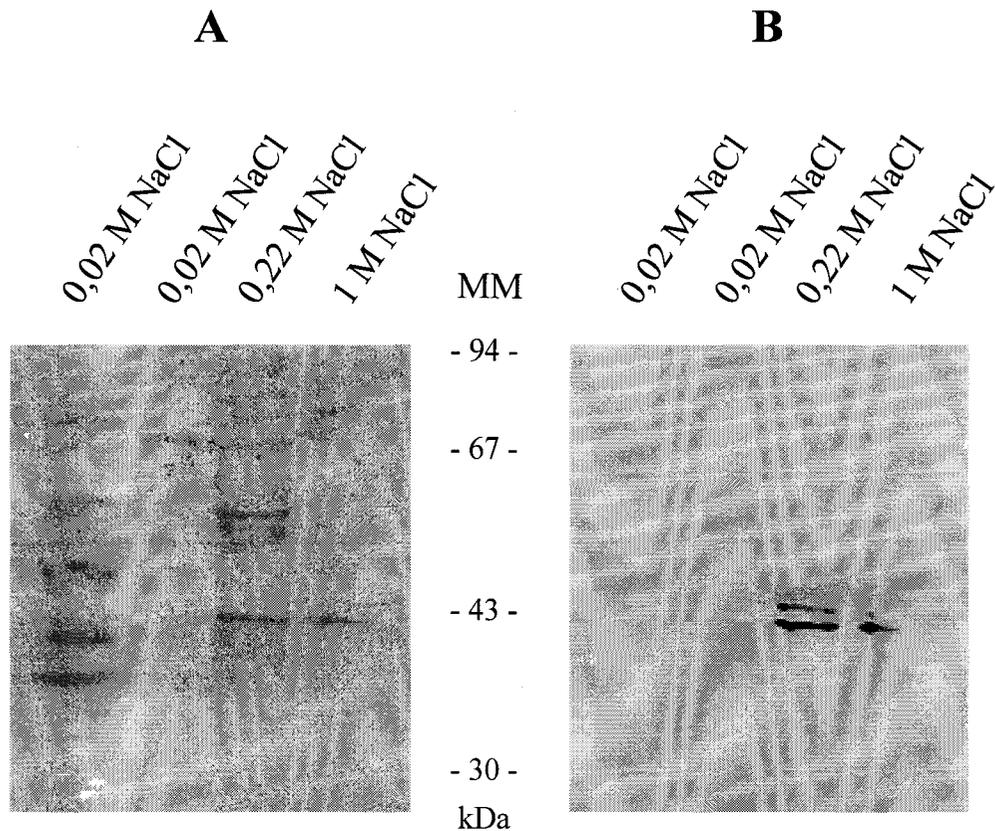


Figure 20 : Fractionnement d'un lysat cellulaire par la méthode des mini-colonnes.

Après dépôt des extraits cytosoliques sur colonne de DEAE Sepharose, les différentes fractions sont éluées successivement par 0,75 ml puis 1 ml de tampon A + 0,02 M NaCl, 0,75 ml de tampon A + 0,22 M NaCl puis 1 ml de tampon A + 1 M NaCl. Les protéines de chaque fraction sont ensuite précipitées à l'ATCA, séparées par SDS-PAGE, transférées sur nitrocellulose, puis révélées au Rouge Ponceau (A) ou immunorévlées à l'aide d'un anticorps polyclonal anti-MAP Kinase (B).

isoformes de la MAP Kinase sont bien présentes dans les cellules Jurkat, Erk1 étant plus fortement exprimé que Erk2.

Une aliquote de cette fraction, enrichie en enzyme MAP Kinase, est ensuite incubée en présence d' $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ et de MBP, déposée sur papier phosphocellulose, et la radioactivité incorporée sur le substrat est quantifiée au compteur β . Cette expérience est réalisée sur le lysat de cellules traitées pendant des périodes de temps variant de 0 à 15 mn par différentes concentrations en lactoferrine (0 à 100 $\mu\text{g/ml}$). La figure 21 (page 87) présente une phosphorylation de la MBP qui varie selon le temps d'incubation et la concentration en lactoferrine. On observe en effet que l'activité kinase n'est pas affectée par de faible (1 $\mu\text{g/ml}$) et forte (100 $\mu\text{g/ml}$) concentrations en lactoferrine, alors que 10 $\mu\text{g/ml}$ de lactoferrine augmentent considérablement la phosphorylation du substrat. Cet effet atteint un maximum après 10 mn de traitement avec un taux d'induction de 4-5, et diminue rapidement pour revenir au niveau d'activation initial après 15 mn.

Afin de vérifier que cette activité kinase est bien due à la MAP Kinase, nous avons utilisé deux autres techniques, en faisant une cinétique d'activation des cellules (de 0 à 15 mn) avec la concentration optimale en lactoferrine de 10 $\mu\text{g/ml}$. Une de ces techniques consiste à immunoprécipiter l'enzyme à l'aide d'un anticorps polyclonal anti-MAP Kinase. Le complexe est alors incubé avec de l' $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ et de la MBP, soumis à un SDS-PAGE, puis la MBP phosphorylée est détectée par autoradiographie (figure 22, page 88). La cinétique de phosphorylation de la MBP obtenue lors de cette expérience est identique à celle observée précédemment : augmentation jusqu'à 10 mn puis retour vers le niveau de base dès 15 mn d'incubation. La quantification de l'incorporation de PO_4 sur le substrat indique que l'activité MAP Kinase envers la MBP est stimulée pour atteindre un taux d'induction de 2 après 10 mn de traitement par 10 $\mu\text{g/ml}$ de lactoferrine.

L'autre méthode consiste à séparer les protéines du lysat cellulaire sur un gel de polyacrylamide contenant de la MBP, répartie de façon homogène dans le gel. Après migration, le gel est incubé avec de l' $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, séché et soumis à autoradiographie. Cette technique permet de visualiser la MBP phosphorylée à l'endroit où la kinase a migré dans le gel, permettant ainsi de déterminer la masse de la kinase impliquée. La figure 23 (page 89) nous révèle l'existence de deux activités kinases sur la MBP, migrant comme des protéines de 44 et 94 kDa. L'enzyme de masse 94 kDa ne varie pas sous l'influence de la lactoferrine, alors que celle de 44 kDa est stimulée. Cette activité augmente pour atteindre un maximum à 10 mn avec un taux d'induction d'environ 3,5, et revient vers un niveau basal dès 15 mn de traitement

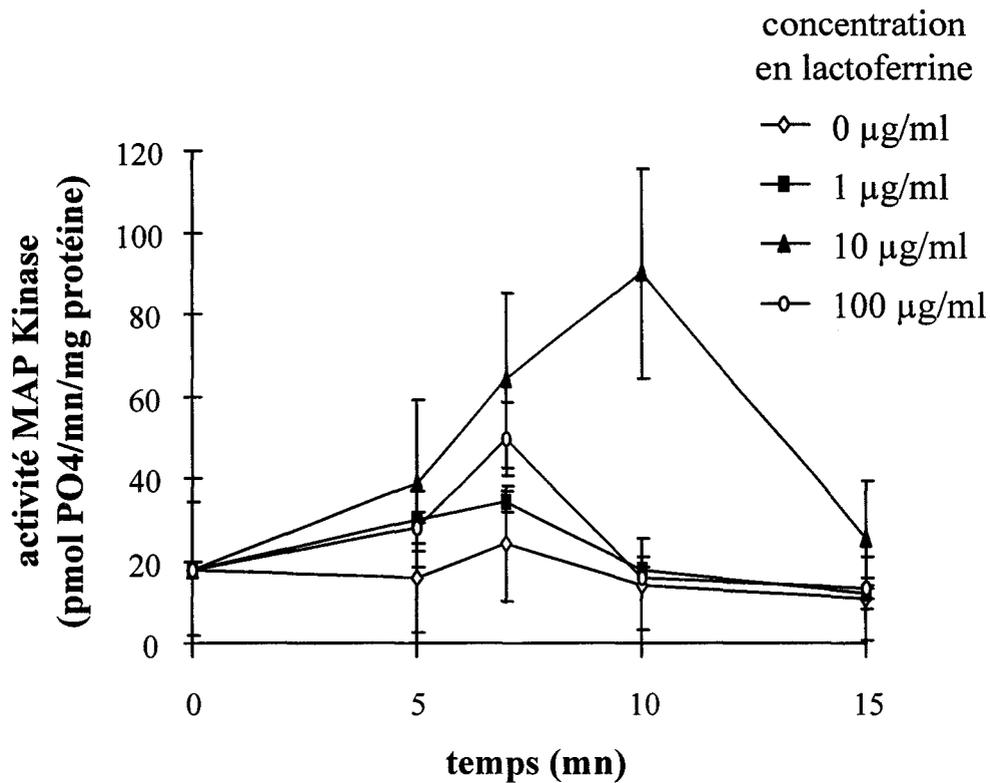


Figure 21 : Activation de l'enzyme MAP Kinase: phosphorylation d'un substrat exogène par la méthode des mini-colonnes.

Les cellules Jurkat (8×10^6) sont incubées en présence de lactoferrine (de 0 à 100 $\mu\text{g/ml}$) pendant des périodes de temps différentes (de 0 à 15 mn), puis lysées. L'activité MAP Kinase est déterminée sur la fraction MAP Kinase purifiée sur DEAE Sepharose par incorporation de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ sur la MBP. Nous présentons les moyennes obtenues pour trois expériences réalisées en double exemplaire.

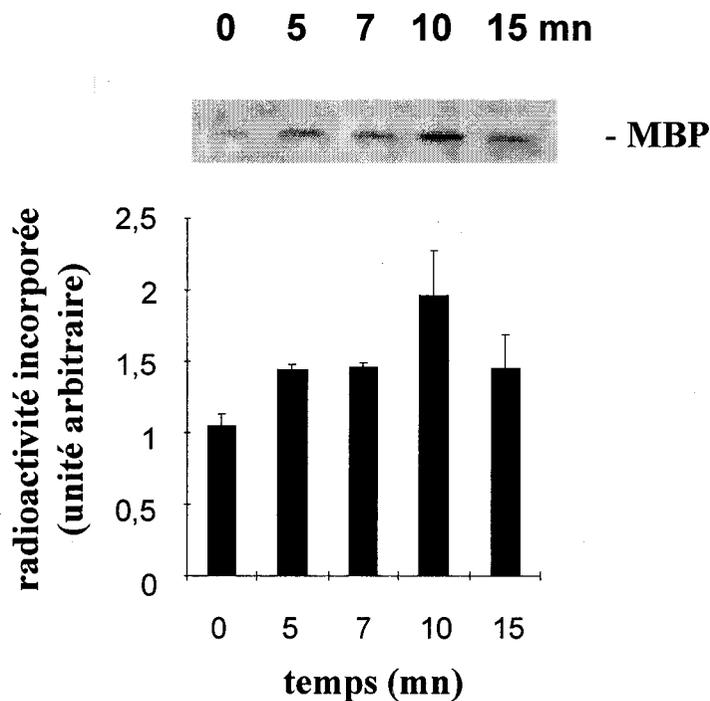


Figure 22 : Activation de l'enzyme MAP Kinase: immunoprécipitation par un anticorps anti-MAP Kinase.

Après traitement des cellules Jurkat (4×10^6) aux temps indiqués, la MAP Kinase est immunoprécipitée du lysat total par un anticorps polyclonal. Le complexe est incubé avec de la MBP et du $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, soumis à un SDS-PAGE, et le gel est ensuite analysé par autoradiographie. *En haut*, incorporation de ^{32}P sur la MBP comme substrat ; *le graphe* indique la quantification de la radioactivité incorporée et exprime la moyenne de deux expériences.

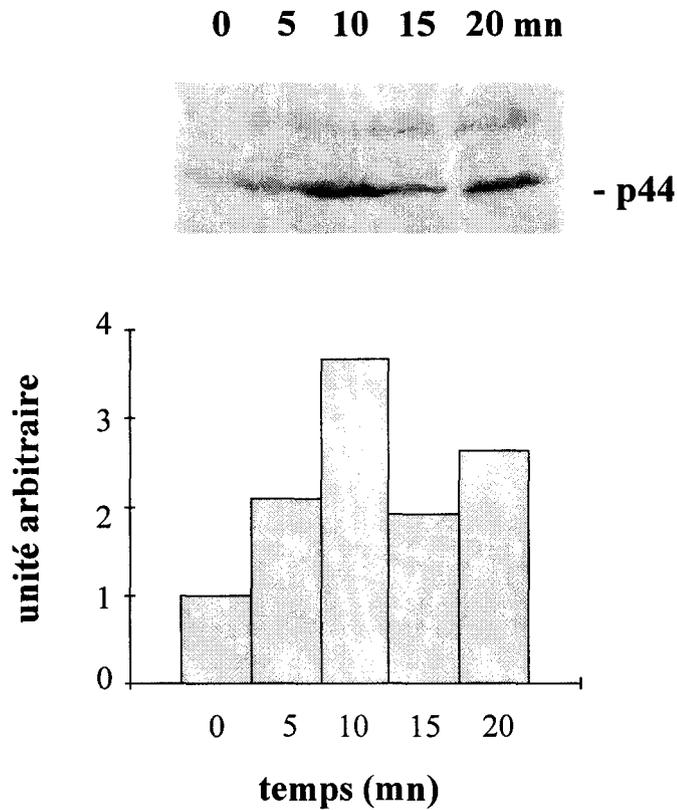


Figure 23 : Activation de l'enzyme MAP Kinase: phosphorylation d'un substrat exogène en gel de polyacrylamide.

Le lysat de cellules Jurkat (9×10^6) traitées avec $10 \mu\text{g/ml}$ de lactoferrine est déposé sur gel de polyacrylamide contenant de la MBP. Après SDS-PAGE, le gel est incubé avec du $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, séché et soumis à une autoradiographie. *En haut*, le gel montre l'incorporation de ^{32}P sur la protéine p44 ; et *le graphe* représente la quantification de la radioactivité incorporée dans cette protéine.

par la lactoferrine. Ces résultats indiquent qu'une seule isoforme de la MAP Kinase est activée sous l'action de la lactoferrine, mais ne permettent pas de déterminer avec précision la masse de cette isoforme.

En conclusion, ces trois expériences différentes montrent que l'activité MAP Kinase dans les cellules Jurkat est affectée en présence de lactoferrine dans le milieu d'incubation. Cet effet varie selon le temps d'incubation et la concentration en lactoferrine, et il est optimal après 10 mn de traitement des cellules par 10 µg/ml de lactoferrine. Par ailleurs, les deux isoformes de la MAP Kinase sont bien présentes dans le lysat cellulaire, mais une seule semble être activée par la lactoferrine.

3.2- Stimulation de la phosphorylation de la MAP Kinase

L'étude de la phosphorylation des isoformes de la MAP Kinase est réalisée en utilisant les conditions optimales de traitement des cellules par la lactoferrine: 10 mn à une concentration de 10 µg/ml. Après séparation des protéines par SDS-PAGE, les deux isoformes sont détectées par immunorévélation à l'aide d'un anticorps polyclonal anti-MAP Kinase ou d'un anticorps monoclonal anti-P-Erk (figure 24, page 91).

La détection des isoformes par l'anticorps anti-MAP Kinase nous a permis de vérifier que le niveau d'expression de Erk1 et Erk2 ne varie pas au cours de la cinétique d'activation des cellules Jurkat par la lactoferrine. De plus, on retrouve les résultats précédemment observés concernant l'expression plus élevée de Erk2 par rapport à Erk1 (figure 24, piste 1). De la même manière, l'immunorévélation par l'anticorps anti-P-Erk montre que l'isoforme Erk2 est plus phosphorylée que Erk1 (1,8 fois plus) dans les cellules non traitées (figure 24, piste 2). La stimulation des cellules lymphocytaires par l'anticorps anti-CD3 étant connue pour provoquer l'activation de la voie MAP Kinase, nous l'avons utilisé comme témoin positif pour cette expérience. La piste 4 de la figure 24 nous indique que le traitement des cellules par l'anti-CD3 induit une augmentation considérable et identique de la phosphorylation des deux isoformes, avec un taux d'induction s'élevant à 6. Dans le cas de la lactoferrine, seule la phosphorylation de l'isoforme Erk2 est augmentée, et Erk2 est alors 2,2 fois plus phosphorylé que dans les cellules non traitées (figure 24, piste 3).

Les résultats obtenus par cette expérience indiquent que la lactoferrine induit la phosphorylation de la MAP Kinase après 10 mn de traitement, permettant ainsi de corrélérer l'activation de l'enzyme à sa phosphorylation. D'autre part, l'hypothèse concernant l'activation

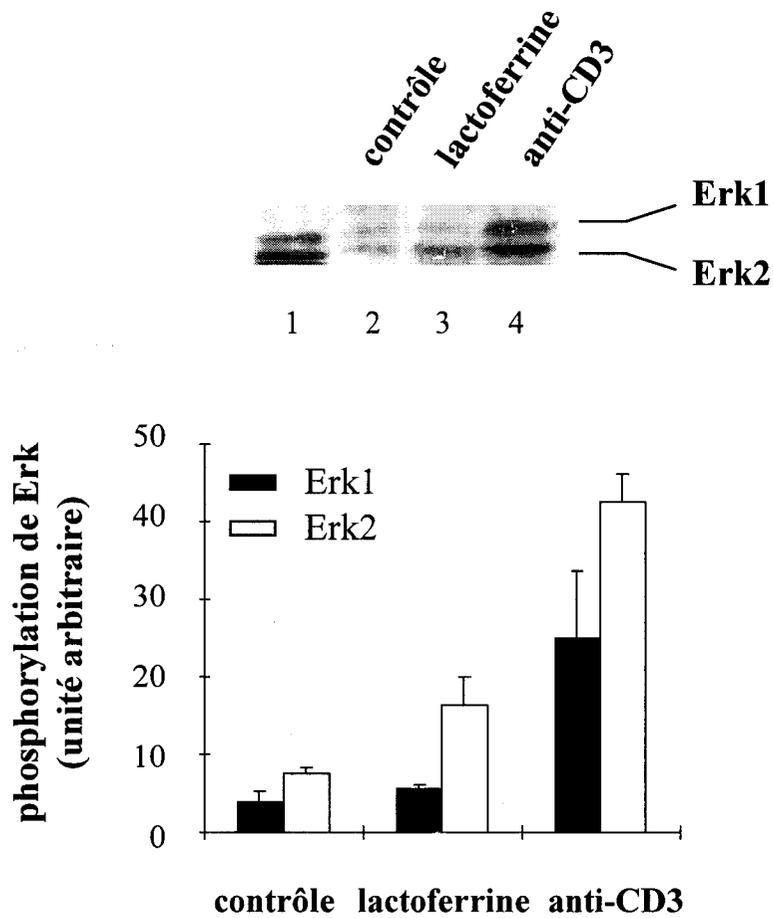


Figure 24 : Phosphorylation des isoformes de la MAP Kinase par la lactoferrine.

Les cellules Jurkat (8×10^6) sont incubées ou non pendant 10 mn avec 10 $\mu\text{g/ml}$ de lactoferrine ou 0,1 $\mu\text{g/ml}$ d'anti-CD3. Après la lyse cellulaire, les protéines sont séparées par SDS-PAGE et détectées par un anticorps polyclonal anti-MAP Kinase (piste1) ou anti P-Erk (piste 2 à 4). *En haut*, le résultat le plus représentatif est montré, et *le graphe* exprime la moyenne de deux expériences distinctes.

d'une seule isoforme est confirmée, puisque nous avons montré que seule la phosphorylation de l'isoforme Erk2 est augmentée sous l'action de la lactoferrine.

4- Implication de la MAP Kinase dans la régulation du CD4

La phosphorylation sur les résidus tyrosine (maximum entre 5 et 10 mn), l'activation de la MAP Kinase (10 mn) et la régulation de l'antigène de surface CD4 (48 h) sont dépendantes de la concentration en lactoferrine, et présentent une réponse optimale pour une même concentration de 10 µg/ml. Afin de corréliser ces trois événements, nous avons étudié l'effet de deux inhibiteurs sur l'activité MAP Kinase et/ou la régulation du CD4 : la génistéine qui est un inhibiteur des tyrosine kinases (Akiyama *et al.*, 1987), et le PD98059 qui inhibe plus spécifiquement l'activation de la MAP Kinase par la MAP Kinase Kinase (Dudley *et al.*, 1995) (figure 17, page 78).

4.1- Cytotoxicité des inhibiteurs

Dans un premier temps, nous avons étudié la cytotoxicité des inhibiteurs en incubant les cellules Jurkat en présence de concentrations croissantes d'inhibiteurs (de 0 à 100 µM) pendant 48 h, période de temps pour laquelle l'expression du CD4 est optimale. Les cellules sont ensuite marquées à l'iodure de propidium, et la viabilité cellulaire est mesurée au cytofluorimètre en flux (figure 25, page 93). Les inhibiteurs étant dilués dans du DMSO (diméthyl sulfoxyde), un contrôle est effectué en incubant les cellules pendant 48 h avec une quantité de DMSO correspondant à celle présente dans les échantillons d'inhibiteurs.

Le PD98059, qui est un inhibiteur spécifique de la cascade MAP Kinase, n'affecte aucunement la viabilité cellulaire, quelle que soit sa concentration (de 0 à 100 µM). Par contre, la génistéine, inhibiteur des tyrosine kinases qui régulent de nombreux processus cellulaires, présente un effet cytotoxique vis-à-vis des cellules Jurkat. Cet effet dépend de la concentration en génistéine : la viabilité cellulaire reste maximale pour des concentrations inférieures à 15 µM, puis diminue rapidement pour atteindre 20 % de viabilité à des concentrations de 80 et 100 µM en inhibiteur.

Cette expérience montre que le PD98059 ne présente aucune cytotoxicité pour les cellules Jurkat, alors que la génistéine est toxique pour les cellules à des concentrations

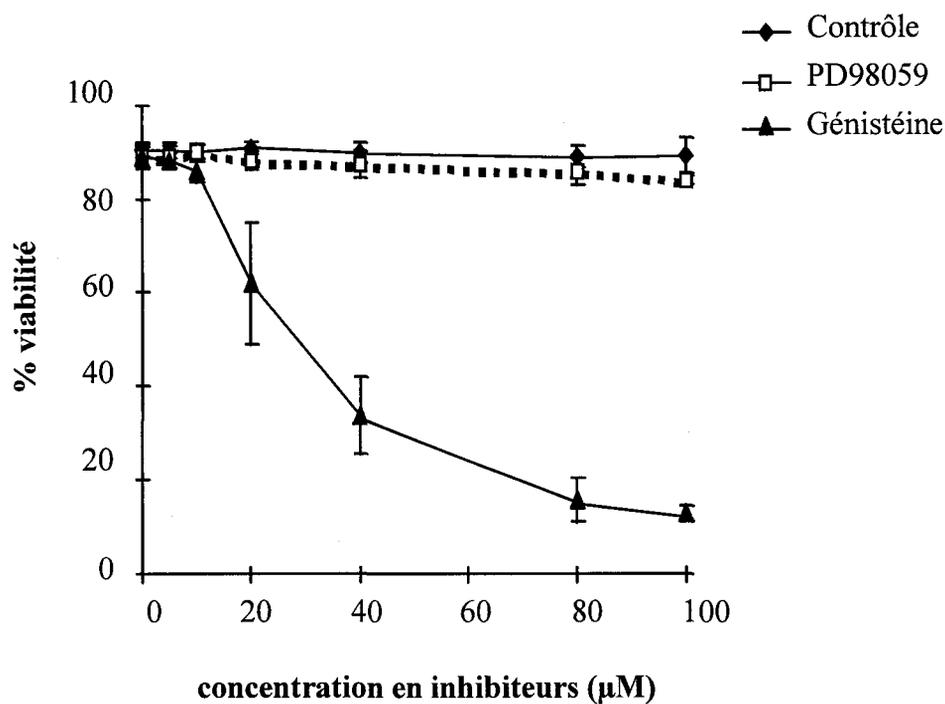


Figure 25 : Effet de la génistéine et du PD98059 sur la viabilité cellulaire.

Les cellules sont traitées pendant 48 h avec des concentrations de génistéine ou de PD98059 variant de 0 à 100 µM. La viabilité des cellules est mesurée au cytofluorimètre en flux en marquant les cellules à l'iodure de propidium. Les résultats expriment la moyenne de trois (PD98059) ou quatre (génistéine) expériences distinctes.

supérieures à 30 μM , concentrations pour lesquelles la viabilité cellulaire est inférieure à 50 %. Pour l'étude de l'effet des inhibiteurs, nous allons donc utiliser des concentrations en inhibiteurs inférieures à 15 μM .

4.2- Effet des inhibiteurs sur la régulation du CD4

Les cellules sont préincubées avec les inhibiteurs génistéine et PD98059 à des concentrations variant de 5 à 10 μM pendant 45 mn, traitées par 10 $\mu\text{g/ml}$ de lactoferrine pendant 48 h puis analysées au cytofluorimètre en flux pour visualiser les antigènes de surface CD4. Nous ne présentons ici que les résultats observés pour des concentrations de 10 μM en inhibiteurs, concentration à laquelle la réponse inhibitrice est optimale (figure 26, page 95).

La figure 26A illustre l'effet de la génistéine sur la fluorescence des cellules lors de la détection des antigènes de surface CD4. L'incubation des cellules avec la génistéine (moyenne de fluorescence de 364) déplace le pic de fluorescence dû à la présence de lactoferrine (moyenne de fluorescence de 406) vers le pic obtenu pour les cellules non traitées (moyenne de fluorescence de 379), démontrant ainsi que la génistéine annule l'effet de la lactoferrine. La quantification de la densité du CD4 en surface, réalisée sur plusieurs expériences (figure 26B), montre en effet que l'augmentation de l'expression du CD4 induite par la lactoferrine est inhibée à 77 % par la génistéine. Dans les mêmes conditions, le PD98059 inhibe complètement la surexpression du CD4 par la lactoferrine.

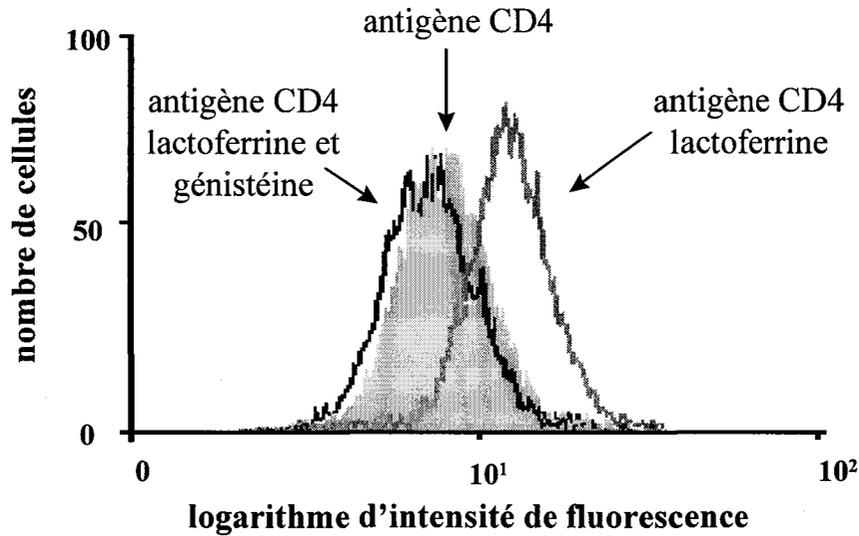
Ces résultats indiquent que l'effet de la lactoferrine sur l'expression du CD4 est inhibé à la fois par la génistéine et le PD98059, suggérant que les tyrosine kinases ainsi que la MAP Kinase sont impliquées dans la régulation de l'expression de l'antigène de surface CD4.

4.3- Effet de la génistéine sur l'activité MAP Kinase

Les cellules Jurkat sont prétraitées en présence de différentes concentrations de génistéine (de 0 à 10 μM) pendant 45 mn, puis incubées avec la lactoferrine pendant 10 mn, avant de tester l'activité MAP Kinase par la méthode du fractionnement cellulaire (figure 27, page 96).

L'action de la génistéine sur l'activation de la MAP Kinase induite par la lactoferrine est variable selon sa concentration. Alors que l'effet de la lactoferrine sur l'activité enzymatique

A



B

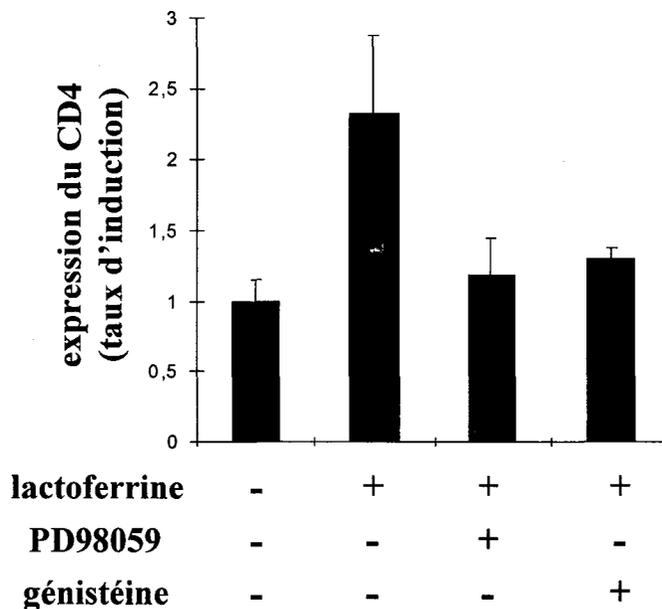


Figure 26 : Effet des inhibiteurs génistéine et PD98059 sur la régulation de la densité de surface de l'antigène CD4 par la lactoferrine.

Les cellules Jurkat (2×10^5) sont prétraitées avec la génistéine (A,B) ou le PD98059 (B) à une concentration de $10 \mu\text{M}$ pendant 45 mn, puis cultivées avec $10 \mu\text{g/ml}$ de lactoferrine pendant 48 h. L'antigène CD4 est détecté par cytofluorimétrie en flux, et les résultats sont exprimés: (A) en variations de logarithme d'intensité de fluorescence : *pic gris plein*, antigène CD4 sur les cellules non traitées ; *pic gris*, antigène CD4 sur les cellules traitées à la lactoferrine ; *pic noir*, antigène CD4 sur les cellules prétraitées à la génistéine puis traitées à la lactoferrine; (B) en taux d'induction par rapport au contrôle, avec expression de la moyenne de trois expériences distinctes ($P < 0.05$, Student's *t*-test).

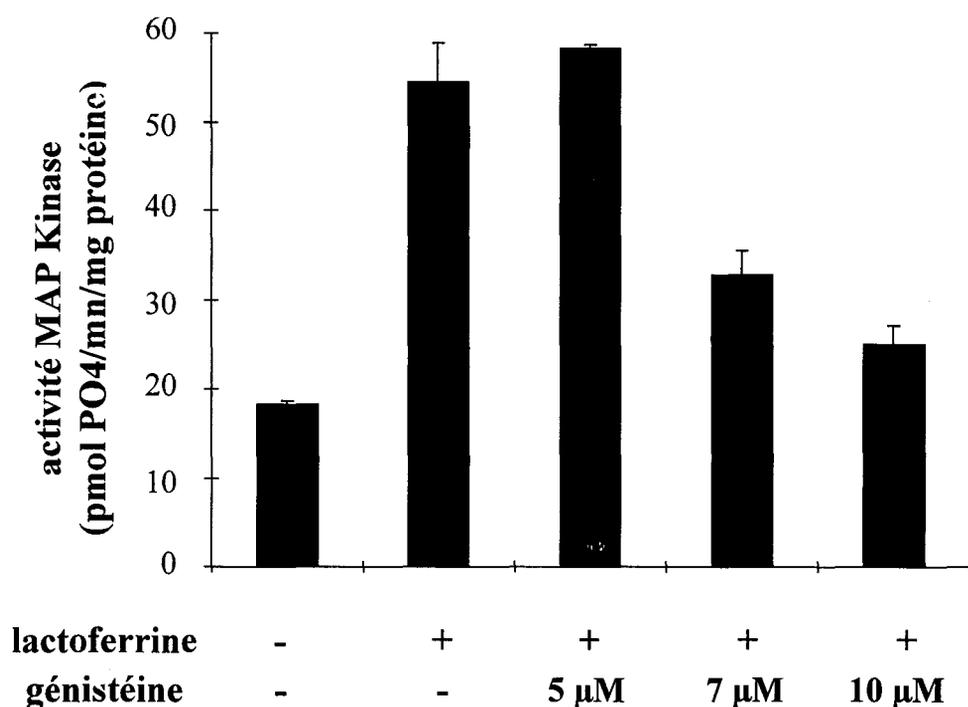


Figure 27 : Effet de l'inhibiteur génistéine sur l'activité MAP Kinase.

Après prétraitement des cellules Jurkat (8×10^6) avec différentes concentrations en génistéine (de 0 à 10 μ M) pendant 45 mn, 10 μ g/ml de lactoferrine sont ajoutés pendant 10 mn, et l'activité MAP Kinase est mesurée par la méthode des mini-colonnes. Les résultats expriment la moyenne de deux expériences réalisées en double.

n'est pas affecté par 5 μM de génistéine, il est plus ou moins inhibé par des concentrations en génistéine de 7 ou 10 μM . La réponse inhibitrice maximale est obtenue pour 10 μM de génistéine qui provoque une inhibition de 82 % de la stimulation de la MAP Kinase par la lactoferrine.

Nous avons donc démontré que l'effet de la lactoferrine sur l'enzyme MAP Kinase est inhibé de façon optimale par 10 μM de génistéine, suggérant l'implication des tyrosine kinases dans le processus d'activation de cette enzyme par la lactoferrine.

L'ensemble des résultats obtenus lors de l'étude de l'action des inhibiteurs sur l'activation de la MAP Kinase et la régulation du CD4 induites par la lactoferrine nous permet d'établir la séquence des événements aboutissant à l'expression du CD4 : les tyrosine kinases semblent être impliquées dans l'activation de la MAP Kinase, qui semble à son tour intervenir dans la régulation de la densité de surface du CD4.

5- Implication de la protéine p56^{lck}

Nous nous sommes également intéressés à une protéine tyrosine kinase spécifique des lymphocytes qui est la kinase Lck, appelée aussi p56^{lck}. Cette protéine est associée à la partie cytoplasmique de nombreux récepteurs membranaires, et elle est capable d'agir sur de nombreux substrats, parmi lesquels se trouve la MAP Kinase (Anderson *et al.*, 1994 pour revue générale). Afin d'étudier le rôle de la protéine Lck dans la régulation du CD4 et l'activation de la MAP Kinase induites par la lactoferrine, nous avons utilisé la lignée cellulaire J.CaM1.6. Ces cellules sont des cellules mutantes dérivées de la lignée Jurkat, dans lesquelles l'expression de la kinase p56^{lck} est défectueuse (Straus et Weiss, 1992).

5.1- Fixation de la lactoferrine à la surface des cellules Jurkat et J.CaM1.6

Dans un premier temps nous avons effectué une étude comparative de la fixation de la lactoferrine à la surface des cellules Jurkat et J.CaM1.6, en incubant les cellules en présence de différentes concentrations (de 0 à 40 $\mu\text{g/ml}$) de lactoferrine marquée à la fluorescéine

(HyF). Les cellules sont ensuite analysées au cytofluorimètre en flux, et la fixation spécifique est calculée en incubant les cellules avec un excès de ligand non marqué (figure 28, page 99).

On observe une fixation spécifique de la lactoferrine identique pour les deux types cellulaires. La fixation de la protéine est dépendante de la concentration : la lactoferrine se fixe à la surface des cellules dès 5 µg/ml, et atteint un plateau apparent à 20 µg/ml. Cette méthode ne permet pas de déterminer avec précision les paramètres de fixation, mais nous pouvons évaluer la constante de dissociation K_d de l'ordre de 60 nM. Cette valeur est en accord avec celle obtenue pour les cellules Jurkat ($K_d = 70$ nM) par la méthode de Scatchard avec la lactoferrine radiomarquée à l' ^{125}I (Legrand *et al.*, 1997).

Ces résultats nous permettent de vérifier que la fixation de la lactoferrine est spécifique et saturable à la surface des cellules J.CaM1.6, avec une constante de dissociation apparemment similaire à celle déterminée pour les cellules Jurkat.

5.2- Effet de la lactoferrine sur la régulation du CD4 à la surface des J.CaM1.6

L'effet de la lactoferrine sur la régulation du CD4 en surface est étudié sur les cellules J.CaM1.6, en incubant les cellules avec un anticorps anti-CD4 puis un anticorps marqué au FITC, et en les analysant au cytofluorimètre en flux (figure 29, page 100).

Le pic de fluorescence obtenu avec l'anticorps anti-CD4 pour les cellules non traitées (moyenne de fluorescence de 359) est similaire à celui détecté avec l'anticorps isotype contrôle IgG1 (moyenne de fluorescence de 354), démontrant que les cellules mutantes J.CaM1.6 ne présentent pas de densité basale d'antigène CD4. Nous avons également regardé l'effet de la forskoline, connue pour réguler la transcription du gène du CD4, et il s'avère que l'expression du CD4 n'est pas augmentée en présence de 10 µM de forskoline (moyenne de fluorescence de 353). De la même manière, la lactoferrine, à la concentration optimale de 10 µg/ml, n'affecte pas la régulation du marqueur de surface (moyenne de fluorescence de 356).

Nous pouvons conclure que, contrairement aux cellules Jurkat, les cellules mutantes J.CaM1.6 ne présentent pas d'antigène CD4 à leur surface. De plus, la lactoferrine est incapable de stimuler l'expression de ce marqueur dans ces cellules défectueuses en $p56^{\text{lck}}$,

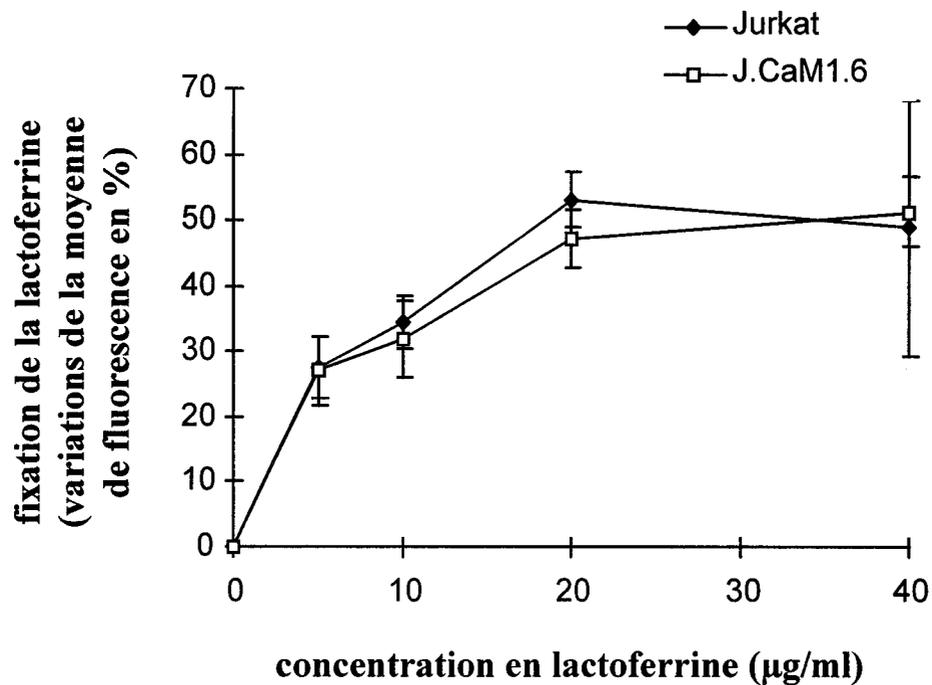


Figure 28 : Fixation comparative de la lactoferrine sur les Jurkat et les J.CaM1.6.

Les cellules Jurkat et J.CaM1.6 (3×10^5) sont incubées avec la lactoferrine marquée à la fluorescéine (concentrations variant de 0 à 40 µg/ml) et analysées par cytofluorimétrie en flux. La fixation spécifique est calculée en présence de 100 excès molaire de lactoferrine non marquée. Les résultats expriment la moyenne de deux expériences distinctes réalisées en double.

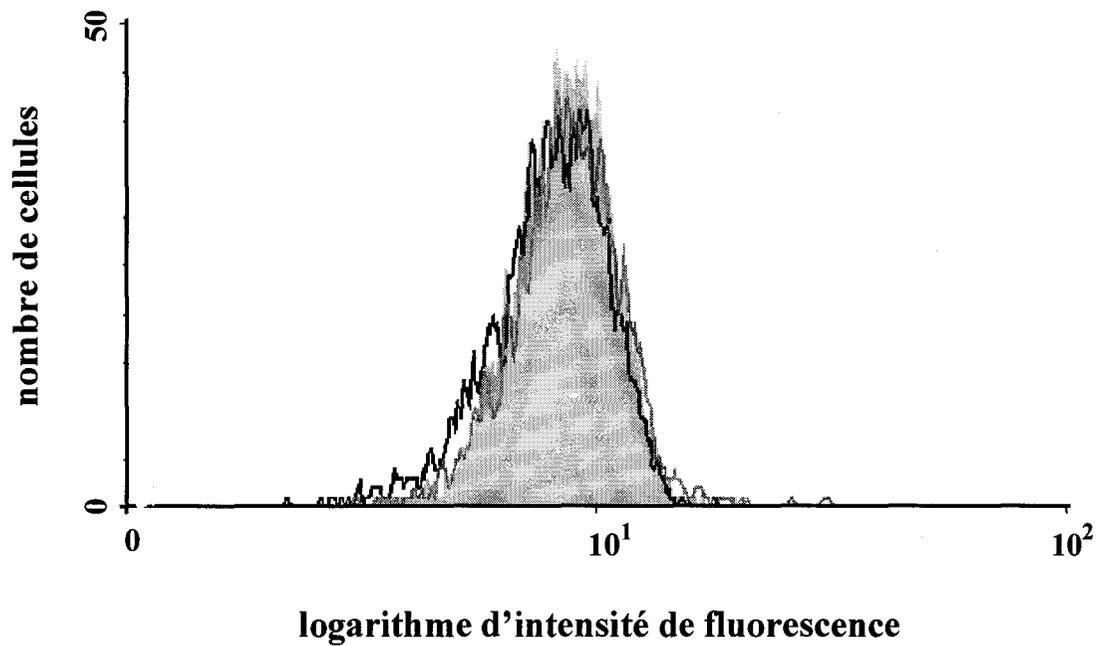


Figure 29 : Régulation de la densité du CD4 à la surface des J.CaM1.6 par la lactoferrine.

Les cellules J.CaM1.6 (2×10^5) sont traitées ou non avec $10 \mu\text{g/ml}$ de lactoferrine pendant 48 h, et l'antigène de surface CD4 est détecté au cytofluorimètre en flux. Les résultats sont exprimés en variations de logarithme d'intensité de fluorescence: *pic gris plein*, isotype contrôle ; *pic noir*, antigène CD4 sur les cellules non traitées ; *pic gris*, antigène CD4 sur les cellules traitées.

suggérant que la protéine Lck est nécessaire à la régulation de la densité de surface du CD4 en réponse à la lactoferrine.

5.3- Effet de la lactoferrine sur l'activité MAP Kinase des J.CaM1.6

Le rôle de la protéine Lck dans la stimulation de la MAP Kinase par la lactoferrine est analysé en incubant les cellules Jurkat ou J.CaM1.6 pendant 10 mn en présence de 10 µg/ml de lactoferrine ou 10 µM de forskoline. Les lysats cellulaires sont ensuite fractionnés sur colonne de DEAE-Sepharose pour tester l'activité MAP Kinase (figure 30, page 102).

Le graphe nous montre que l'activité de base de l'enzyme MAP Kinase est beaucoup plus faible dans les cellules mutantes que dans les cellules Jurkat. La forskoline, utilisée comme témoin positif, n'affecte pas l'activité MAP Kinase des cellules J.CaM1.6, alors qu'elle augmente considérablement celle des cellules Jurkat (13,5 fois). Dans le cas de la lactoferrine, la stimulation de l'enzyme est très insignifiante dans les cellules J.CaM1.6 par comparaison au taux d'induction obtenu (6,7) pour les cellules Jurkat.

L'absence d'effet de la lactoferrine sur l'activité MAP Kinase des cellules mutantes J.CaM1.6 indique que p56^{lck} est également impliquée dans la cascade d'activation de cette enzyme induite par la lactoferrine.

Les résultats obtenus pour les différentes expériences réalisées sur les cellules déficientes en protéine Lck nous permettent de suggérer que p56^{lck} fait partie des protéines tyrosine kinases qui interviennent dans l'activation de la MAP Kinase, elle-même impliquée dans la régulation du CD4 en réponse au traitement des cellules à la lactoferrine.

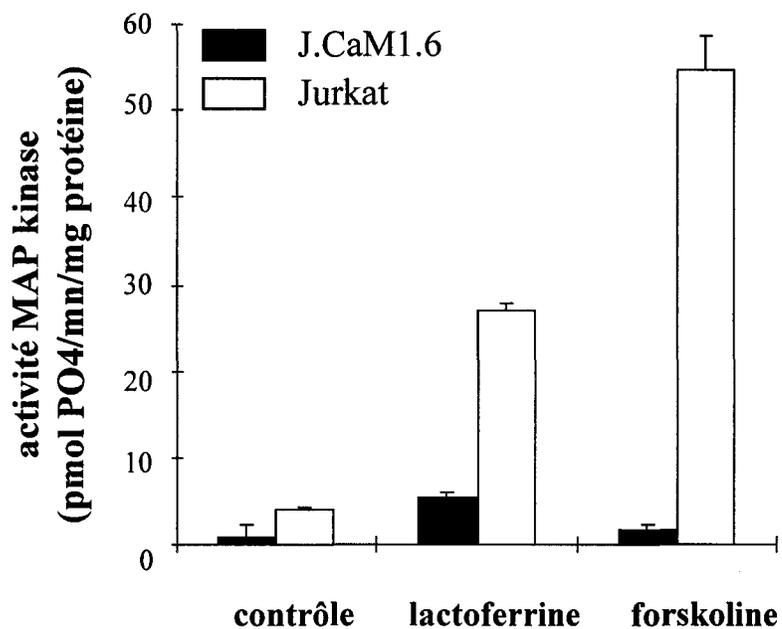


Figure 30 : Effet de la lactoferrine sur l'activité MAP Kinase dans les lignées cellulaires Jurkat et J.CaM1.6.

Les cellules Jurkat et J.CaM1.6 sont traitées ou non avec la lactoferrine (10 μ g/ml) ou la forskoline (10 μ M) pendant 10 mn. L'activité de la MAP Kinase est ensuite analysée par la méthode des mini-colonnes. Les résultats expriment la moyenne de deux expériences réalisées en double.

III- DISCUSSION

Les résultats obtenus dans ce deuxième paragraphe ont permis d'élucider une partie du mécanisme d'action de la lactoferrine lors du processus de régulation du CD4 dans la maturation des cellules Jurkat. Nous avons montré que la fixation de la lactoferrine sur les cellules induit un ou plusieurs signaux de transduction faisant intervenir des protéines kinases, telles que la p56^{lck} et la MAP Kinase, qui contrôlent l'expression de l'antigène de surface CD4.

Les premières étapes du signal de transduction ont été étudiées, en particulier les flux calciques et la phosphorylation des protéines qui sont des messagers intracellulaires fondamentaux impliqués dans les processus de signalisation. L'analyse des flux calciques induits par la lactoferrine, par comparaison avec ceux induits par l'anti-CD3, suggère que la lactoferrine ne stimule pas directement la phospholipase C, et par conséquent qu'elle n'active ni la voie des phospho-inositides ni la voie dépendante du calcium. Par ailleurs, nous avons montré que la lactoferrine stimule une cascade de phosphorylation sur les résidus tyrosine de nombreuses protéines cytosoliques, atteignant des maximums après 5, 10 ou 20 mn de traitement selon les protéines. Le grand nombre de substrats rapidement phosphorylés indique que des enzymes tyrosine kinases régulent plusieurs événements précoces du signal de transduction induit par la lactoferrine dans les cellules Jurkat. Le second pic de phosphorylation, de plus faible amplitude, observé après 30 mn de traitement des cellules pourrait être dû à l'activation de la même voie de transduction par la lactoferrine recyclée après endocytose. En effet, il a été montré que la fixation de la lactoferrine aux cellules Jurkat est suivie de l'internalisation du ligand dont 60 à 70 % sont recyclés sous forme intacte dans le milieu de culture après chaque cycle d'endocytose (Bi *et al.*, 1996).

Nous avons également examiné l'activité de la MAP Kinase, une enzyme clé impliquée dans les processus de différenciation et de prolifération. Trois méthodes complémentaires ont démontré que le traitement des cellules par la lactoferrine, dans les conditions optimales de 10 mn à 10 µg/ml, induit une augmentation rapide et transitoire de l'activité MAP Kinase envers la MBP, un de ses substrats spécifiques. Cette enzyme MAP Kinase possède deux isoformes p44^{Erk1} et p42^{Erk2} (Boulton *et al.*, 1991), elles sont présentes dans les cellules Jurkat, comme nous l'a montré l'immunorévélation avec l'anticorps polyclonal anti-MAP Kinase. Une des méthodes citées ci-dessus suggère également qu'une seule isoforme est stimulée par la

lactoferrine, mais elle ne permet pas de l'identifier. Cette isoforme a ensuite été caractérisée lors de l'étude de la phosphorylation de la MAP Kinase. En effet, comme l'activation de Erk1 et Erk2 résulte de la phosphorylation des résidus Tyr²⁰² et Thr²⁰⁴ (Seger *et al.*, 1991), nous avons utilisé un anticorps monoclonal dirigé contre ces motifs phosphorylés pour montrer que seule l'isoforme Erk2 est phosphorylée sous l'action de la lactoferrine. De plus, l'utilisation de la génistéine, qui est un inhibiteur des protéines tyrosine kinases (Akiyama *et al.*, 1987), indique que ces kinases interviennent en amont de l'activation de la MAP Kinase et de l'expression du CD4. Finalement, l'expérience avec le PD98059, qui inhibe spécifiquement la phosphorylation de la MAP Kinase par MEK (Dudley *et al.*, 1995), confirme l'implication de la MAP Kinase dans le signal de transduction induit par la lactoferrine et aboutissant à la régulation du CD4. Ces résultats, concernant l'intervention de l'enzyme MAP Kinase, et plus particulièrement l'isoforme Erk2, dans le processus de maturation des cellules Jurkat, corroborent les données récentes démontrant que cette enzyme joue un rôle crucial dans la sélection positive des thymocytes (Alberola-Ila *et al.*, 1995 ; Sugawara *et al.*, 1998). En effet, Erk2 intervient dans la balance des lignées CD4/CD8 en favorisant la différenciation des cellules immatures en cellules CD4⁺ (Sharp *et al.*, 1997 ; Bommhardt *et al.*, 1999).

Nous avons également identifié une deuxième protéine impliquée dans le signal de transduction induit par la lactoferrine : la p56^{lck}, une protéine kinase exprimée spécifiquement dans les lymphocytes. L'utilisation de la lignée cellulaire J.CaM1.6, une lignée Jurkat mutante défectueuse en protéine Lck (Straus et Weiss, 1992), a montré que la fixation de la lactoferrine sur ces cellules est incapable d'augmenter l'activité MAP Kinase ainsi que la densité de surface du CD4, indiquant l'intervention de la p56^{lck} dans la voie de transduction passant par la MAP Kinase et aboutissant à l'expression du CD4. De plus, l'absence d'effet de la forskoline, un activateur de l'adénylate cyclase connu pour réguler le gène du CD4 (Flamand *et al.*, 1998), sur l'activité kinase et la densité du marqueur de surface dans les cellules J.CaM1.6, suggère que la p56^{lck} n'est pas sélective du signal induit par la lactoferrine, mais qu'elle est généralement requise pour l'expression du CD4. Ces résultats sur l'implication de la kinase Lck dans la maturation des cellules T Jurkat sont en accord avec des études démontrant que cette kinase intervient non seulement dans la signalisation des cellules T, mais aussi dans le développement des thymocytes. En effet, la protéine Lck est bien connue pour être associée aux récepteurs membranaires tels que le CD45, le récepteur de l'interleukine-2, les CD4 ou encore le CD8, et pour agir sur de nombreux substrats dont la MAP Kinase (Anderson *et al.*, 1994 pour revue générale). Indépendamment de cette association avec les

corécepteurs CD4 et CD8, la p56^{lck} peut réguler le développement des thymocytes (Levin *et al.*, 1993) : un modèle de différenciation a été récemment proposé, dans lequel l'activation de la protéine Lck aboutit à la maturation en lignées cellulaires CD4+ (Basson *et al.*, 1998 ; Hernandez-Hoyos *et al.*, 2000).

Les études réalisées dans ces deux premières parties nous permettent d'établir la séquence des événements intracellulaires induits par la lactoferrine dans les cellules Jurkat. La fixation de la lactoferrine sur son récepteur active une cascade de tyrosine kinases après 5-10 mn de traitement, dont la protéine Lck associée au récepteur, puis la sérine/thréonine kinase MAP Kinase après 10 mn. Cette voie de transduction aboutit à la transcription du gène du CD4, et à l'augmentation de la densité du CD4 à la surface des cellules après 48 h d'incubation avec la lactoferrine (figure 31, page 106).

Notre hypothèse sur l'induction d'un signal de transduction par la lactoferrine sur les cellules T Jurkat s'accorde avec l'étude de son internalisation qui montre que la lactoferrine n'est pas importée jusqu'au noyau de ces cellules lymphoblastiques (Bi *et al.*, 1996). Nous proposons donc un mécanisme d'action différent de celui suggéré par He et Furmanski (1995). Ces auteurs ont démontré que la lactoferrine est capable d'interagir spécifiquement avec trois séquences de l'ADN et d'activer le processus de transcription. Cette propriété nécessite la translocation de la lactoferrine dans le noyau des cellules cibles, où elle agirait en tant que facteur de transcription (Baeuerle, 1995). Le mécanisme par lequel la lactoferrine serait envoyée au noyau est loin d'être compris. En effet, il n'existe aucune donnée suggérant qu'un récepteur membranaire puisse transporter la lactoferrine vers le noyau, en empruntant une voie de trafic intracellulaire classique ou nouvelle.

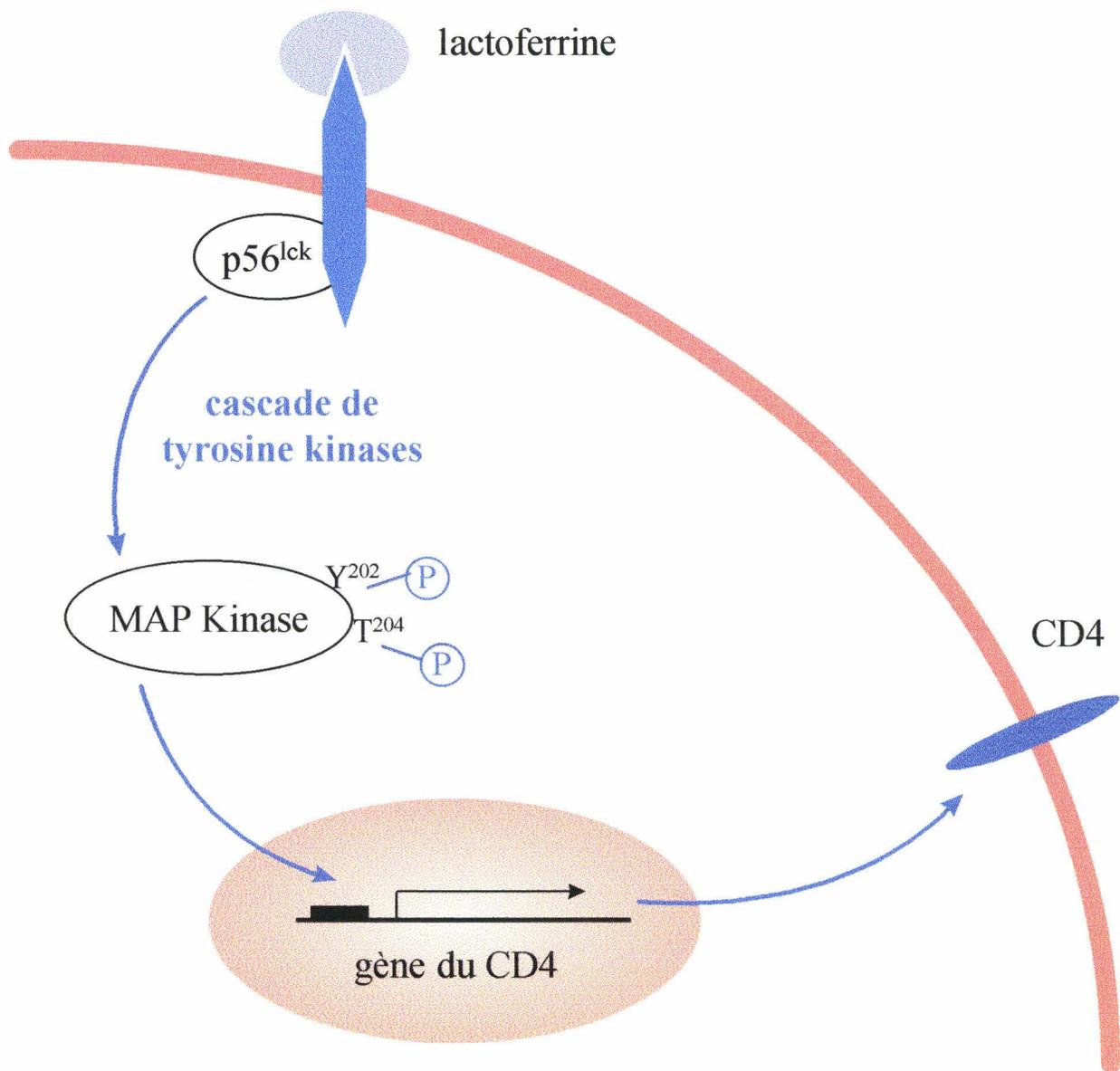


Figure 31: Mode d'action de la lactoferrine sur les cellules T Jurkat : induction d'un signal de transduction aboutissant à la régulation de l'antigène de surface CD4.

PARTIE II

EFFET COMPARATIF DES LACTOFERRINES HUMAINE ET BOVINE SUR L'EXPRESSION DU CD4 DANS LES CELLULES JURKAT ET SUR LA CYTOTOXICITE DES CELLULES NK

I- INTRODUCTION

La lactoferrine ayant de nombreuses applications industrielles potentielles dans la prévention des maladies infectieuses et dans la protection contre le développement des cellules tumorales, certains industriels (Morinaga Milk Industry, Japon ; Armor Proteins, France ; Tatua Biological, Nouvelle-Zélande) essaient de développer des traitements utilisant la lactoferrine bovine. De plus, dans le cadre du cinquième programme cadre (5^{ème} PRCD, Qualité de la gestion des ressources du vivant) sur la recherche de stratégies pour de nouvelles interventions mettant en jeu le système immunitaire, nous avons établi une collaboration avec la Société Domo-Biopole (dirigée par J.P. Perraudin, Bruxelles) pour développer un outil à base de lactoferrine. Dans cette optique, nous avons comparé l'activité de la lactoferrine bovine à celle de la lactoferrine humaine sur les modèles cellulaires qui ont été étudiés dans notre laboratoire, c'est-à-dire les cellules humaines NK et la lignée humaine lymphoblastique T Jurkat.

Les lactoferrines d'origine humaine et bovine ont une structure très similaire. En effet, les séquences en acides aminés déduites après séquençage des ADN complémentaires ont montré que les deux lactoferrines présentent 69 % d'homologie (Mead et Tweedie, 1990 ; Goodman et Schanbacher, 1991 ; Pierce *et al.*, 1991). La cristallisation des lactoferrines saturées en fer et leur analyse par diffraction aux rayons X à une résolution de 2,8 Å (Anderson *et al.*, 1989 ; Moore *et al.*, 1997) ont permis de révéler que les conformations des lactoferrines humaine et bovine sont superposables. Il subsiste cependant quelques différences dans l'orientation relative des deux lobes de la protéine (Moore *et al.*, 1997 ; Baker *et al.*, 1998). Par ailleurs, la détermination de la structure primaire des glycanes des deux lactoferrines a montré une plus grande diversité pour la bovine que pour l'humaine (Coddeville *et al.*, 1992). La position et le nombre de sites d'attachement des N-glycanes

varient selon l'espèce : la majorité de la lactoferrine humaine possède deux glycanes de type N-acétyllactosaminique sur les résidus Asn¹³⁸ et Asn⁴⁷⁹ (Van Berkel *et al.*, 1996 ; Spik *et al.*, 1988), alors que la lactoferrine bovine en possède trois, deux de type N-acétyllactosaminique et un de type oligomannosidique sur les résidus Asn³⁶⁸, Asn⁴⁷⁶ et Asn⁵⁴⁵ (Moore *et al.*, 1997 ; Spik *et al.*, 1988).

Ces similitudes structurales suggèrent une fixation de la lactoferrine bovine sur les mêmes récepteurs que ceux de l'humaine. En ce qui concerne les lymphocytes, étudiés plus particulièrement dans notre laboratoire, les paramètres de fixation des deux lactoferrines sur les cellules lymphoblastiques T Jurkat sont identiques : Kd = 69 nM, n = 102000 pour l'humaine, et Kd = 65 nM, n = 97900 pour la bovine (Legrand *et al.*, 1997). Cette étude suggère également que 80 % des sites de fixation de la lactoferrine seraient des protéoglycannes sulfatés, et que les 20 % restant représenteraient le récepteur lymphocytaire de la lactoferrine. Les sites de reconnaissance de la lactoferrine humaine pour ces deux ligands sont connus : les protéoglycannes interagissent avec les deux régions juxtaposées constituées des résidus 1-5 et 28-31 (Mann *et al.*, 1994), alors que le récepteur lymphocytaire est reconnu par les boucles 28-35 et 39-42 (Legrand *et al.*, 1992). Malgré des différences dans la séquence peptidique N-terminale des lactoferrines humaine et bovine, leur fixation comparable aux cellules Jurkat pourrait s'expliquer par une structure tridimensionnelle superposable des régions concernées (résidus 1-56 du domaine N1), ainsi que par la présence de 8 résidus basiques pouvant former le site de fixation des glycosaminoglycannes (Legrand *et al.*, 1997) (figure 32, page 109).

Par ailleurs, certains effets biologiques de la lactoferrine bovine sur les cellules lymphocytaires ont été étudiés. La lactoferrine bovine présente en effet la même activité facteur de croissance que l'humaine sur des lignées lymphocytaires B et T humaines (Hashizume *et al.*, 1983). D'autre part, de nombreuses études récentes sur l'effet anti-tumoral de la lactoferrine ont été réalisées *in vivo* chez le rat et la souris à l'aide de lactoferrine bovine. Elles suggèrent que la lactoferrine inhibe la croissance tumorale et la dissémination métastatique en augmentant l'activité cytotoxique des cellules NK (Sekine *et al.*, 1997a ; Yoo *et al.*, 1997 ; Iigo *et al.*, 1999 ; Ushida *et al.*, 1999).

A

	1	10	20
hLf	<u>G</u> <u>R</u> <u>R</u> <u>R</u> <u>R</u> <u>S</u> <u>V</u> <u>Q</u> <u>W</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>S</u> <u>Q</u> <u>P</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>K</u> <u>C</u> <u>F</u> <u>Q</u> <u>W</u> <u>Q</u> <u>R</u> <u>N</u>		
bLf	<u>A</u> <u>P</u> <u>R</u> <u>K</u> <u>N</u> <u>V</u> <u>R</u> <u>W</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>Q</u> <u>P</u> <u>E</u> <u>W</u> <u>F</u> <u>K</u> <u>C</u> <u>R</u> <u>R</u> <u>W</u> <u>Q</u> <u>W</u> <u>R</u>		
	30	40	50
hLf	<u>M</u> <u>R</u> <u>K</u> <u>V</u> <u>R</u> <u>G</u> <u>P</u> <u>P</u> <u>V</u> <u>S</u> <u>C</u> <u>I</u> <u>K</u> <u>R</u> <u>D</u> <u>S</u> <u>P</u> <u>I</u> <u>Q</u> <u>C</u> <u>I</u> <u>Q</u> <u>A</u> <u>I</u> <u>A</u> <u>E</u>		
bLf	<u>M</u> <u>K</u> <u>K</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>I</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>V</u> <u>R</u> <u>R</u> <u>A</u> <u>F</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>C</u> <u>I</u> <u>R</u> <u>A</u> <u>I</u> <u>A</u> <u>E</u>		

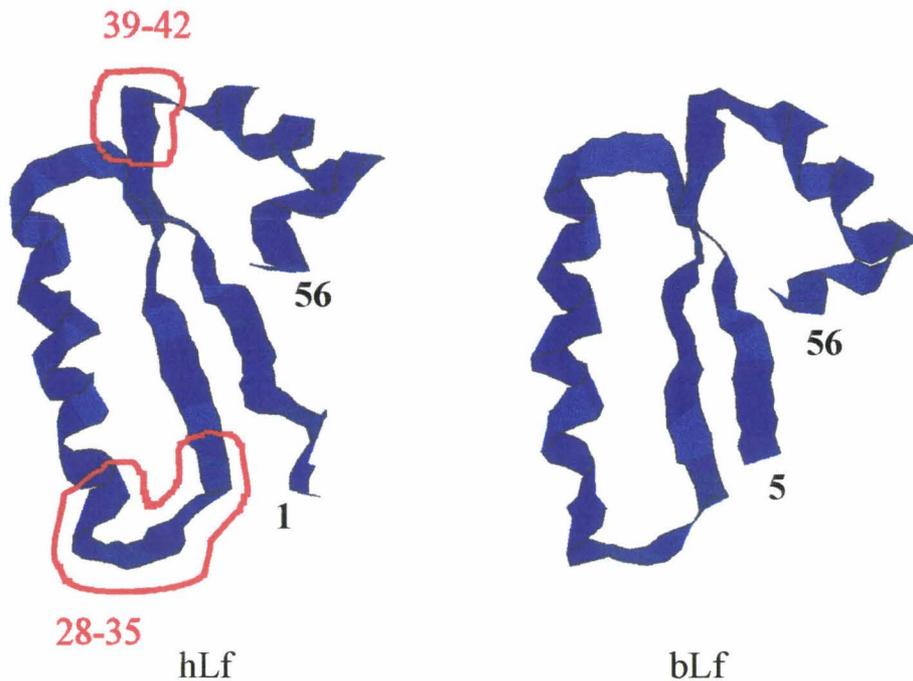
B

Figure 32: Comparaison des séquences primaires des régions 1-52 (A) (Legrand *et al.*, 1997) et structures tridimensionnelles des régions 1-56 (B) des lactoferrines humaine (hLf) et bovine (bLf). Les résidus basiques Arg et Lys sont soulignés dans la séquence primaire.

II- RÉSULTATS

1- Modulation de la cytotoxicité des cellules NK

Des travaux réalisés dans notre laboratoire ont montré que la lactoferrine humaine régule la cytotoxicité des cellules NK envers les cellules cibles tumorales. L'étude du mécanisme d'action de la lactoferrine a révélé que la lactoferrine agit à deux niveaux : elle module à la fois l'activité cytolytique des cellules NK et la sensibilité à la lyse des cellules tumorales (Damiens *et al.*, 1998b, 1999). Afin de comparer les effets des lactoferrines humaine et bovine sur ce mécanisme, nous avons réalisé le test de cytotoxicité au ^{51}Cr en prétraitant les cellules effectrices NK ou les cellules cibles tumorales par différentes concentrations en lactoferrine.

1.1- Effet des lactoferrines sur les cellules effectrices NK

Pour ces expériences, les cellules NK isolées du sang sont prétraitées pendant 24 h avec des concentrations en lactoferrine humaine ou bovine de 0, 10 et 50 $\mu\text{g/ml}$, avant d'effectuer le test de cytotoxicité sur deux types de cellules cibles : les cellules hématopoïétiques K562 et les cellules épithéliales cancéreuses mammaires MDA-MB-231.

Les cellules érythroleucémiques K562 sont très sensibles à la lyse puisqu'en absence de lactoferrine la cytolyse observée est très forte, atteignant déjà 70 à 90 % de cytolyse quel que soit le ratio cellules effectrices / cellules cibles (figure 33, page 111). Cette sensibilité basale très élevée explique qu'en présence de lactoferrine humaine ou bovine (10 et 50 $\mu\text{g/ml}$), la cytotoxicité des cellules NK envers les cellules K562 n'est pas augmentée (figure 33A et B).

Contrairement aux cellules hématopoïétiques, les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 présentent une cytolyse basale beaucoup plus faible, variant de 33 à 53 % selon les ratios, en absence de lactoferrine (figure 34, page 112), ce qui permet une meilleure observation de l'effet de la lactoferrine. La lactoferrine humaine module en effet la cytotoxicité des cellules NK de façon dépendante de sa concentration (figure 34A). A faible concentration (10 $\mu\text{g/ml}$), la cytolyse des cellules MDA-MB-231 est augmentée d'un facteur 2,5 à 3 aux ratios 20 et 40, et d'un facteur 1,7 au ratio 80. L'effet plus faible de la lactoferrine

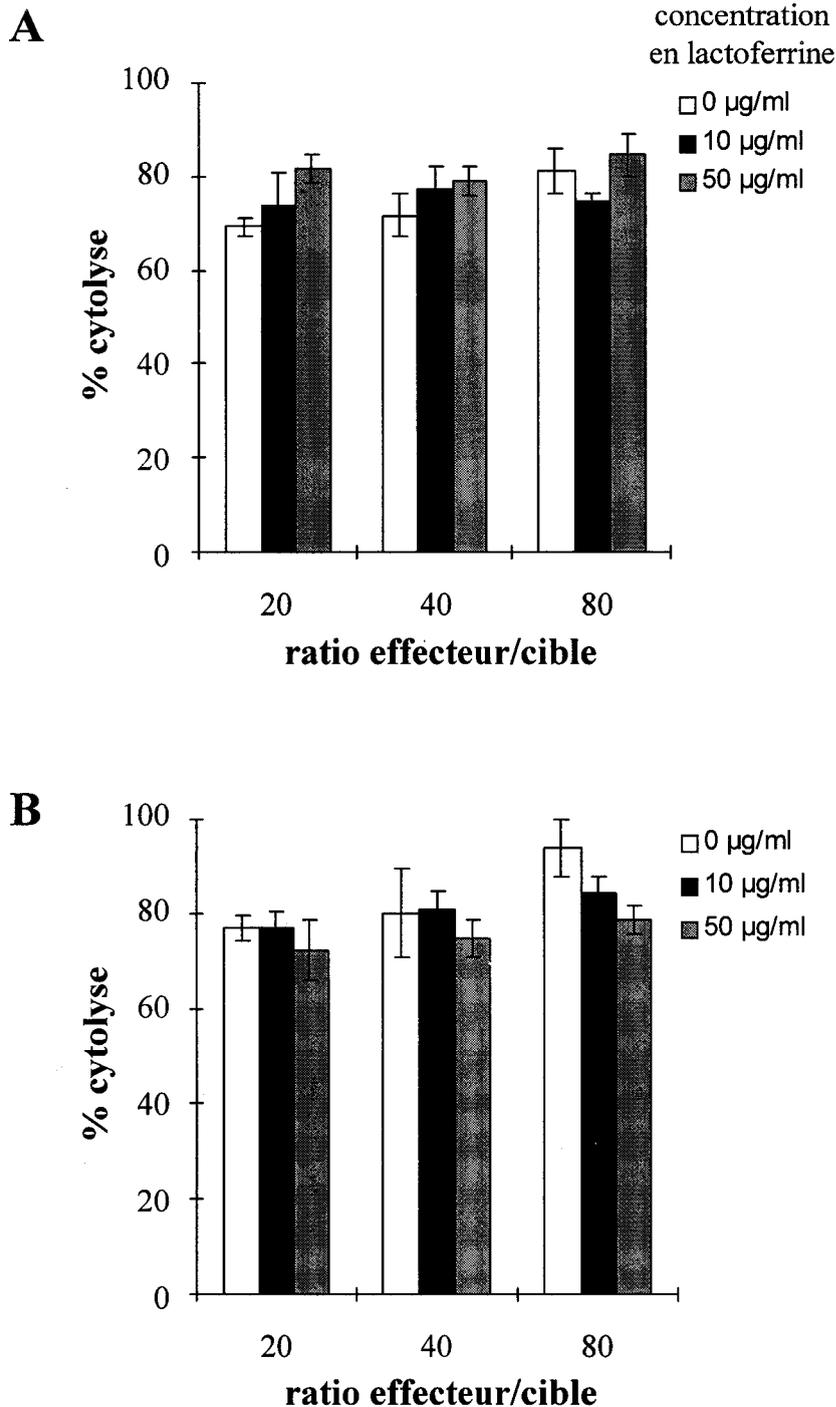


Figure 33 : Effet des lactoferrines sur la cytotoxicité des cellules NK vis-à-vis de cellules hématopoïétiques.

Les cellules NK sont traitées par 0, 10 ou 50 µg/ml de lactoferrine humaine (A) ou bovine (B) pendant 24 h avant d'effectuer le test de cytotoxicité sur les cellules K562 à différents ratio cellules effectrices / cellules cibles. Les résultats expriment la moyenne de trois expériences distinctes réalisées en triple exemplaire.

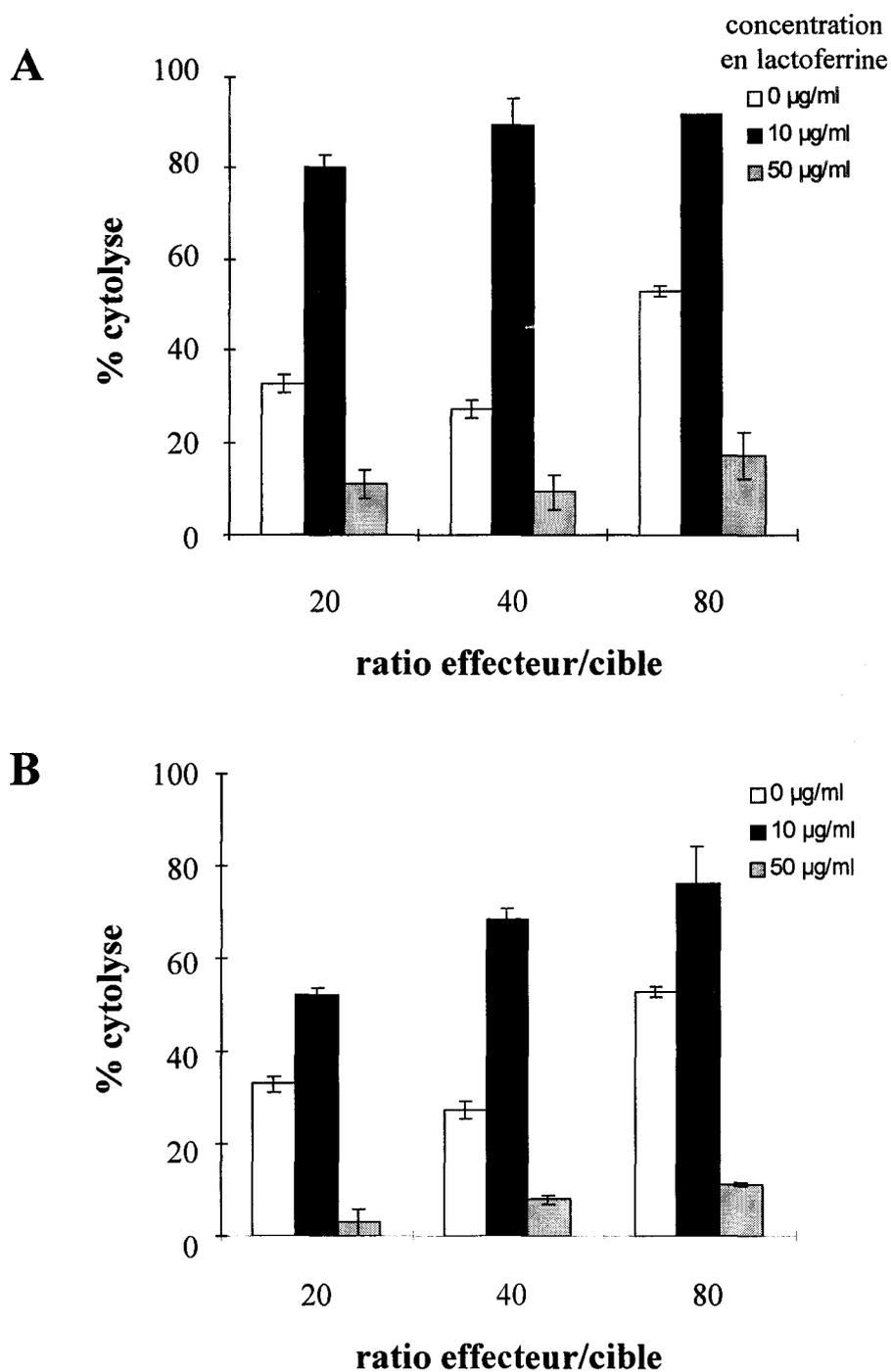


Figure 34 : Effet des lactoferrines sur la cytotoxicité des cellules NK vis-à-vis de cellules épithéliales mammaires.

Les cellules NK sont incubées avec la lactoferrine humaine (A) ou bovine (B) à une concentration de 0, 10 ou 50 µg/ml pendant 24 h avant d'effectuer le test de cytotoxicité sur les cellules MDA-MB-231 à trois ratios différents (20:1, 40:1, 80:1). L'expérience a été réalisée en triple exemplaire sur le sang de trois donneurs, et le résultat le plus représentatif est montré.

au ratio 80 peut s'expliquer par une cytotoxicité basale plus élevée à ce ratio. De plus une concentration plus élevée en lactoferrine (50 µg/ml) induit une diminution significative (3 fois moins) de l'activité des cellules NK, quel que soit le ratio utilisé. Dans le cas de la lactoferrine bovine, on retrouve des résultats similaires (figure 34B) : une augmentation d'un facteur 1,5 à 2,5 pour une concentration en lactoferrine de 10 µg/ml, et une très nette diminution pour une concentration de 50 µg/ml en lactoferrine.

Ces résultats montrent que les lactoferrines humaine et bovine agissent de la même manière sur le mécanisme de cytotoxicité des cellules NK. En effet, elles n'affectent pas la cytolyse envers les cellules hématopoïétiques K562, dont la cytolyse basale est très élevée, alors qu'elles modulent celle envers les cellules épithéliales mammaires MDA-MB-231, dont la cytolyse basale est beaucoup plus faible. L'effet activateur des lactoferrines sur les cellules de la glande mammaire dépend de la concentration en lactoferrine, et présente un maximum pour une dose relativement faible : 10 µg/ml. Cependant l'augmentation de la lyse des cellules MDA-MB-231 produite par la lactoferrine bovine est statistiquement plus faible que celle induite par la lactoferrine humaine.

1.2- Effet des lactoferrines sur les cellules cibles MDA-MB-231

Ayant montré que la lyse des cellules épithéliales mammaires MDA-MB-231 par les cellules NK est augmentée par la lactoferrine, nous avons utilisé ces cellules afin d'étudier l'effet des lactoferrines humaine et bovine sur la sensibilité des cellules tumorales à la lyse. Pour cela, les cellules MDA-MB-231 sont prétraitées pendant 24 h avec différentes concentrations (0, 50 ou 100 µg/ml) de lactoferrine humaine ou bovine, avant d'être marquées au ⁵¹Cr puis soumises au test de cytotoxicité (figure 35, page 114).

Au cours de ces expériences, la cytolyse basale détectée est beaucoup plus faible que celle observée précédemment, et elle varie de 7 à 12 % de cytolyse. Après prétraitement des cellules par la lactoferrine humaine, la sensibilité des cellules MDA-MB-231 à la lyse est augmentée. Quel que soit le ratio cellules NK / cellules cibles utilisé, cet effet est dépendant de la dose et augmente parallèlement à la concentration en lactoferrine pour atteindre 25 % de cytolyse avec 100 µg/ml de lactoferrine à un ratio de 80 (figure 35A). La même expérience réalisée avec la lactoferrine bovine montre également un effet activateur de celle-ci, mais la réponse optimale semble être atteinte dès 50 µg/ml de lactoferrine. On obtient ainsi 25 à 30 % de cytolyse avec 50 ou 100 µg/ml de lactoferrine au ratio 80 (figure 35B).

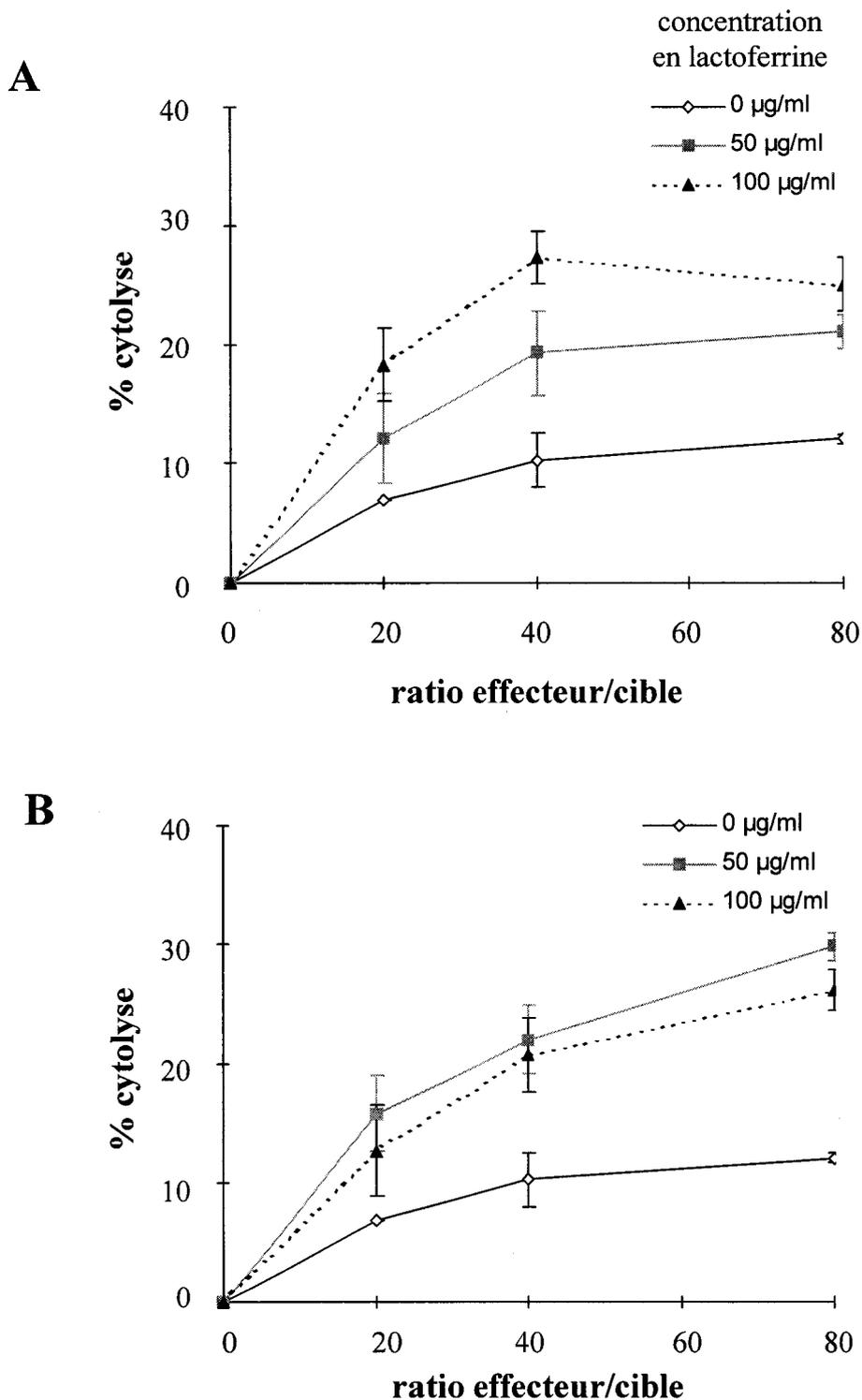


Figure 35 : Effet des lactoferrines sur la sensibilité à la lyse des cellules cibles.

Les cellules épithéliales MDA-MB-231 sont prétraitées pendant 24 h dans du milieu complet contenant 0, 50 ou 100 µg/ml de lactoferrine humaine (A) ou bovine (B). Les cellules adhérentes sont ensuite mises en contact avec les cellules effectrices NK pour réaliser le test de cytotoxicité. Les résultats expriment la moyenne de deux expériences distinctes réalisées en triple exemplaire.

Ces résultats démontrent qu'indépendamment de son origine, humaine ou bovine, la lactoferrine affecte la sensibilité à la lyse des cellules MDA-MB-231 de la même manière. Les lactoferrines augmentent la réponse des cellules cibles aux cellules effectrices NK, de façon dépendante de la concentration en lactoferrine.

L'ensemble des résultats obtenus lors de l'étude comparative des effets des lactoferrines humaine et bovine sur la cytotoxicité des cellules NK montre que les lactoferrines modulent ce processus de façon similaire en fonction de la concentration en lactoferrine et du phénotype des cellules cibles. Elles jouent à la fois sur les cellules effectrices et sur les cellules cibles : l'activation des cellules NK est observée à une faible concentration (10 µg/ml), alors que l'augmentation de la sensibilité des cellules tumorales à la lyse est augmentée pour des concentrations plus fortes (50 à 100 µg/ml) en lactoferrine. Cependant il semblerait que l'effet de la lactoferrine bovine soit statistiquement légèrement plus faible que celui obtenu avec la lactoferrine humaine.

2- Régulation de l'expression de l'antigène CD4 à la surface des cellules lymphoblastiques T Jurkat

Dans la première partie des résultats de ce manuscrit, nous nous sommes intéressée au rôle de la lactoferrine dans la maturation des lymphocytes T. En utilisant les cellules lymphoblastiques T humaines Jurkat comme modèle expérimental, nous avons montré que la lactoferrine humaine régule l'expression de l'antigène de surface CD4, grâce à l'induction d'un signal de transduction faisant intervenir des tyrosine kinases ainsi que la MAP Kinase. Les grandes étapes de ce mécanisme ont également été étudiées avec la lactoferrine bovine dans le cadre de la comparaison des effets des lactoferrines humaine et bovine sur certaines cellules intervenant dans la réponse immunitaire. Pour cela, nous nous sommes focalisée sur l'étude de la densité de surface du CD4, de l'activité de la MAP Kinase, et de la corrélation de ces événements en utilisant les inhibiteurs PD98059 et génistéine.

2.1- Régulation de la densité de l'antigène de surface CD4

Les cellules Jurkat sont incubées avec des concentrations de lactoferrine humaine ou bovine variant de 0 à 100 µg/ml pendant 48 h, période de temps optimale déterminée lors de l'étude sur la lactoferrine humaine. Les antigènes de surface sont ensuite détectés par cytofluorimétrie en flux à l'aide d'un anticorps monoclonal anti-CD4 (figure 36, page 117).

L'expression de l'antigène de surface CD4 est augmentée après 48 h de traitement des cellules par la lactoferrine humaine ou bovine. Cet effet dépend de la concentration en lactoferrine : la densité du CD4 n'est pas affectée par de faible (1 µg/ml) et forte (100 µg/ml) concentrations en lactoferrine, alors qu'elle est nettement stimulée par 10 µg/ml. Les deux lactoferrines présentent le même effet activateur avec un taux d'induction statistiquement identique de 2,3. Cependant, à 100 µg/ml, la lactoferrine bovine apparaît plus efficace que la lactoferrine humaine, mais cette différence ne semble pas significative.

Cette expérience indique que la lactoferrine bovine agit de la même manière que l'humaine sur l'expression du CD4, avec un effet dépendant de la dose et optimal pour une concentration de 10 µg/ml en lactoferrine.

2.2- Activation de la MAP Kinase

Les cellules Jurkat sont traitées par différentes concentrations en lactoferrine humaine ou bovine (de 0 à 100 µg/ml) pendant des périodes de temps variant de 0 à 15 mn. Le lysat cellulaire est fractionné sur colonne de DEAE-Sepharose et la MAP Kinase est éluée par un tampon contenant 0,22 M en NaCl. Une aliquote de cette fraction enrichie en enzyme MAP Kinase est ensuite incubée en présence d'[γ -³²P]ATP et de MBP, déposée sur papier phosphocellulose, et la radioactivité incorporée sur le substrat est quantifiée au compteur β (figure 37, page 118).

Les figures 37A et B présentent une phosphorylation de la MBP qui varie selon le temps d'incubation et la concentration en lactoferrine humaine ou bovine. On observe en effet que l'activité kinase n'est pas affectée par de faible (1 µg/ml) et forte (100 µg/ml) concentrations en lactoferrine, alors que 10 µg/ml de lactoferrine augmentent considérablement la phosphorylation du substrat. Cet effet atteint un maximum après 10 mn de traitement avec un taux d'induction respectif de 4,8 et 4 pour les lactoferrines humaine et bovine. L'activité MAP

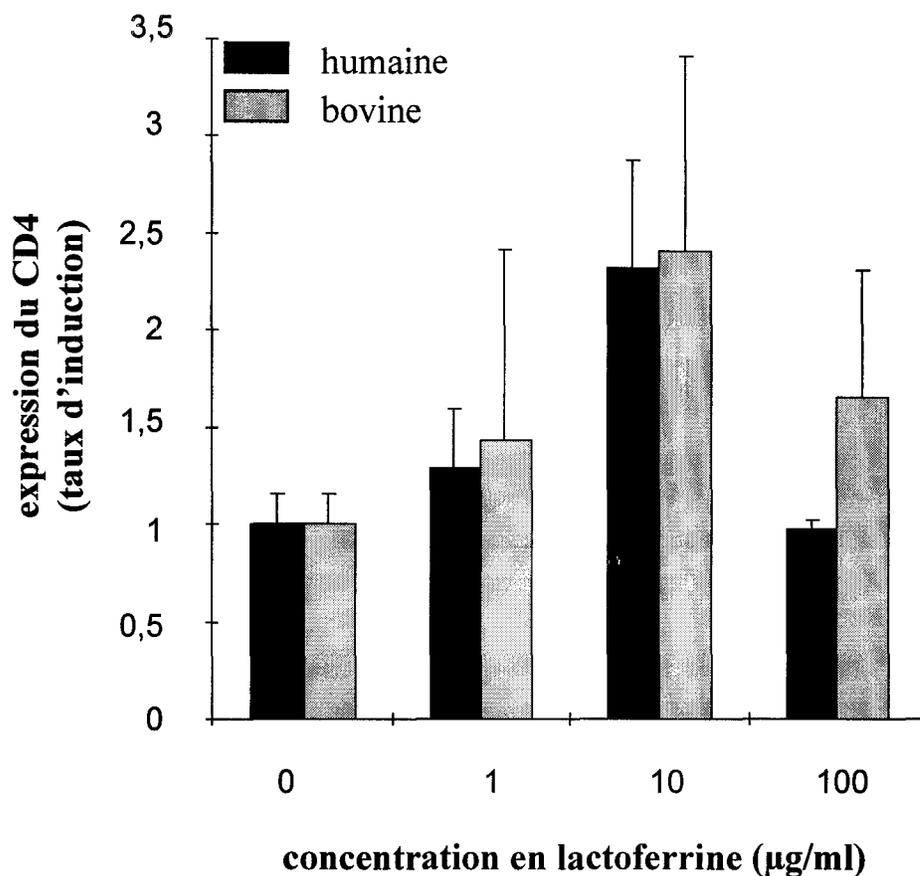


Figure 36 : Les lactoferrines exercent un effet dépendant de la dose sur l'expression de l'antigène de surface CD4.

Les cellules Jurkat (2×10^5) sont traitées pendant 48 h avec différentes concentrations en lactoferrine humaine ou bovine, avant l'analyse de l'expression du CD4 par cytofluorimétrie en flux. Les variations de la densité du CD4 sont exprimées en taux d'induction par rapport au contrôle. Cet histogramme représente la moyenne de trois expériences distinctes pour la lactoferrine humaine ($P < 0,05$, Student's *t*-test), et deux expériences distinctes pour la lactoferrine bovine ($P < 0,07$, entre 0 et 10 µg/ml, Student's *t*-test).

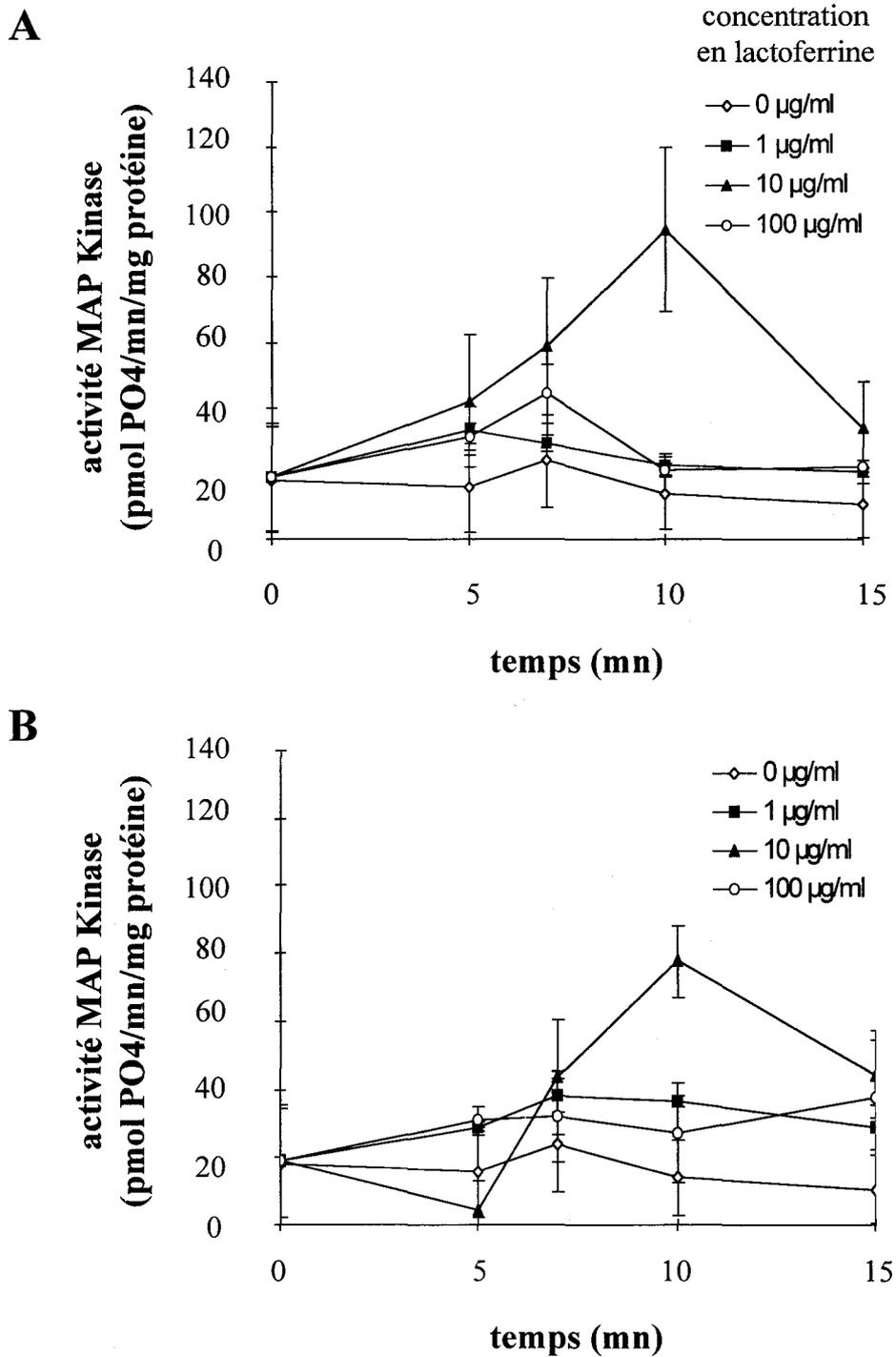


Figure 37 : Activation de l'enzyme MAP Kinase: phosphorylation d'un substrat exogène par la méthode des mini-colonnes.

Les cellules Jurkat (8×10^6) sont incubées en présence de 0 à 100 µg/ml de lactoferrine humaine (A) ou bovine (B) pendant des périodes de temps variant de 0 à 15 mn, puis lysées. L'activité MAP Kinase est déterminée, sur la fraction MAP Kinase purifiée sur DEAE Sepharose par incorporation de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ sur la MBP. Nous présentons les moyennes obtenues pour trois expériences réalisées en double exemplaire.

Kinase diminue ensuite rapidement pour revenir, après 15 mn, au niveau d'activation initial pour la lactoferrine humaine, alors que dans le cas de la lactoferrine bovine cette activité reste encore deux fois plus élevée que l'activité de base.

De même que la lactoferrine humaine, la lactoferrine bovine est donc capable de stimuler l'activité MAP Kinase de façon dépendante de la dose et du temps. On retrouve d'ailleurs des conditions optimales identiques à celle de la lactoferrine humaine : 10 mn à 10 µg/ml. Cependant l'effet induit par la lactoferrine bovine est toujours légèrement plus faible que celle produite par l'humaine.

2.3- Implication de la MAP Kinase dans la régulation du CD4

Les cellules sont préincubées avec les inhibiteurs génistéine et PD98059 à la concentration optimale de 10 µM pendant 45 mn, traitées par 10 µg/ml de lactoferrine pendant 48 h puis analysées par cytofluorimétrie en flux pour visualiser les antigènes de surface CD4 (figure 38, page 120).

La quantification de la densité du CD4 en surface, réalisée sur plusieurs expériences, montre en effet que l'augmentation de l'expression du CD4 induite par la lactoferrine est inhibée par la génistéine à 77 % pour l'humaine et à 100 % pour la bovine. Dans les mêmes conditions, le PD98059 inhibe complètement la surexpression du CD4 par la lactoferrine humaine, alors qu'il inhibe à 90 % l'effet de la bovine.

Ces résultats indiquent que l'effet des deux lactoferrines, humaine et bovine, sur l'expression du CD4 est inhibé à la fois par la génistéine et le PD98059, suggérant que les tyrosine kinases ainsi que la MAP Kinase sont impliquées dans la régulation de l'expression de l'antigène de surface CD4.

Les différentes expériences concernant l'étude comparative de l'effet des lactoferrines humaine et bovine sur les cellules Jurkat montrent que les deux protéines agissent de la même façon. Elles régulent en effet l'expression du CD4 à la surface cellulaire, et semblent adopter le même mécanisme d'action par l'induction d'un signal de transduction faisant intervenir des tyrosine kinases ainsi que la MAP Kinase. La réponse optimale de chaque événement étudié est obtenue dans les mêmes conditions expérimentales pour les deux lactoferrines : 48 h d'incubation pour le CD4 en surface et 10 mn de traitement pour l'activité MAP Kinase avec 10 µg/ml de lactoferrine.

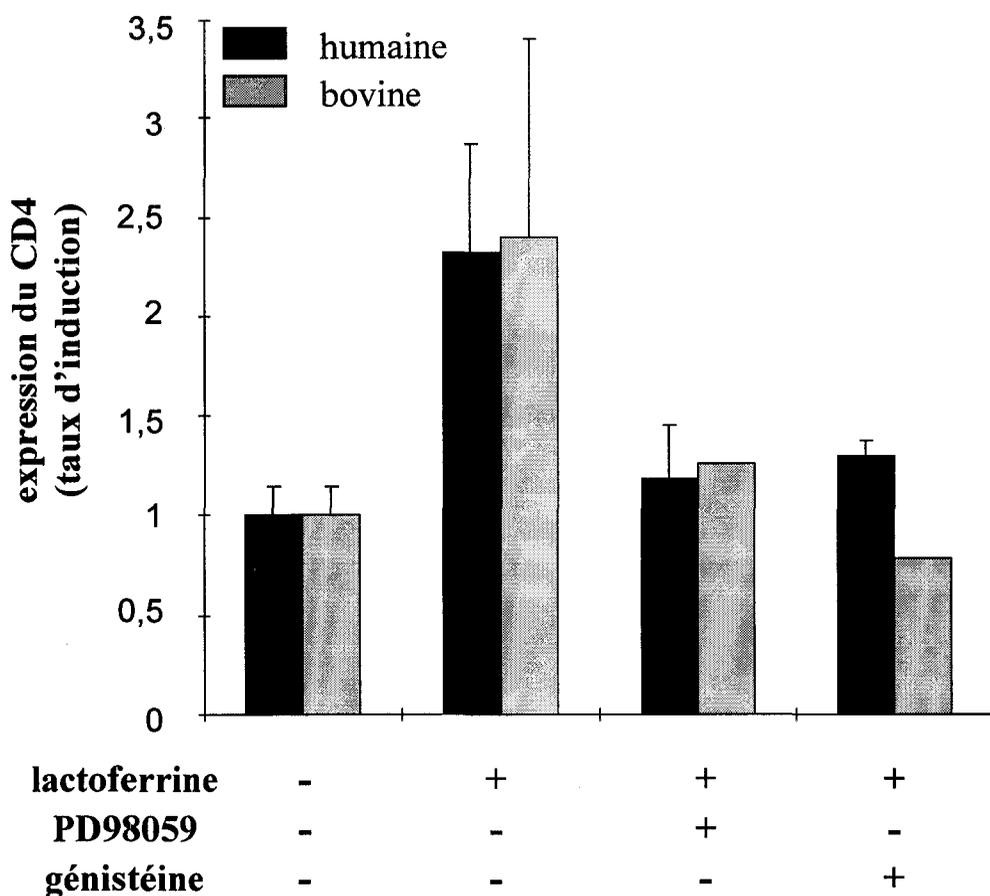


Figure 38 : Effet des inhibiteurs génistéine et PD98059 sur l'expression du CD4 induite par les lactoferrines.

Les cellules Jurkat (2×10^5) sont prétraitées avec la génistéine ou le PD98059 à une concentration de $10 \mu\text{M}$ pendant 45 mn. La lactoferrine humaine ou bovine est ensuite ajoutée pendant 48 h, et la densité de surface de l'antigène CD4 est mesurée au cytofluorimètre en flux. Les résultats sont présentés sous forme de taux d'induction par rapport au contrôle, et expriment la moyenne de trois expériences distinctes pour la lactoferrine humaine ($P < 0.05$, Student's *t*-test) et deux expériences pour la lactoferrine bovine ($P < 0.07$, Student's *t*-test).

III- DISCUSSION

Lors de cette étude comparative des lactoferrines humaine et bovine, nous avons démontré que ces deux protéines agissent de la même manière sur les cellules NK et les cellules lymphoblastiques T Jurkat. Elles modulent en effet l'activité cytotoxique des cellules NK selon le phénotype des cellules cibles, et augmentent l'expression de l'antigène à la surface des cellules Jurkat en induisant un signal de transduction.

Les résultats que nous avons obtenus démontrent que les lactoferrines humaine et bovine possèdent le même effet modulateur de l'activité cytotoxique des cellules NK. Comme l'ont précédemment décrit Damiens et coll. (1998b) pour la lactoferrine humaine, la protéine bovine n'affecte pas la cytotoxicité des cellules NK envers les cellules hématopoïétiques K-562, alors qu'elle module la cytotoxicité dirigée contre les cellules épithéliales cancéreuses mammaires MDA-MB-231. Sur ces dernières, l'effet des lactoferrines est dû à la fois à la modulation de l'activité cytolytique des cellules effectrices, et à l'augmentation de la sensibilité des cellules cibles à la lyse. Ces observations pourraient s'expliquer par la présence de sites de fixation de la lactoferrine à la surface des cellules NK (Hammarström *et al.*, 1995 ; Damiens *et al.*, 1998b) et des cellules MDA-MB-231 (Rochard *et al.*, 1992 ; Damiens *et al.*, 1998a). Nous avons observé que l'effet des lactoferrines sur les cellules NK varie selon leur concentration : le prétraitement des cellules NK avec une concentration en lactoferrine de 10 µg/ml provoque une augmentation de l'activité cytolytique des cellules NK, alors qu'une plus forte concentration (100 µg/ml) semble être toxique pour les cellules effectrices. La lactoferrine est donc effective à une concentration physiologique puisqu'après dégranulation des neutrophiles, lors du processus inflammatoire induit par le développement tumoral, la concentration plasmatique locale en lactoferrine peut atteindre 20 µg/ml (Masson *et al.*, 1969 ; Bennett et Mohla, 1976). Par ailleurs, après prétraitement des cellules cibles épithéliales par des concentrations croissantes en lactoferrine d'origine humaine ou bovine (de 0 à 100 µg/ml), les cellules répondent en augmentant leur sensibilité à la lyse. Les effets identiques des deux lactoferrines sur les cellules cibles tumorales suggèrent un mécanisme d'action similaire. Il serait alors intéressant d'approfondir le mode d'action de la lactoferrine bovine sur les cellules MDA-MB-231 en se référant à celui de la lactoferrine humaine qui a été décrit récemment. La lactoferrine humaine augmente en effet la sensibilité à la lyse des cellules cibles en inhibant

leur prolifération. Le cycle cellulaire est en fait bloqué à la transition G1-S par modulation de l'expression et de l'activité de protéines clés qui régulent ce passage du cycle (Damiens *et al.*, 1999). De plus, il semblerait que l'arrêt de croissance des cellules cancéreuses soit influencé par des molécules sulfatées présentes à la surface des cellules cibles. Les protéoglycannes de type héparane sulfate sont nécessaires à l'interaction et à l'activité de la lactoferrine humaine sur les cellules mammaires MDA-MB-231 (Damiens *et al.*, 1998a). D'autre part, la nature et la quantité des protéoglycannes présents à la surface des cellules tumorales pourraient expliquer la variabilité de réponse des cellules cibles à la lactoferrine.

En ce qui concerne les cellules lymphoblastiques T Jurkat, nous avons montré que les lactoferrines humaine et bovine exercent le même effet activateur de l'expression de l'antigène de surface CD4. Cet effet dépend de la concentration en lactoferrine et présente un maximum après 48 h de traitement avec une dose unique de 10 µg/ml, ces conditions expérimentales étant identiques pour les deux lactoferrines. Les lactoferrines d'origine humaine et bovine possèdent des paramètres de fixation à la surface des cellules Jurkat qui sont similaires (Legrand *et al.*, 1997), et qui suggèrent une fixation des deux protéines sur le même récepteur spécifique. Cette hypothèse nous a amenée à comparer les signaux de transduction induits par les deux lactoferrines après fixation à la surface cellulaire. Pour cela, nous nous sommes intéressée à l'activité de la MAP Kinase, un élément primordial de la voie de transduction que nous avons précédemment décrite pour la lactoferrine humaine. Les résultats obtenus montrent que la MAP Kinase répond de la même manière au traitement des cellules par les deux lactoferrines : stimulation de l'activité enzymatique avec une réponse optimale observée après 10 mn d'incubation avec 10 µg/ml de lactoferrine. L'activation de cette enzyme et l'augmentation de l'expression du CD4 ont ensuite été corrélées grâce à l'utilisation des inhibiteurs génistéine et PD98059. L'effet inhibiteur de la génistéine, connue pour inhiber les tyrosine kinases, indique également l'implication d'enzymes tyrosine kinases dans le signal induit par la lactoferrine bovine. Ces quelques éléments suggèrent que la lactoferrine bovine emprunte la même voie de transduction que l'humaine : activation d'une cascade de tyrosine kinases dont la p56^{lck}, stimulation de la MAP Kinase, puis régulation du gène du CD4 pour aboutir à une augmentation de la densité de surface de ce marqueur.

Dans cette partie des résultats, nous avons donc montré que les lactoferrines humaine et bovine présentent les mêmes effets sur certaines cellules du système immunitaire, suggérant que la lactoferrine bovine puisse exercer de nombreux rôles biologiques identiques à ceux de la lactoferrine humaine. Il a d'ailleurs été démontré que la lactoferrine bovine possède également une activité bactériostatique ainsi qu'une activité plus générale dans la défense immunitaire, après administration par voie orale chez la souris ou chez l'humain (Yamauchi *et al.*, 1998 ; Zimecki *et al.*, 1998 ; Wada *et al.*, 1999). Dans le cadre de l'utilisation de la lactoferrine au niveau industriel et de son ajout dans des produits parapharmaceutiques et cosmétiques, la production de lactoferrine à partir du lait bovin est plus rentable que son isolement du lait humain. De ce point de vue, la lactoferrine bovine active pourrait même concurrencer les lactoferrines humaines recombinantes dont les techniques de production sont lourdes et coûteuses. Le système d'expression des animaux transgéniques est en effet le plus adapté à la production de masse, mais son utilisation se heurte à de nombreux problèmes d'éthique.

Conclusion générale

Les différents effets de la lactoferrine sur les cellules impliquées dans les processus inflammatoire et immunitaire se traduisent par une modulation de la synthèse de protéines, que ce soient des protéines membranaires ou des protéines de sécrétion. Les mécanismes d'action de la lactoferrine sur ces régulations ne sont pas encore connus mais deux hypothèses ont été émises :

- une activité facteur de transcription de la lactoferrine elle-même, après sa translocation jusqu'au noyau des cellules cibles (Baeuerle, 1995 ; He et Furmanski, 1995) ;
- l'induction d'un signal de transduction après fixation de la lactoferrine à son récepteur spécifique présent à la surface des cellules cibles (Goretzki et Mueller, 1998 ; Tanaka *et al.*, 1998).

Afin d'élucider le mécanisme d'action de la lactoferrine, nous nous sommes intéressée plus particulièrement à son effet accélérateur de la maturation des cellules T par augmentation de l'expression de l'antigène de surface CD4 (Zimecki *et al.*, 1991). La lignée cellulaire lymphoblastique T Jurkat, qui exprime le récepteur de la lactoferrine (Legrand *et al.*, 1997) et qui présente une faible densité de l'antigène CD4 à leur surface, constituait un bon modèle expérimental pour cette étude.

Ainsi, l'utilisation de ce modèle nous a permis de montrer que la lactoferrine augmente la densité de surface du CD4, et que cet effet varie selon la concentration en lactoferrine et le temps d'incubation. La lactoferrine régule également l'expression du CD4 en agissant au niveau du gène du CD4 : elle augmente en effet la synthèse des ARNm du CD4 et stimule l'activité promotrice du gène de ce marqueur. Par ailleurs, dans les mêmes conditions expérimentales, la lactoferrine n'affecte pas la distribution des cellules dans les différentes phases du cycle.

La lactoferrine accélère donc la maturation des cellules Jurkat en régulant positivement l'expression du CD4 au niveau transcriptionnel, sans bloquer la prolifération cellulaire.

Après avoir étudié l'activité de la lactoferrine sur les cellules T immatures, nous nous sommes attaché à l'analyse du mécanisme d'action aboutissant à cet effet biologique. Des études préalables réalisées dans notre laboratoire ont montré que les cellules Jurkat internalisent la lactoferrine par la voie d'endocytose avec 30 à 40 % de dégradation des

molécules endocytées (Bi *et al.*, 1994). Aucune lactoferrine n'ayant été observée dans le noyau, l'hypothèse d'une activité facteur de transcription de celle-ci a donc été rejetée. Nos recherches se sont alors focalisées sur l'étude d'un signal de transduction transmis par le récepteur activé de la lactoferrine présent à la surface des cellules Jurkat.

L'exposition des cellules à la lactoferrine induit un flux calcique membranaire tardif, suggérant que la voie de la phospholipase C dépendante du calcium n'est pas impliquée. Par contre, une cascade de phosphorylations transitoires a été observée sur les résidus tyrosine de nombreuses protéines cytosoliques. Parmi ces protéines, nous avons identifié la kinase p56^{lck} dont le rôle primordial dans la régulation du CD4 a été vérifié. La lactoferrine affecte également l'activité de la MAP Kinase, mais elle n'active par phosphorylation qu'une seule isoforme de cette enzyme, la p42 MAP Kinase ou Erk2. Finalement, les trois événements étudiés, la phosphorylation des protéines, l'activité MAP Kinase et l'expression du CD4, ont été corrélés grâce à l'utilisation d'inhibiteurs à des concentrations non toxiques pour les cellules.

Dans les cellules Jurkat, la lactoferrine régule l'expression du CD4 grâce à la transmission d'un signal de transduction. La lactoferrine n'induit pas la voie de la phospholipase C dépendante du calcium, mais la voie des MAP Kinases régulée par la protéine kinase p56^{lck}.

La similitude des structures tridimensionnelles des lactoferrines humaine et bovine (Moore *et al.*, 1997 ; Baker *et al.*, 1998) ainsi que leurs paramètres de fixation identiques à la surface des cellules Jurkat (Legrand *et al.*, 1997) laissent présager des rôles biologiques similaires. Dans le cadre d'une collaboration industrielle, nous avons comparé les effets des lactoferrines humaine et bovine sur deux modèles de cellules du système immunitaire : les cellules NK et les cellules lymphoblastiques T Jurkat.

Les deux lactoferrines modulent de la même manière la cytotoxicité des cellules NK en agissant à la fois sur les cellules effectrices NK et sur les cellules cibles tumorales. La réponse des cellules NK à la lactoferrine varie selon le phénotype des cellules cibles : leur activité cytolytique est modulée envers les cellules épithéliales mammaires, alors qu'elle n'est pas affectée envers les cellules hématopoïétiques. D'autre part, les lactoferrines augmentent la sensibilité à la lyse des cellules cibles en modifiant leur comportement cellulaire, puisqu'elles provoquent un arrêt de leur prolifération. Par ailleurs, la lactoferrine bovine présente la même

activité que l'humaine sur les cellules Jurkat. Elle induit également l'expression de l'antigène de surface CD4 par l'intermédiaire de la MAP Kinase.

Quelle que soit l'origine de la lactoferrine, humaine ou bovine, elle présente le même effet biologique sur les cellules NK et sur la lignée Jurkat. De plus, il semblerait qu'elles empruntent toutes les deux un mécanisme d'action identique pour exercer leur rôle.

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

- l'augmentation de l'expression de l'antigène de surface CD4 par la lactoferrine est régulée au niveau transcriptionnel ;
- cette régulation résulte de l'induction d'un signal de transduction après fixation de la lactoferrine sur son récepteur spécifique ;
- ce signal est transmis par une série d'événements dont certains ont été identifiés : la p56^{lck} et la MAP Kinase ;
- cet effet biologique et ce mécanisme d'action sont identiques, que la lactoferrine soit d'origine humaine ou bovine.

Afin d'approfondir cette étude, il serait intéressant :

- de caractériser les facteurs de transcription impliqués dans la régulation de l'expression du gène du CD4 par la lactoferrine ;
- d'identifier les différents composants du signal de transduction, notamment les nombreuses protéines tyrosine kinases ;
- de revenir à un modèle plus physiologique : les thymocytes double négatifs CD4⁻CD8⁻, qu'ils soient humains ou murins

Ces différents travaux auraient pour but de préciser le rôle de la lactoferrine dans la maturation des cellules T et, plus particulièrement, son mécanisme d'action lors de la régulation de l'expression de l'antigène de surface CD4.

Appendice technique

I- MATÉRIEL

1- Lactoferrines

1.1- Préparation des lactoferrines humaine et bovine

La lactoferrine est préparée dans notre laboratoire selon le protocole établi par Chéron et coll. (1977) modifié par Spik et coll. (1982). Le lait est délipidé par centrifugation à 10000 t/mn, à 4°C pendant 1 h. La caséine est éliminée par précipitation à pH 4,6 avec de l'HCl 4 M. Après une dialyse de 72 h contre de l'eau distillée, le précipité est éliminé par une centrifugation à 3000 t/mn et à 4°C pendant 30 mn. Le lactosérum est chromatographié sur colonne SP-Sephadex C-50 stabilisée dans une solution d'acétate de sodium 0,22 M. La colonne est lavée par une solution d'acétate de sodium 0,22 M. La lactoferrine est éluée avec une solution d'acétate de sodium 0,5 M pour le lactosérum humain ou 1 M pour le lactosérum bovin. Cette étape de chromatographie est répétée une deuxième fois dans les mêmes conditions pour améliorer la purification. Après dialyse contre de l'eau distillée, la lactoferrine est lyophilisée.

Finalement, les LPS (lipopolysaccharides), principaux contaminants de la lactoferrine sont éliminés par chromatographie d'échange d'ions grâce à un choc salin (Baveye *et al.*, 2000). En effet, l'interaction entre la lactoferrine et les LPS est interrompue à des concentrations en NaCl supérieures à 0,4 M (Van Berkel *et al.*, 1997). Après injection de 50 mg de lactoferrine purifiée sur une colonne de SP-Sepharose Fast-Flow (Pharmacia, Biotech) 7x1 cm équilibrée dans du NaCl 0,1 M, la colonne est lavée avec 70 ml de NaCl 0,5 M. La lactoferrine est éluée par du NaCl 2 M puis dessalée sur une colonne Sephadex G-25 équilibrée dans du NaCl 0,1 M. Tous les tampons sont préparés avec de l'eau apyrogène. La contamination en LPS est quantifiée par le test limulus ("*Limulus* amoebocyte lysate assay", BioWhittaker), et elle est inférieure à 50 pg d'endotoxine par mg de protéines.

1.2- Préparation de la lactoferrine humaine marquée à la fluorescéine

Le marquage à la fluorescéine est réalisé sur les glycanes de la lactoferrine (Leveugle *et al.*, 1993). Dans un premier temps, il nécessite l'oxydation périodique des résidus Neu Ac des glycanes de la lactoferrine. Cinq mg de lactoferrine dissous dans 230 µl d'un tampon acétate de sodium 0,1 M, NaCl 0,15 M, pH 5,6 sont mélangés avec 100 µl de périodate de sodium 18 mM et incubés à 4°C pendant 10 mn. La réaction est arrêtée par addition de 10 µl d'éthylène glycol. La solution est dessalée sur une colonne de Sephadex G-25 équilibrée dans un tampon phosphate de sodium 0,1 M, NaCl 0,15 M, pH 7,4. Dans un second temps, le marquage est réalisé en faisant réagir les fonctions aldéhydiques formées avec le {5-[(2-(carbohydrazino)méthyl)thio]acétyl] amino-fluorescéine} (HyF). La lactoferrine oxydée est incubée avec le réactif fluorescent (650 µg de HyF dans 10 µl de diméthylformamide) pendant 20 h à température ambiante, sous agitation. La solution, après addition de n-butanol (50 µl), est passée sur colonne Sephacryl S200 superfine équilibrée dans le tampon PBS ("Phosphate Buffered Saline"), pH7,4, contenant 5 % (V/V) de butanol afin d'éliminer l'excès de réactif. La lactoferrine marquée est concentrée sur Centricon 30 puis dessalée sur une nouvelle colonne Sephadex avec un tampon PBS 0,01 M et congelée en aliquotes. Le nombre de molécules de HyF fixées par molécule de lactoferrine est estimé à 1,5 par mesure de l'absorbance à 280 et 495 nm selon la méthode de Jobbagy et Kiraly (1996).

2- Lignées cellulaires

2.1- Lignées hématopoïétiques humaines

- La lignée cellulaire K562 (ATCC) est une lignée érythroleucémique, établie à partir d'une effusion pleurale d'une patiente atteinte de leucémie myéloïde chronique en phase aiguë (Lozzio et Lozzio, 1975). Les cellules sont peu différenciées et multipotentes. En effet, elles sont capables de se différencier spontanément en progéniteurs érythrocytaires.
- Les cellules Jurkat E6.1 sont des cellules lymphoblastiques T obtenues auprès de l'ECACC. Elles synthétisent de l'IL-2 après stimulation, et possèdent à leur surface le complexe

TCR/CD3 ainsi que le récepteur de l'IL-2 (ou CD25). Elles présentent le phénotype CD3⁺ CD4⁻ CD8⁻ CD25⁺.

- Les cellules Jurkat CaM 1.6 (ECACC) sont des mutantes dérivées des cellules Jurkat E6.1 et isolées par Straus et Weiss (1992). Ces cellules sont incapables d'exprimer la protéine cytoplasmique p56^{lck}.

2.2- Lignée épithéliale mammaire humaine

- La lignée MDA-MB-231 (ATCC) est une lignée cellulaire établie à partir d'une effusion pleurale d'une patiente atteinte d'un adénocarcinome métastatique du sein.

3- Préparation de la population lymphocytaire

3.1- Séparation de la population lymphocytaire totale

L'isolement de la population lymphocytaire est réalisé selon la technique décrite par Boyum (1976). Le sang prélevé stérilement sur citrate de sodium est dilué au demi avec du PBS pH 7,4, stérile et dépourvu de calcium. Un volume de 25 ml de sang dilué est déposé délicatement sur 15 ml de Lymphoprep (Dominique Dutscher s.a.) dans un tube à fond conique de 50 ml (Falcon). Après une centrifugation de 30 mn à 2500 t/mn et à température ambiante, les cellules mononucléées qui forment un anneau dense sont recueillies à l'aide d'une pipette en plastique. Ces cellules sont lavées 2 fois avec 10 ml de PBS pH 7,4 et centrifugées à 1100 t/mn pendant 10 mn à température ambiante. Elles sont ensuite resuspendues à la densité de 2×10^6 cellules/ml dans le milieu RPMI 1640 complet. Des fractions de 15 ml de suspension cellulaire sont incubées en boîte de culture 75 cm² à 37°C sous atmosphère humidifiée enrichie de 5 % de CO₂ pendant 45 mn. L'adhésion des monocytes au support plastique permet de recueillir la population lymphocytaire totale non adhérente dans le surnageant.

3.2- Enrichissement de la population lymphocytaire en cellules NK CD3⁻ CD20⁻ CD56⁺

Les cellules NK sont isolées par immunocyto-adhérence. Cette technique repose sur la capacité des anticorps à se fixer sur des surfaces en polystyrène. Après fixation sur le plastique, les anticorps sont capables d'interagir avec l'antigène spécifique exprimé à la surface des différents types de lymphocytes. Ils permettent ainsi d'isoler de façon sélective une sous-population cellulaire.

Les anticorps anti-CD3 (dirigés contre la population lymphocytaire T) (Immunotech) ou anti-CD20 (dirigés contre la population lymphocytaire B) (Immunotech) sont dilués dans un tampon Tris-HCl 0,05 M, pH 9,5 à la concentration de 0,5 mg/ml. La solution d'anticorps est déposée dans une boîte de Pétri (Corning) de façon à ce que le fond de la boîte soit entièrement recouvert (soit 7 ml pour une boîte 100x20 mm). Après une incubation de 2 h à température ambiante, l'excès d'anticorps non fixés est éliminé par aspiration. La suspension lymphocytaire totale est déposée dans la boîte à raison de 10 ml par boîte à la densité de 1×10^6 cellules/ml. Après 25 mn d'incubation, les cellules CD3⁻, CD20⁻ non adhérentes sont récupérées par aspiration. Cette étape est répétée 2 fois afin d'obtenir un enrichissement en cellules NK de l'ordre de 90 %.

II- MÉTHODES

1- Culture cellulaire

1.1- Culture de lignées hématopoïétiques

Les cellules K562, Jurkat et J.CaM1.6 sont cultivées en milieu RPMI 1640 (Gibco-BRL) enrichi de 10 % de SVF (sérum de veau foetal) décomplémenté, 2 mM de L-glutamine (Eurobio), et 10 µg/ml de gentamycine (Gibco-BRL). Les cellules sont placées en boîte de culture (Falcon) dans une étuve humidifiée à une température de 37°C et en atmosphère à 5 % de CO₂. Les cellules en suspension sont maintenues en phase exponentielle de croissance (densité comprise entre 2×10^5 et 1×10^6 cellules/ml), et utilisées à une densité de 6×10^5 cellules/ml.

1.2- Culture des cellules mammaires cancéreuses

Les cellules épithéliales MDA-MB-231 sont cultivées en boîte de 25 ou 75 cm² (Falcon) dans un milieu composé de MEM (milieu essentiel minimum de Eagle avec sels de Earle) (Eurobio) complémenté avec 10 % de SVF décomplémenté, 1 % d'acides aminés non essentiels (Eurobio), 2 mM de L-glutamine, 5 µg/ml d'insuline (Endopancrine), de la pénicilline (40 UI/ml) et de la streptomycine (40 µg/ml) (Gibco-BRL). Le milieu est ajusté à pH 7,4 avec de l'HEPES (25 mM) et 0,22 % de bicarbonate de sodium. Les cellules sont incubées à 37°C en atmosphère humidifiée et enrichie à 5 % de CO₂. Lorsque les cellules sont à confluence, le milieu de culture est éliminé et les cellules adhérentes sont rincées avec du PBS stérile pH 7,4 afin d'éliminer les traces de sérum. Les cellules sont ensuite incubées en présence de 1 ml de trypsine/EDTA (Versène) solution 1X (Eurobio). Lorsqu'elles sont décollées, l'action de la trypsine est stoppée en ajoutant 5 ml de milieu complet. Les cellules sont ensuite réensemencées au 1/10 de la confluence dans de nouvelles boîtes de culture en présence de milieu complet.

2- Techniques de cytofluorimétrie en flux

2.1- Détection d'antigènes de surface

Les cellules sont diluées à une densité de 2×10^5 cellules/ml et cultivées pendant des périodes de temps variant de 0 à 72 h dans du milieu RPMI complet en présence de lactoferrine humaine ou bovine à des concentrations allant de 0 à 100 µg/ml. Les expressions des antigènes CD4 et CD71 sont mesurées à la surface cellulaire toutes les 24 h. Les cellules (6×10^5) sont incubées pendant 1 h dans 100 µl de PBS, pH 7,4, avec un anticorps monoclonal de souris dirigé contre les antigènes CD4 ou CD71 (Immunotech) à une dilution de 1/25. Les cellules sont ensuite lavées 2 fois par centrifugation à 1200 t/mn pendant 5 mn et incubées pendant 30 mn dans 100 µl de PBS contenant un anticorps secondaire conjugué au FITC (Sigma) à une dilution de 1/40. Un anticorps isotype contrôle (IgG1) est utilisé pour évaluer la fixation non-spécifique, et l'intensité de fluorescence est mesurée au cytofluorimètre en flux (FACScan, Becton Dickinson). Les variations de densité de CD4 sont calculées avec les intensités moyennes de fluorescence du CD4 (M CD4) et de l'isotype (M isotype) :

$$\frac{\text{M CD4 - M isotype}}{\text{M isotype}} \times 100$$

2.2- Analyse du cycle cellulaire

De même que ci-dessus, les cellules (2×10^5 cellules/ml) sont cultivées en présence de 10 µg/ml de lactoferrine pendant 48 h. Pour l'analyse du cycle cellulaire, les cellules (1×10^6) sont reprises dans 100 µl de milieu complet, ajoutées goutte à goutte à 2,5 ml d'éthanol à 70 % froid en agitant vigoureusement, puis placées pendant 4 h au minimum à -20°C . Les cellules sont ensuite lavées 3 fois par centrifugation à 1200 t/mn avec du PBS pH 7,4 et incubées dans 300 µl de PBS contenant de l'iodure de propidium (28 µg/ml) et de la RNase (28 µg/ml) pendant 45 mn à 37°C . La répartition des cellules dans les différentes phases du cycle est analysée au cytofluorimètre en flux grâce au programme Cell Fit de Becton Dickinson.

2.3- Analyse des flux calciques

Afin de quantifier la concentration intracellulaire en calcium, les cellules sont marquées au Fluo 3-AM (Fluo 3-AcetoxyMethyl ester) (Molecular Probes) qui est lipophile et qui est capable de traverser la membrane cytoplasmique. Le Fluo 3-AM est ensuite hydrolysé par les estérases intracellulaires en Fluo 3 qui est hydrosoluble. Celui-ci se trouve alors piégé dans la cellule et émet une fluorescence à 530 nm lorsqu'il est complexé au calcium.

Selon la technique de Partiseti et coll. (1994), les cellules (2×10^6) sont resuspendues dans 0,6 ml de milieu RPMI 1640 contenant 0,1 % de SAB (Sérum Albumine Bovine), puis incubées avec du Fluo3-AM 5 µM pendant 1 h à 37°C à l'obscurité. Après chargement du Fluo 3-AM, les cellules sont centrifugées à 1200 t/mn pendant 3 mn, reprises dans 1,5 ml de milieu, et activées par de la lactoferrine 10 µg/ml, ou de l'anti-CD3 0,1 µg/ml en présence (RPMI 1640) ou en absence (RPMI 1640, EGTA 2 mM) de calcium dans le milieu d'incubation.

Les cellules sont analysées et triées en fonction de leur granulométrie et de leur taille, au cytofluorimètre en flux. L'intensité moyenne de fluorescence (M) est mesurée à différents temps d'incubation, et la concentration de calcium intracellulaire est calculée selon la formule:

$$[Ca^{++}]_i = \frac{K_{app} (M - M_{min})}{M_{max} - M}$$

- où
- M min est l'intensité minimale de fluorescence des cellules obtenue par complexation du calcium extracellulaire en préincubant les cellules en présence de 2 mM EGTA.
 - M max est l'intensité maximale de fluorescence obtenue en activant les cellules par 2 µM d'ionomycine (Sigma) qui induit une libération instantanée de toutes les réserves intracellulaires de calcium.
 - Kapp est la constante d'affinité du Fluo 3-AM pour le calcium. Elle a été mesurée par le fabricant et possède une valeur de 0,4 µM.

2.4- Analyse de la viabilité cellulaire

Les cellules sont traitées pendant 48 h dans du milieu de culture complet contenant de la génistéine (Sigma) ou du PD98059 (Calbiochem) à des concentrations allant de 0 à 100 µM. Les culots cellulaires sont repris dans 300 µl de PBS contenant 28 µg/ml d'iodure de propidium, et incubés 30 mn à 37°C. La viabilité des cellules est alors analysée au cytofluorimètre en flux, et le pourcentage de cellules marquées à l'iodure de propidium représente le pourcentage de cellules mortes.

2.5- Fixation de la lactoferrine humaine fluorescente

Les cellules (3×10^5) sont incubées dans 100 µl de milieu RPMI contenant 0,04 % d'azide de sodium et à différentes concentrations de lactoferrine-HyF (0 à 40 µg/ml) pendant 45 mn à 4°C, puis lavées avec le milieu d'incubation. La fixation non-spécifique est mesurée en présence de 100 excès molaire de lactoferrine non marquée. Les cellules sont analysées au cytofluorimètre en flux et les variations de moyenne de fluorescence sont calculées avec les moyennes de fluorescence totale (M T) et non-spécifique (M NS) :

$$\frac{M T - M NS}{M NS} \times 100$$

3- Préparation des lysats cellulaires

Les cellules Jurkat sont incubées avec ou sans lactoferrine humaine ou bovine dans du milieu RPMI contenant 0,1 % de SAB (Boehringer Mannheim) pendant des temps variant de 0 à 45 mn et à des concentrations allant de 0 à 100 µg/ml selon les expériences. Les cellules sont ensuite lavées dans du PBS pH 7,4, et lysées pendant 2 h à 4°C dans un tampon (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,6, 1 % Triton X-100, 1 % DOC) contenant des inhibiteurs de protéases et de phosphatases (100 mM NaF, 1 mM PMSF, 50 µg/ml leupeptine, 200 µM aprotinine, 1 % EGTA, 0,2 mM Na₃VO₄). Les noyaux et le matériel insoluble sont éliminés par une centrifugation de 15 mn à 13000xg, avant de réaliser l'immunorévélation des P-Tyr ou les essais d'activité MAP Kinase.

Les protéines peuvent également être précipitées en ajoutant de l'ATCA (Acide TriChloro Acétique) à une concentration finale de 10 % pendant 20 mn à 4°C. Après une centrifugation de 15 mn à 10000xg, les protéines sont lavées 2 fois par de l'éthanol afin d'éliminer les traces d'ATCA. Le culot est ensuite séché par évaporation et resuspendu dans du tampon contenant du SDS 10 % et du β-mercaptoéthanol.

Pour l'immunorévélation des P-Erk, les cellules sont incubées comme décrit ci-dessus, mais lysées en chauffant 10 mn à 100°C dans un tampon de SDS 20 % contenant du β-mercaptoéthanol.

4- Immunorévélation

4.1- Electrophorèse en gel de polyacrylamide

Pour séparer les protéines en fonction de leur poids moléculaire, des gels de polyacrylamide contenant du SDS (Laemmli, 1970) sont réalisés sur plaques (1,5x140x180 mm ou 1,5x73x102 mm) dans un appareil vertical de marque BioRad. Les indices de réticulation sont de 10 ou 7,5 % pour le gel de séparation (Tris-HCl 1,5 M pH 8,8) et 5 % pour le gel de concentration (Tris-HCl 1,5 M pH 6,8). Avant le dépôt, la concentration en protéines des échantillons est déterminée par le kit de dosage micro-BCA (Pierce), puis des aliquotes équivalentes sont reprises dans le tampon de migration (Tris-HCl 25 mM pH 8,6,

glycocolle 200 mM, SDS 0,1 %, bleu de bromophénol) et chauffées 5 mn à 100°C. L'électrophorèse est alors réalisée à 50 V sur la nuit pour les grands gels, ou sous réfrigération à 150 V pendant 90 mn pour les petits gels. Elle est arrêtée lorsque le front de migration se trouve à 1 cm du bas de la plaque.

4.2- Electrotransfert

Les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose selon la technique de Towbin et coll. (1979) dans une cuve Bio-Rad. L'électrotransfert est réalisé à 250 mA pendant 2 h 30 mn à 4°C dans un tampon Tris-HCl 25 mM pH 8,4, glycocolle 200 mM, méthanol 20 %. Afin de vérifier l'homogénéité des dépôts, les protéines fixées sur la nitrocellulose sont révélées, de façon réversible, au rouge Ponceau.

4.3- Détection à l'aide d'anticorps

4.3.1- Immunorévélation P-Tyr

Les membranes de nitrocellulose sont incubées pendant 1 h dans du TBS ("Tris Buffered Saline"), pH 7,6 contenant 3 % de SAB et 0,1 % de Tween 20. Les membranes sont ensuite incubées pendant 2 h à température ambiante avec l'anticorps monoclonal de souris anti-P-Tyr (1 µg/ml) (Transduction Laboratories) dans du TBS contenant 0,1 % de SAB et 0,1 % de Tween 20, puis lavées dans le même tampon sans SAB. La nitrocellulose est finalement incubée avec l'anticorps secondaire anti-IgG de souris conjugué à l'HRP ("HorseRadish Peroxydase", Sanofi Pasteur) (1 µg/ml) dans du TBS, Tween 20 0,1 %, pendant 1 h à température ambiante, lavée puis révélée par le système de chimioluminescence ECL ("Enhanced ChemiLuminescence") (Amersham).

4.3.2- Immunorévélation P-Erk

Les membranes de nitrocellulose sont incubées pendant 1 h dans du TBS contenant 0,1 % de Tween 20 et 5% de lait en poudre écrémé. Les membranes sont ensuite incubées pendant 2 h à température ambiante avec l'anticorps monoclonal de souris anti-P-Erk

(0,5 µg/ml) (New England Biolabs) dans du TBS contenant 0,1 % de Tween 20 et 1 % de lait écrémé, lavées et incubées avec l'anticorps anti-souris conjugué au HRP (0,5 µg/ml) pendant 1 h dans le même tampon.

Pour la détection de la MAP Kinase, les membranes sont incubées dans les mêmes conditions mais avec l'anticorps polyclonal de lapin anti-MAP Kinase (3,1 µg/ml) Sigma), suivi de l'anticorps anti-IgG de lapin conjugué au HRP (0,5 µg/ml) (Biosys).

Les différentes membranes sont ensuite lavées et révélées avec le système ECL.

5- Mesure de l'activité MAP Kinase

5.1- Méthode des "mini-colonnes"

Après activation des cellules par la lactoferrine humaine ou bovine à différentes concentrations (de 0 à 100 µg/ml) et pendant des temps variant de 0 à 15 mn, l'analyse de l'activité MAP Kinase utilisant la méthode des mini-colonnes se déroule en deux étapes (Seger *et al.*, 1994). La première étape consiste à fractionner l'extrait cytosolique sur une colonne d'échange d'ions constituée de DEAE (DiEthylAminoEthyl) Sepharose CL-6B (Pharmacia, Biotech). La mini-colonne est réalisée avec 0,4 ml de cette résine dans un cône de pipette 1 ml bouché par de la laine de verre, et lavée plusieurs fois avec le tampon A (β -glycérophosphate 50 mM pH 7,3, EGTA 1,5 mM, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, Na_3VO_4 0,1 mM) puis par le tampon A contenant du NaCl 0,02 M (3 x 1 ml). L'extrait cytosolique (0,5 ml, 8×10^6 cellules) est déposé sur la colonne qui est ensuite lavée par 0,75 ml puis 1 ml de tampon A, NaCl 0,02 M. L'enzyme MAP Kinase est alors éluée par 0,75 ml de tampon A, NaCl 0,22 M.

La deuxième étape consiste à doser l'activité MAP Kinase par incorporation de $^{32}\text{P-PO}_4$ sur la MBP ("Myelin Basic Protein"). Des aliquotes de 6,25 µl de la fraction contenant les MAP Kinases sont incubées avec la MBP (2,1 µl d'une solution à 2 mg/ml) (Sigma) et 4,15 µl de tampon B (MgCl_2 30 mM, DTT 4,5 mM, β -glycérophosphate 75 mM pH 7,3, Na_3VO_4 0,15 mM, PKI 6 µM, EGTA 3,75 mM, SAB 2,5mg/ml) contenant 2 µCi [γ - ^{32}P] ATP (ICN). Après 15 mn à 30°C, 10 µl sont déposés sur papier phosphocellulose et lavés avec une solution d'acide phosphorique 150 mM. L'incorporation de phosphate radioactif est mesurée au compteur β (LKB Wallac) en utilisant du liquide scintillant (Zinsser Analytic).

5.2- Immunoprécipitation de la MAP Kinase

Les cellules (4×10^6) sont traitées par 10 $\mu\text{g/ml}$ de lactoferrine humaine pendant des temps variant de 0 à 15 mn, puis la MAP Kinase est immunoprécipitée. Pour éliminer les interactions non spécifiques entre les immunoglobulines et la protéine A, une préabsorption est effectuée en ajoutant 1 μl de sérum de lapin non immun au lysat total (100 μl) pendant une nuit à 4°C, suivie de 30 mn d'incubation à 4°C sous agitation avec 50 μl d'une solution de protéine A-Sepharose 2 % dans du TBS, pH 7,6. Après une centrifugation de 2 mn à 3000xg, le surnageant (140 μl) est dilué par addition de 360 μl d' H_2O et 500 μl de tampon d'immunoprécipitation 2X concentré (1X = 1 % Triton X-100, 150 mM NaCl, 10 mM Tris, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0,2 mM Na_3VO_4 , 0,2 mM PMSF, 0,5 % NP-40) et incubé pendant 1 h à 4°C en présence de 62 μg d'anticorps polyclonal anti-MAP Kinase. La protéine A-Sepharose (50 μl , 2 %) est ensuite ajoutée pendant 30 mn à 4°C sous agitation. Le culot est lavé 2 fois par centrifugation avec le tampon d'immunoprécipitation 1X concentré, 1 fois avec le tampon B de la méthode des "mini-colonnes", puis incubé 15 mn à 30°C avec 7,5 μl de MBP (2 mg/ml) et 12,5 μl de tampon B contenant 2 μCi de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP. Les protéines sont alors décrochées du complexe protéine A-anticorps en reprenant le culot dans du tampon d'électrophorèse et en portant à ébullition pendant 10 mn. Après centrifugation, le surnageant contenant la MBP est déposé sur gel de polyacrylamide, le gel est séché et soumis à une autoradiographie.

5.3- Gel de polyacrylamide (Tobe *et al.*, 1991)

Les lysats cellulaires (1×10^7 cellules) sont déposés sur gel de polyacrylamide (0,75x73x102 mm) contenant du SDS et 0,5 mg/ml de MBP. Après migration, le SDS est enlevé du gel par 2 lavages successifs de 30 mn à température ambiante avec une solution Tris-HCl 50 mM pH 8, isopropanol 20 %, suivis d'1 h d'incubation à température ambiante dans du Tris-HCl 50 mM pH 8 contenant du β -mercaptoéthanol 5 mM. L'enzyme est dénaturée en lavant le gel 2 fois 30 mn à température ambiante, avec une solution de chlorhydrate de guanidine 6 M, puis renaturée pendant 1 h par 5 bains de Tris-HCl 50 mM pH 8 contenant 0,04 % de Tween 20 et du β -mercaptoéthanol 5 mM. Après renaturation, le gel est préincubé à température ambiante pendant 1 h avec une solution HEPES 40 mM pH 8,

DTT (Dithiothréitol) 2 mM et MgCl₂ 10 mM. La phosphorylation de la MBP est réalisée en incubant le gel pendant 1 h dans un tampon HEPES 40 mM pH 8 (EGTA 0,5 mM, MgCl₂ 10 mM, PKI ("Protein Kinase Inhibitor") 2 µM, ATP 40 µM et 25 µCi de [γ -³²P] ATP). Après cette incubation, le gel est lavé avec une solution d'ATCA 5 % contenant du Na-PPi 1 % (pyrophosphate de sodium) jusqu'à ce que la radioactivité de la solution soit négligeable. Le gel est alors séché et révélé par autoradiographie.

6- Test de cytotoxicité

L'activité cytotoxique des cellules NK est quantifiée par le test de libération du ⁵¹Cr par les cellules cibles lysées. Les cellules cibles mammaires ou hématopoïétiques sont marquées avec du chromate de sodium (Na₂ ⁵¹CrO₄) (ICN Biomedical) se fixant sur une gamme de protéines de poids moléculaires variés. Il est à noter que lors de sa fixation aux cellules le ⁵¹Cr change de valence et ainsi, lorsqu'il est libéré dans le surnageant, il ne peut être incorporé dans d'autres cellules (Brunner *et al.*, 1968).

6.1- Marquage des cellules cibles

6.1.1- Cellules hématopoïétiques

Les cellules hématopoïétiques en culture sont prélevées et centrifugées à 1200 t/mn pendant 5 mn. Elles sont reprises à raison de 2x10⁵ cellules dans 100 µl de RPMI 1640 complétement et incubées 6 h à 37°C en présence de 20 µCi de ⁵¹Cr (Na₂ ⁵¹CrO₄) dans une atmosphère enrichie de 5 % de CO₂. A la fin du marquage, les cellules sont lavées pour éliminer l'excès de radioactivité et sont remises en suspension à 5x10⁴ cellules/ml. Elles sont alors réparties dans une plaque 96 puits à fond rond (Nunc).

6.1.2- Cellules épithéliales mammaires

Les cellules sont décollées au Versène puis centrifugées et reprises dans du milieu de culture à la densité de 5x10⁵ cellules/ml. Elles sont alors réparties dans une plaque 96 puits à fond plat (Nunc) à raison de 5000 cellules/puits. Lorsque les cellules ont adhéré au plastique,

1 μCi de ^{51}Cr repris dans 20 μl de milieu est ajouté dans chaque puits. Le marquage dure 6 h à 37°C dans une atmosphère humidifiée et enrichie de 5 % de CO_2 . Après incubation, le surnageant contenant le ^{51}Cr non incorporé est éliminé par aspiration. Les cellules adhérentes sont lavées 3 fois avec du milieu de culture et replacées dans 100 μl de milieu.

6.2- Cytolyse

Des suspensions lymphocytaires sont préparées aux densités de 2×10^5 et 4×10^5 cellules/100 μl de milieu de culture. Elles sont ajoutées aux cellules cibles (5000 cellules/puits) marquées de façon à obtenir des rapports lymphocytes/cellules cibles de 5:1, 10:1, 20:1, 40:1, 80:1. Dans chaque puits, le volume final est ajusté à 200 μl en ajoutant du milieu RPMI 1640 complété.

En parallèle, sont réalisés :

- un témoin minimum correspondant à la lyse spontanée observée en incubant 5000 cellules cibles pendant la durée du test dans 200 μl de milieu ;
- un témoin maximum obtenu en incubant 5000 cellules cibles en présence de 2 % de Triton X-100 dans 200 μl de milieu.

Chaque expérience est réalisée en triple. Après incubation sur la nuit à 37°C en atmosphère humide enrichie de 5 % de CO_2 , la radioactivité libérée dans le surnageant est évaluée au compteur γ (LKB Wallac). Le pourcentage de cytotoxicité est obtenu par le rapport :

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

6.3- Conditionnement des cellules avant le test de cytolyse

6.3.1- *Prétraitement des cellules effectrices avec la lactoferrine*

L'effet des lactoferrines humaine ou bovine sur l'activité cytotoxique des cellules effectrices est évalué en incubant la population lymphocytaire pendant 24 h avant le test de cytolyse, à raison de 1×10^6 cellules/ml, en présence de 0, 10 ou 50 $\mu\text{g/ml}$ de lactoferrine

humaine ou bovine. Après cette incubation, les cellules sont lavées avec du RPMI complet pour éliminer l'excès de lactoferrine et ajoutées aux cellules cibles suivant les différents rapports précédemment indiqués.

6.3.2- Prétraitement des cellules cibles avec la lactoferrine

Dans le cas des cellules mammaires, la lactoferrine humaine ou bovine est ajoutée aux concentrations de 0, 50 ou 100 µg/ml au milieu de culture 2 à 3 h après la mise en plaque de 96 puits des cellules. L'incubation est maintenue 24 h à 37°C en atmosphère humidifiée et enrichie en CO₂ (5 %). Après le marquage au ⁵¹Cr, les cellules sont lavées pour éliminer l'excès de lactoferrine et de ⁵¹Cr. Le test de cytolyse est alors effectué dans le milieu de culture en ajoutant la population lymphocytaire aux différents rapports précédemment cités.

7- Techniques de biologie moléculaire

7.1- Extraction des ARN totaux

L'extraction des ARN totaux est réalisée selon la méthode du GuSCN/CsCl (isothiocyanate de guanidine / chlorure de césium) en utilisant des solutions préparées avec de la verrerie et de l'eau dépourvues de ribonucléases, c'est-à-dire autoclavées pendant 1 h à 130°C.

Les cellules Jurkat (5×10^6) sont lavées par centrifugation avec du PBS puis lysées dans 3,5 ml de GuSCN. Après sonication (3 x 10 sec) pour lyser l'ADN, et addition de 0,1 g/ml de CsCl, le lysat est déposé sur coussin de CsCl 5,7 M dans un tube à centrifuger SW-50-1 (Beckman) et centrifugé à 35000 t/mn pendant 12 h à 20°C. Le culot est rincé à l'éthanol 70 %, puis repris dans 0,5 ml de tampon acétate de sodium 0,1 M, β-mercaptoéthanol 0,01 M, sodium sarkosyl 0,5 %. L'ARN est ensuite extrait par addition d'un demi volume de phénol saturé en eau et agitation pendant 10 mn, puis addition d'un demi volume de chloroforme et agitation pendant 10 mn. Après centrifugation à 13000 t/mn pendant 15 mn, la phase aqueuse (500 µl) est récupérée et l'ARN présent est précipité par addition d'acétate de sodium 3 M (50 µl) et de deux volumes d'éthanol froid pendant 4 h à -20°C. Après 40 mn de centrifugation

à 4°C, le culot d'ARN est lavé à l'éthanol 70 %, séché par évaporation (Speed-Vac, Savant), et repris dans 20 µl d'eau dépourvue de ribonucléases.

La concentration en ARN de la solution est ensuite déterminée par lecture de l'absorbance à 260 nm (1 unité de DO = 40 µg d'ARN). La qualité de la purification est déterminée par le calcul du rapport des DO à 260 et 280 nm : DO260 / DO280 doit être compris entre 1,8 et 2.

7.2- RT-PCR ("Reverse Transcription- Polymerase Chain Reaction")

La réaction de rétro-transcription en ADN complémentaire premier brin est réalisée sur 5 µg d'ARN total. L'ARN est placé en présence de 500 ng d'oligo-dT (Stratagène) dans 12 µl d'eau dépourvue en ribonucléases, et porté à 70°C pendant 5 mn. La réaction de rétro-transcription est ensuite effectuée pendant 1 h à 37°C dans un volume final de 50 µl contenant 10 µl de tampon de rétro-transcription 5X, 25 U d'inhibiteur de ribonucléases, 2 µl de mélange dXTP 10 mM, et 50 U de transcriptase inverse MMLV-RT (Proméga). Une aliquote (2 µl) est ensuite amplifiée par PCR dans un volume de 25 µl final contenant 1,25 U de Tfl polymérase (Proméga), 2,5 µl de tampon d'amplification 10X, 1,5 µl de MgSO₄ 250 mM, 0,75 µl de dXTP 1 mM, et 125 ng de chaque amorce. Les couples d'amorces utilisés ont été sélectionnés grâce au logiciel Primer Premier (Biosoft International), et sont dirigés contre des séquences spécifiques de la GAPDH (glycéraldéhyde-3-phosphodéhydrogénase) humaine et du CD4 humain.

séquence ADNc cibles	séquence des oligonucléotides (S) : sens (AS) : antisens	produit de PCR (en pb)	t°opt (en °C)	nombre de cycles
CD4 humain	(S) 5'-CTTCCCACTCGCCTTTACA-3' (AS) 5'-TGAGACATCCGCTCTGCTT-3'	635	65	40
GAPDH humaine	(S) 5'-GGTGGACCTGACCTGCCGTCTA-3' (AS) 5'-GAGGTCCACCACCCTGTTGCTG-3'	255	55	20

Les premiers brins d'ADN complémentaires sont amplifiés dans un appareil "PTC-100™ thermal cycler" (MJ Research) programmé pour les étapes suivantes:

- une dénaturation initiale de 5 mn à 94°C
- plusieurs cycles consistant en
 - une dénaturation de 1 mn à 94°C
 - une hybridation de 1 mn à t°optimale
 - une extension de 1 mn à 74°C
- une extension finale de 5 mn à 74°C

7.3- Electrophorèse en gel d'agarose

Une solution d'agarose 1 % (50 ml) dans un tampon TBE (Tris Borate 90 mM pH 8,3, EDTA 2 mM) est portée à ébullition. Avant de couler le gel, 2,5 µl de BET (bromure d'éthidium) à 10 mg/ml sont ajoutés. Une aliquote (10 µl) de chaque produit de réaction PCR est ajoutée à 3 µl de tampon de dépôt (bleu de bromophénol, xylène cyanol, glycérol). Après dépôt, la migration est réalisée pendant 45 mn à 100 V dans le tampon TBE, et les ARN sont visualisés sous lampe UV.

8- Mesure de l'activité luciférase

8.1- Construction des vecteurs

Pour ces expériences, nous avons utilisé trois vecteurs contenant le gène reporter de la luciférase :

- le pGL3 basic (pGL3b, 4800 pb) : c'est un vecteur dans lequel il manque les séquences promotrices et activatrices eucaryotes. Nous l'avons construit à partir du vecteur -1076CD4p.

- le pGL3 contrôle (pGL3c, 5256 pb) : ce vecteur contient les séquences promotrices et activatrices de SV-40 et il est généralement utilisé pour vérifier l'efficacité de la transfection. Nous l'avons obtenu chez Proméga.

- le -1076CD4p : c'est le vecteur pGL3b dans lequel le promoteur du CD4 humain a été inséré. Il nous a été donné par le Dr. Flamand (Centre de recherche du CHUL et de l'Université de Laval, Québec, Canada).

8.1.1- Le vecteur -1076CD4p

Flamand et coll. (1998) ont cloné le promoteur du CD4 par une approche PCR. Après consultation de la séquence publiée (Genbank n°U01066), deux oligonucléotides ont été synthétisés (S: 5'-ATTACTGCAGCCTCAACTTCCTGGGCTC-3', AS: 5'-TTCCTTCTGGAGAGTCGTGCT-3') et utilisés pour amplifier un fragment d'environ 1100 pb de l'ADN génomique des cellules Jurkat. Les extrémités des fragments obtenus ont été traitées à la T4 polynucléotides kinase et insérées au niveau du site *Sma* I dans le site de polyclonage du vecteur pGL3b (Proméga) pour générer le construit -1076CD4p (figure 39, page 144).

8.1.2- Le vecteur pGL3b

Afin d'éliminer le promoteur du CD4, le plasmide -1076CD4p (5,9 kb) a subi une hydrolyse par les enzymes de restriction *Sac* I et *Bgl* II (Eurogentec) pendant 2 h 30 à 37°C dans 20 µl de tampon contenant 3 µl d'ADN plasmidique, 5 U de chaque enzyme, 2 µl de tampon 10X (Tris-HCl 10 mM pH 8, MgCl₂ 5 mM, NaCl 100 mM, SAB 0,1 mg/ml) et 1 µl de ribonucléase. L'insert (1,1 kb) et le plasmide (4,8 kb) ainsi obtenus ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose, et l'ADN plasmidique a été extrait du gel en utilisant le système GeneClean (Bio 101). Les extrémités du fragment isolé ont subi l'action de la terminale transférase TdT (Gibco-BRL) (5 µl d'ADN, 10 µl de tampon TdT 5X, 5 µl de dXTP 10 mM, 2 µl d'enzyme qsp 50 µl) pendant 1 h à 37°C pour obtenir des bouts francs. La ligation a ensuite été effectuée en présence de T4 DNA ligase à l'aide du kit TA Cloning (Invitrogen) (figure 39, page 144).

8.2- Production des vecteurs

8.2.1- Transformation des bactéries

Les bactéries DH5-α sont cultivées dans du milieu LB (10 g de tryptone, 5 g d'extrait de levure, 5 g de NaCl, et 333 µl de NaOH 5 M pour 1 l), et rendues compétentes par la

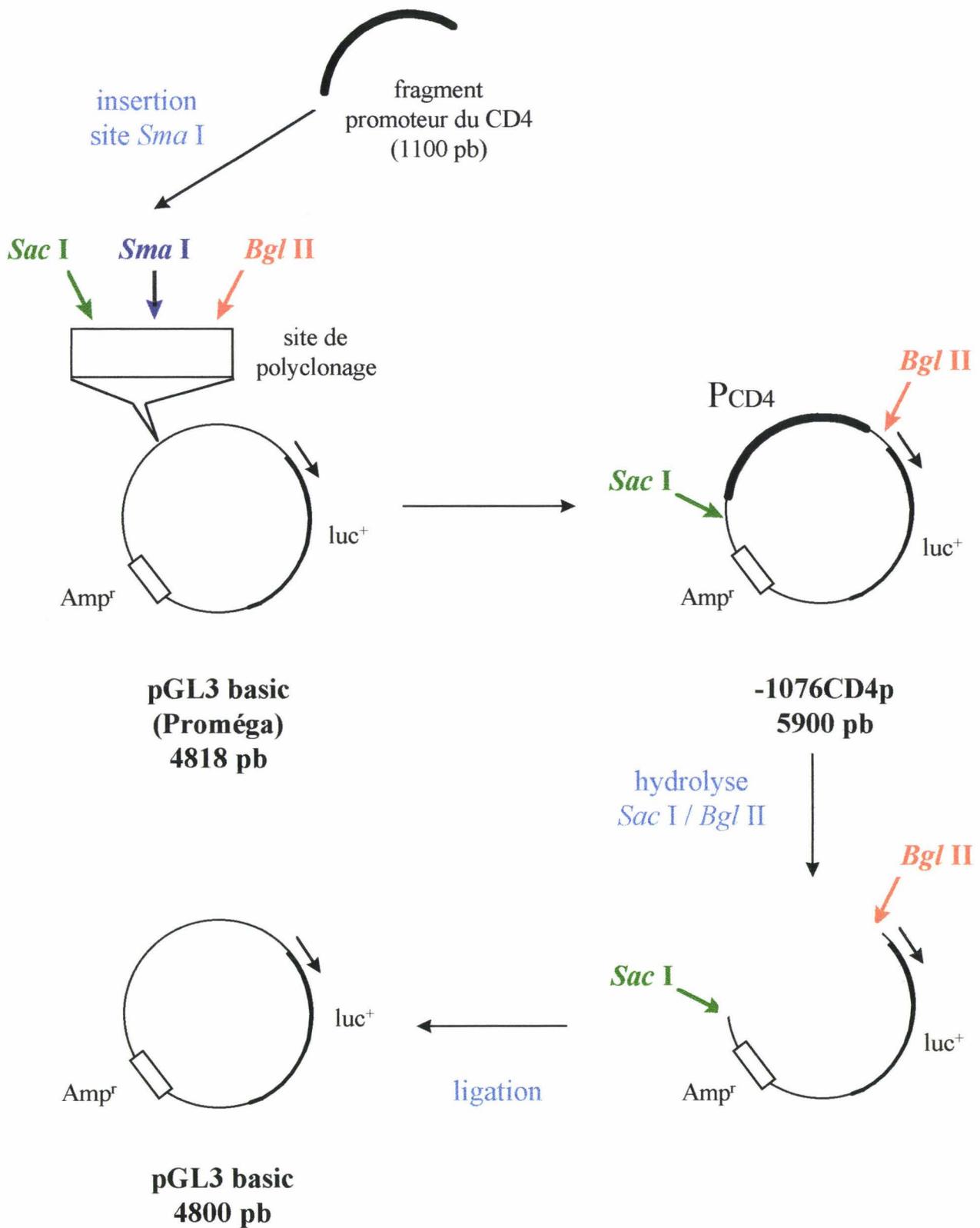


Figure 39: Construction des vecteurs -1076CD4p (Flamand *et al.*, 1998) et pGL3b.

technique au chlorure de rubidium (Protocols and Applications Guide, Proméga). La suspension bactérienne (50 µl) est mise en présence de 100 ng de plasmide pendant 30 mn sur la glace. Elle subit ensuite un choc thermique de 45 s à 42°C, puis est aussitôt replacée sur la glace. Les bactéries sont remises en culture liquide dans du milieu LB pendant 1 h à 37°C sous agitation, puis étalées sur milieu gélosé (milieu LB, agarose 15 g/l), contenant 50 µg/ml d'ampicilline.

8.2.2- *Production des plasmides*

Les bactéries contenant l'ADN plasmidique d'intérêt sont cultivées en milieu LB-ampicilline 50 µg/ml, et amplifiées jusqu'à obtention d'un volume de 250 ml. Après 10 mn de centrifugation à 6000 t/mn, les bactéries sont lysées à 4°C dans 4,5 ml de tampon Tris 25 mM pH 8, EDTA 10 mM, glucose 50 mM, et 9 ml de NaOH 0,2 N, SDS 1 %. Après incubation avec 6 ml d'acétate de sodium 3 M pendant 15 mn à 4°C, les débris cellulaires sont éliminés par 10 mn de centrifugation à 10000 t/mn. Les acides nucléiques contenus dans le surnageant sont précipités par addition d'un volume d'isopropanol, suivie d'une agitation pendant 15 mn, puis centrifugation 10 mn à 10000 t/mn. Le culot est égoutté et dissous dans 3,95 ml de tampon Tris 10 mM pH 8, EDTA 1 mM, NaCl 100 mM contenant 4,26 g de CsCl et 0,05 ml de BET. La solution est introduite dans un tube à centrifuger VTI 65 (Beckman), puis centrifugée une nuit à 45000 t/mn. L'anneau rouge constitué d'ADN plasmidique est récupéré, et le BET en est extrait par addition d'un volume d'isopropanol saturé en CsCl. Cette opération est répétée 4 à 5 fois sur la phase inférieure jusqu'à disparition de la coloration rouge. Les sels présents dans la solution d'ADN sont ensuite éliminés par dialyse pendant 24 h à température ambiante contre plusieurs bains de tampon Tris 10 mM pH 8, EDTA 1 mM, NaCl 10 mM. Le plasmide est finalement précipité par addition d'1/10 volume d'acétate de sodium 3 M et 2,5 volumes d'éthanol. La solution est placée 30 mn à -20°C et centrifugée 20 mn à 10000 t/mn. Après lavage à l'éthanol par centrifugation, et séchage au Speed-Vac, le culot d'ADN plasmidique est resuspendu dans de l'eau.

La contamination éventuelle par de l'ARN bactérien est vérifiée par dépôt et migration sur gel d'agarose d'une aliquote de la solution obtenue.

8.3- Transfection des cellules Jurkat par électroporation

Les cellules Jurkat (5×10^6) sont lavées et concentrées dans 400 μ l de milieu RPMI et mises en présence de 15 μ g d'ADN plasmidique pendant 1 mn 30. Les cellules sont placées dans une cuve d'électroporation (EquiBio) contenant 400 μ l de milieu, et subissent un choc électrique (200 V, 1500 μ F) dans un électroporateur (Easyject). Après électroporation, les cellules sont remises en culture pendant une nuit dans 5 ml de RPMI complet. La lactoferrine (10 μ g/ml) est ajoutée dans le milieu pendant 48 h, et les cellules sont centrifugées et lysées dans 150 μ l de tampon de lyse (Proméga) pendant 2 h à 4°C. Après élimination des membranes et débris cellulaires par centrifugation (15 mn à 10000 t/mn), une aliquote (20 μ l) du surnageant est prélevée et mise en présence de 40 μ l de luciférine, substrat de la luciférase. La mesure de l'activité luciférase est effectuée dans un luminomètre (T20/20, Turner Design) par lecture de la luminescence émise.

Bibliographie

A

- Adeyemi E.O., Campos L.B., Loizou S., Walport M.J., Hodgson H.J. (1990). Plasma lactoferrin and neutrophil elastase in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Br J Rheumatol*, **29** : 15-20.
- Aisen P., Listowsky I. (1980). Iron transport and storage proteins. *Annu Rev Biochem*, **49** : 357-393.
- Akiyama T., Ishida J., Nakagawa S., Ogawara H., Watanabe S., Itoh N., Shibuya M., Fukami Y. (1987). Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J Biol Chem*, **262** : 5592-5595.
- Alberola-Ila J., Forbush K.A., Seger R., Krebs E.G., Perimutter R.M. (1995). Selective requirement for MAP kinase activation in thymocyte differentiation. *Nature*, **373** : 620-623.
- 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.
- Amalric F., Bouche G., Bonnet H., Brethenou P., Roman A.M., Truchet I., Quarto N. (1994). Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) in the nucleus : translocation process and targets. *Biochem Pharmacol*, **47** : 111-115.
- 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 S.J., Levin S.D., Perlmutter R.M. (1994). Involvement of the protein tyrosine kinase p56lck in T cell signaling and thymocyte development. *Adv Immunol*, **56** : 151-178.
- Ansari-Lari M.A., Muzny D.M., Lu J., Lu F., Lilley C.E., Spanos S., Malley T., Gibbs R.A. (1996). A gene-rich cluster between the CD4 and triosephosphate isomerase genes at human chromosome 12p13. *Genome Res*, **6** : 314-326.
- 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.
- Arao S., Matsuura S., Nonomura M., Miki K., Kabasawa K., Nakanishi H. (1999). Measurement of urinary lactoferrin as a marker of urinary tract infection. *J Clin Microbiol*, **37** : 553-557.

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

Baeuerle P.A. (1995). Transcriptional activators. Enter a polypeptide messenger. *Nature*, **373** : 661-662.

Bagby Gc J.R., Rigas V.D., Bennett R.M., Vandebark 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.

Baggiolini M., de Duve C., Masson P.L., Heremans J.F. (1970). Association of lactoferrin with specific granules in rabbit heterophil leukocytes. *J Exp Med*, **131** : 559-570.

Bainton D.F., Ulliyot J.L., Farquhar M.G. (1971). The development of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes in human bone marrow. *J Exp Med*, **134** : 907-934.

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., Day C.L., Haridas M., Norris G.E., Rumball S.V., Smith C.A., Thomas D.H. (1994). Three-dimensional structure of lactoferrin in various functional states. *Adv Exp Med Biol*, **357** : 1-12.

Baker E.N., Anderson B.F., Baker H.M., MacGillivray R.T., Moore S.A., Peterson N.A., Shewry S.C., Tweedie J.W. (1998). Three-dimensional structure of lactoferrin. Implications for function, including comparisons with transferrin. *Adv Exp Med Biol*, **443** : 1-14.

Basson M.A., Bommhardt U., Mee P.J., Tybulewicz V.L., Zamoyska R. (1998). Molecular requirements for lineage commitment in the thymus--antibody-mediated receptor engagements reveal a central role for lck in lineage decisions. *Immunol Rev*, **165** : 181-194.

Baveye S., Ellass E., Mazurier J., Spik G., Legrand D. (1999). Lactoferrin: a multifunctional glycoprotein involved in the modulation of the inflammatory process. *Clin Chem Lab Med*, **37** : 281-286.

Baveye S., Ellass E., Mazurier J., Legrand D. (2000). Lactoferrin inhibits the binding of lipopolysaccharides to L-selectin and subsequent production of reactive oxygen species by neutrophils. *Febs Lett*, **469** : 5-8.

Baynes R., Bezwoda W., Bothwell T., Khan Q., Mansoor N. (1986a). The non-immune inflammatory response: serial changes in plasma iron, iron-binding capacity, lactoferrin, ferritin and C-reactive protein. *Scand J Clin Lab Invest*, **46** : 695-704.

- Baynes R.D., Bezwoda W.R., Khan Q., Mansoor N. (1986b). Relationship of plasma lactoferrin content to neutrophil regeneration and bone marrow infusion. *Scand J Haematol*, **36** : 79-84.
- Bennatt D.J., McAbee D.D. (1997). Identification and isolation of a 45-kDa calcium-dependent lactoferrin receptor from rat hepatocytes. *Biochemistry*, **36** : 8359-8366.
- Bennatt D.J., Ling Y.Y., McAbee D.D. (1997). Isolated rat hepatocytes bind lactoferrins by the RHL-1 subunit of the asialoglycoprotein receptor in a galactose-independent manner. *Biochemistry*, **36** : 8367-8376.
- Bennett 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. (1982). Lactoferrin interacts with deoxyribonucleic acid: a preferential reactivity with double-stranded DNA and dissociation of DNA-anti-DNA complexes. *J Lab Clin Med*, **99** : 127-138.
- Bennett R.M., Kokocinski T. (1979). Lactoferrin turnover in man. *Clin Sci*, **57** : 453-460.
- 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., Eddie-Quartey A.C., Holt P.J. (1973). Lactoferrin-an iron binding protein in synovial fluid. *Arthritis Rheum*, **16** : 186-190.
- Berridge M.J., Irvine R.F. (1987). Inositol phosphate and all signaling. *Nature*, **341** : 197-205.
- 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.
- 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., Ostergaard Kristensen L. (1984). Lactoferrin receptors in normal and leukaemic human blood cells. *Scand J Haematol*, **33** : 275-280.
- Biserte G., Havez R., Cuvelier R. (1963). Glycoprotéines des sécrétions bronchiques. *Exp. Annu Biochem Med*, **25**: 85-120.

- Blackberg L., Hernell O. (1980). Isolation of lactoferrin from human whey by a single chromatographic step. *Febs Lett*, **109** : 180-183.
- Blum M.D., Wong G.T., Higgins K.M., Sunshine M.J., Lacy E. (1993). Reconstitution of the subclass-specific expression of CD4 in thymocytes and peripheral T cells of transgenic mice: identification of a human CD4 enhancer. *J Exp Med*, **177** : 1343-1358.
- Bokemeyer D., Sorokin A., Dunn M.J. (1996). Multiple intracellular MAP kinase signaling cascades. *Kidney Int*, **49** : 1187-1198.
- Bommhardt U., Basson M.A., Krummrei U., Zamoyska R. (1999). Activation of the extracellular signal-related kinase mitogen-activated protein kinase pathway discriminates CD4 versus CD8 lineage commitment in the thymus. *J Immunol*, **163** : 715-722.
- Boulton T.G., Nye S.H., Robbins D.J., Ip N.Y., Radziejewska E., Morgenbesser S.D., Depinho R.A., Panayotatos N., Cobb M.H., Yancopoulos G.D. (1991). ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell*, **65** : 663-675.
- Bowman B.H., Yang F.M., Adrian G.S. (1988). Transferrin: evolution and genetic regulation of expression. *Adv Genet*, **25** : 1-38.
- 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.
- Boyum A. (1976). Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages. *Scand J Immunol*, **Suppl 5** : 9-15.
- 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.
- Breitman T.R., Collins S.J., Keene B.R. (1981). Terminal differentiation of human promyelocytic leukemic cells in primary culture in response to retinoic acid. *Blood*, **57** : 1000-1004.
- Broekhuysse R.M. (1974). Tear lactoferrin: a bacteriostatic and complexing protein. *Invest Ophthalmol*, **13** : 550-554.
- Brown M.S., Herz ., Kowal R.C., Goldstein J.L. (1991). *Curr Opin Lipidology*, **2**: 65-72.
- Broxmeyer H.E., Williams D.E. (1988). The production of myeloid blood cells and their regulation during health and disease. *Crit Rev Oncol Hematol*, **8** : 173-226.
- 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., Bicknell D.C., Gillis S., Harris E.L., Pelus L.M., Sledge Gw J.R. (1986). Lactoferrin: affinity purification from human milk and polymorphonuclear neutrophils using monoclonal antibody (II 2C) to human lactoferrin, development of an immunoradiometric assay using II 2C, and myelopoietic regulation and receptor-binding characteristics. *Blood Cells*, **11** : 429-446.
- Bruniquel D., Borie N., Triebel F. (1997). Genomic organization of the human LAG-3/CD4 locus. *Immunogenetics*, **47** : 96-98.
- Brunner K.T., Mauel J., Cerottini J.C., Chapuis B. (1968). Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on ⁵¹Cr-labelled allogeneic target cells in vitro; inhibition by isoantibody and by drugs. *Immunology*, **14** : 181-196.
- 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.
- 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.
- Buday L., Egan S.E., Rodriguez Viciano P., Cantrell D.A., Downward J. (1994). A complex of Grb2 adaptor protein, Sos exchange factor, and a 36-kDa membrane-bound tyrosine phosphoprotein is implicated in ras activation in T cells. *J Biol Chem*, **269** : 9019-9023.
- 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 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.
- Cantrell D.A. (1996). T cell antigen receptor signal transduction pathways. *Cancer Surv*, **27** : 165-175.
- Chan S., Correia-Neves M., Benoist C., Mathis D. (1998). CD4/CD8 lineage commitment: matching fate with competence. *Immunol Rev*, **165** : 195-207.
- Chandrasekaran E.V., Davidson E.A. (1979). Glycosaminoglycans of normal and malignant cultured human mammary cells. *Cancer Res*, **39** : 870-880.
- Chen F., Chen D., Rothenberg E.V. (1999). Specific regulation of fos family transcription factors in thymocytes at two developmental checkpoints. *Int Immunol*, **11** : 677-688.

- Chéron A., Mazurier J., 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.
- Clevers H., Van de Wetering M. (1997). TCF/LEF factor earn their wings. *Trends Genet*, **13** : 485-489.
- Clevers H., Alarcon B., Wileman T., Terhorst C. (1988). The T cell receptor/CD3 complex: a dynamic protein ensemble. *Annu Rev Immunol*, **6** : 629-662.
- 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.
- Coddeville B., Strecker G., Wieruszkeski J.M., Vliegenthart J.F., Van Halbeek H., Peter-Katalinic J., Egge H., Spik G. (1992). Heterogeneity of bovine lactotransferrin glycans. Characterization of alpha-D-Galp-(1-->3)-beta-D-Gal- and alpha-NeuAc-(2-->6)-beta-D-GalpNAc- (1-->4)-beta-D-GlcNAc-substituted N-linked glycans. *Carbohydr Res*, **236** : 145-164.
- Colomb E., Pianetta C., Estevenon J.P., Guy O., Figarella C., Sarles H. (1976). Lactoferrin in human pancreas. Immunohistological localization in normal and pathological pancreatic tissues. *Digestion*, **14** : 242-249.
- Courtoy P.J., Moguilevsky N., Retegui L.A., Castracane C.E., Masson P.L. (1984). Uptake of lactoferrin by the liver. II. Endocytosis by sinusoidal cells. *Lab Invest*, **50** : 329-334.
- Cramer E., Pryzwansky K.B., Villeval J.L., Testa U., Breton-Gorius J. (1985). Ultrastructural localization of lactoferrin and myeloperoxidase in human neutrophils by immunogold. *Blood*, **65** : 423-432.
- Crews C.M., Erikson R.L. (1992). Purification of a murine protein-tyrosine/threonine kinase that phosphorylates and activates the Erk-1 gene product: relationship to the fission yeast byr1 gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89** : 8205-8209.
- 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., El Yazidi I., Mazurier J., Ellass-Rochard E., Duthille I., Spik G., Boilly-Marer Y. (1998a). Role of heparan sulphate proteoglycans in the regulation of human lactoferrin binding and activity in the MDA-MB-231 breast cancer cell line. *Eur J Cell Biol*, **77** : 344-351.
- Damiens E., Mazurier J., El Yazidi I., Masson M., Duthille I., Spik G., Boilly-Marer Y. (1998b). Effects of human lactoferrin on NK cell cytotoxicity against haematopoietic and epithelial tumour cells [In Process Citation. *Biochim Biophys Acta*, **1402** : 277-287.

- Damiens E., El Yazidi I., Mazurier J., Duthille I., Spik G., Boilly-Marer Y. (1999). Lactoferrin inhibits G1 cyclin-dependent kinases during growth arrest of human breast carcinoma cells. *J Cell Biochem*, **74** : 486-498.
- 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.
- 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.
- Dudley D.T., Pang L., Decker S.J., Bridges A.J., Saltiel A.R. (1995). A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92** : 7686-7689.
- Duncan RI J.R., 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.
- Duncan D.D., Adlam M., Siu G. (1996). Asymmetric redundancy in CD4 silencer function. *Immunity*, **4** : 301-311.

E

- 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.
- Ellison Rt 3.D., Giehl T.J. (1991). Killing of gram-negative bacteria by lactoferrin and lysozyme. *J Clin Invest*, **88** : 1080-1091.
- Ellmeier W., Sawada S., Littman D.R. (1999). The regulation of CD4 and CD8 coreceptor gene expression during T cell development. *Annu Rev Immunol*, **17** : 523-554.
- Esaguy N., Aguas A.P., Silva M.T. (1989). High-resolution localization of lactoferrin in human neutrophils: labeling of secondary granules and cell heterogeneity. *J Leukoc Biol*, **46** : 51-62.

F

- Faucheux B.A., Nillesse N., Damier P., Spik G., Mouatt-Prigent A., Pierce A., Leveugle B., Kubis N., Hauw J.J., Agid Y., Et A.L. (1995). Expression of lactoferrin receptors is increased in the mesencephalon of patients with Parkinson disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92** : 9603-9607.

- Fillebeen C., Dehouck B., Benaïssa M., Dhennin-Duthille I., Cecchelli R., Pierce A. (1999a). Tumor necrosis factor-alpha increases lactoferrin transcytosis through the blood-brain barrier. *J Neurochem*, **73** : 2491-2500.
- Fillebeen C., Descamps L., Dehouck M.P., Fenart L., Benaïssa M., Spik G., Cecchelli R., Pierce A. (1999b). Receptor-mediated transcytosis of lactoferrin through the blood-brain barrier. *J Biol Chem*, **274** : 7011-7017.
- Fillebeen C., Mitchell V., Dexter D., Benaïssa M., Beauvillain J., Spik G., Pierce A. (1999c). Lactoferrin is synthesized by mouse brain tissue and its expression is enhanced after MPTP treatment. *Mol Brain Res*, **72** : 183-194.
- Flamand L., Romerio F., Reitz M.S., Gallo R.C. (1998). CD4 promoter transactivation by human herpes virus 6. *J Virol*, **72** : 8797-8805.
- Franck S.J., Samelson L.E., Klausner R.D. (1990). The structure and signaling function of the invariant T cell receptor components. *Semin Immunol*, **2** : 89-97.
- Fukami M., Stierna P., Veress B., Carlsoo B. (1993). Lysozyme and lactoferrin in human maxillary sinus mucosa during chronic sinusitis. An immunohistochemical study. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, **250** : 133-139.

G

- 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.
- Geng K., Li Y., Bezault J., Furmanski P. (1998). Induction of lactoferrin expression in murine ES cells by retinoic acid and estrogen. *Exp Cell Res*, **245** : 214-220.
- Gnezditskaya E.V., Bukhova V.P., Beletskaya L.V., Zakharova N.A., Shakhanina K.N. (1985). Lactoferrin receptors on human thymic lymphocytes. Stimulation of expression by adenosine, theophylline, and supernatant of thymic lymphocytes. *Plenum Publishing Corporation*, **1** : 1547-1550.
- 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.
- Goretzki L., Mueller B.M. (1998). Low-density-lipoprotein-receptor-related protein (LRP) interacts with a GTP-binding protein. *Biochem J*, **336** : 381-386.
- 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.
- Greenberg S.M., Rosenthal D.S., Greeley T.A., Tantravahi R., Handin R.I. (1988). Characterization of a new megakaryocytic cell line: the Dami cell. *Blood*, **72** : 1968-1977.
- Groves M.L. (1960). The isolation of a red protein from milk. *J Am Chem Soc*, **82** : 3345-3350.

H

- 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.
- 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.
- 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.
- Harmon R.J., Schanbacher F.L., Ferguson L.C., Smith K.L. (1975). Concentration of lactoferrin in milk of normal lactating cows and changes occurring during mastitis. *Am J Vet Res*, **36** : 1001-1007.
- 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., Rumke P. (1969). The antigens of human seminal plasma. With special reference to lactoferrin as a spermatozoa-coating antigen. *Fertil 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.
- Hernandez-Hoyos G., Sohn S.J., Rothenberg E.V., Alberola-Ila J. (2000). Lck activity controls CD4/CD8 T cell lineage commitment. *Immunity*, **12** : 313-322.
- 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 (tokyo)*, **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.
- Horwitz D.A., Bakke A.C., Abo W., Nishiya K. (1984). Monocyte and NK cell cytotoxic activity in human adherent cell preparations: discriminating effects of interferon and lactoferrin. *J Immunol*, **132** : 2370-2374.
- Houghton M.R., Gracey M., Burke V., Bottrell C., Spargo R.M. (1985). Breast milk lactoferrin levels in relation to maternal nutritional status. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, **4** : 230-233.

- 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.
- Hu X., Moscinski L.C., Valkov N.I., Fisher A.B., Hill B.J., Zuckerman K.S. (2000). Prolonged activation of the mitogen-activated protein kinase pathway is required for macrophage-like differentiation of a human myeloid leukemic cell line. *Cell Growth Differ*, **11** : 191-200.
- Hu G.F., Xu C.J., Riordan J.F. (2000). Human angiogenin is rapidly translocated to the nucleus of human umbilical vein endothelial cells and binds to DNA. *J Cell Biochem*, **76** : 452-462.
- 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.
- Hurley W.L., Hegarty H.M., Metzler J.T. (1994). In vitro inhibition of mammary cell growth by lactoferrin: a comparative study. *Life Sci*, **55** : 1955-1963.
- Hutchens T.W., Magnuson J.S., Yip T.T. (1989). Interaction of human lactoferrin with DNA: one-step purification by affinity chromatography on single-stranded DNA-agarose. *Pediatr Res*, **26** : 618-622.

I

- Iigo M., Kuhara T., Ushida Y., Sekine K., Moore M.A., Tsuda H. (1999). Inhibitory effects of bovine lactoferrin on colon carcinoma 26 lung metastasis in mice. *Clin Exp Metastas*, **17** : 35-40.
- Imber M.J., Pizzo S.V. (1983). Clearance and binding of native and defucosylated lactoferrin. *Biochem J*, **212** : 249-257.
- Inoue M., Yamada J., Kitamura N., Shimazaki K., Andren A., Yamashita T. (1993). Immunohistochemical localization of lactoferrin in bovine exocrine glands. *Tissue Cell*, **25** : 791-797.
- Isobe K., Sakurami T., Isobe Y. (1978). Studies on iron transport in human intestine by immunoperoxidase technique. I. The localization of ferritin, lactoferrin and transferrin in human duodenal mucosa. *Nippon Ketsueki Gakkai Zasshi*, **41** : 1328-1333.
- Iwashima M., Irving B.A., Van Oers N.S., Chan A.C., Weiss A. (1994). Sequential interactions of the TCR with two distinct cytoplasmic tyrosine kinases. *Science*, **263** : 1136-1139.

J

- Jackson L.R., Bush S.J., Cardin A.D. (1991). *Physiol Rev*, **71**: 481-539.

- Jameson G.B., Anderson B.F., Norris G.E., Thomas D.H., Baker E.N. (1998). Structure of human apolactoferrin at 2.0 Å resolution. Refinement and analysis of ligand-induced conformational change. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **54** : 1319-1335.
- Jobbagy A., Kiraly K. (1966). Chemical characterization of fluorescein isothiocyanate-protein conjugates. *Biochim Biophys Acta*, **124** : 166-175.
- Johansson B.G. (1960). Isolation of an iron-containing red protein from human milk. *Acta Chem Scand*, **14** : 510-512.
- Johnston J.J., Boxer L.A., Berliner N. (1992a). Correlation of messenger RNA levels with protein defects in specific granule deficiency. *Blood*, **80** : 2088-2091.
- Johnston J.J., Rintels P., Chung J., Sather J., Benz Ej J.R., Berliner N. (1992b). Lactoferrin gene promoter: structural integrity and nonexpression in HL60 cells. *Blood*, **79** : 2998-3006.

K

- Kanyshkova T.G., Semenov D.V., Buneva V.N., Nevinsky G.A. (1999). Human milk lactoferrin binds two DNA molecules with different affinities. *Febs Lett*, **451** : 235-237.
- Karle H., Hansen N.E., Malmquist J., Karle A.K., Larsson I. (1979). Turnover of human lactoferrin in the rabbit. *Scand J Haematol*, **23**: 303-312.
- Keller K.M., Brauer P.R., Keller J.M. (1989). Modulation of cell surface heparan sulfate structure by growth of cells in the presence of chlorate. *Biochemistry*, **28** : 8100-8107.
- 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.
- Kim S.J., Yu D.Y., Pak K.W., Jeong S., Kim S.W., Lee K.K. (1998). Structure of the human lactoferrin gene and its chromosomal localization. *Mol Cells*, **8** : 663-668.
- Kontinen Y.T., Reitamo S. (1979). Localization of lactoferrin in polymorphonuclear neutrophil leucocytes. *Br J Haematol*, **43** : 481.
- Krieger M., Herz J. (1994). Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP). *Annu Rev Biochem*, **63** : 601-637.
- 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

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

- 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.
- 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., Montreuil J., Spik G. (1988). Structure and spatial conformation of the iron-binding sites of transferrins. *Biochimie*, **70** : 1185-1195.
- Legrand D., Mazurier J., Maes P., Rochard E., Montreuil J., Spik G. (1991). Inhibition of the specific binding of human lactotransferrin to human peripheral-blood 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.
- Levay 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 S.D., Abraham K.M., Anderson S.J., Forbush K.A., Perlmutter R.M. (1993). The protein tyrosine kinase p56lck regulates thymocyte development independently of its interaction with CD4 and CD8 coreceptors [corrected] [published erratum appears in J Exp Med 1993 Sep 1;178(3):1135. *J Exp Med*, **178** : 245-255.
- Li W., Keller G. (2000). VEGF nuclear accumulation correlates with phenotypical changes in endothelial cells. *J Cell Sci*, **113** : 1525-1534.
- 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 Ej J.R., 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., Iyer S. (1995). Lactoferrin: molecular structure and biological function. *Annu Rev Nutr*, **15** : 93-110.
- Lozzio C.B., Lozzio B.B. (1975). Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood*, **45** : 321-334.
- 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

- 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.
- Mariathasan S., Jones R.G., Ohashi P.S. (1999). Signals involved in thymocyte positive and negative selection. *Semin Immunol*, **11** : 263-272.
- Marshall C.J. (1995). Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell*, **80** : 179-185.
- Martins C.A., Fonteles M.G., Barrett L.J., Guerrant R.L. (1995). Correlation of lactoferrin with neutrophilic inflammation in body fluids. *Clin Diagn Lab Immunol*, **2** : 763-765.
- Mason D.Y., Taylor C.R. (1978). Distribution of transferrin, ferritin, and lactoferrin in human tissues. *J Clin Pathol*, **31** : 316-327.
- Masson P.L., Heremans J.F. (1971). Lactoferrin in milk from different species. *Comp Biochem Physiol [B]*, **39** : 119-129.
- Masson P.L., 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., Prignot J.J., Wauters G. (1966). Immunohistochemical localization and bacteriostatic properties of an iron-binding protein from bronchial mucus. *Thorax*, **21** : 538-544.

- 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., Schonne E. (1969). Lactoferrin, an iron-binding protein in neutrophilic leukocytes. *J Exp Med*, **130** : 643-658.
- Mazurier J., Spik G. (1980). Comparative study of the iron-binding properties of human transferrins. I. Complete and sequential iron saturation and desaturation of the lactotransferrin. *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., 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. (1995). Isolated rat hepatocytes acquire iron from lactoferrin by endocytosis. *Biochem J*, **311** : 603-609.
- 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., Ling Y.Y. (1997). Iron-loading of cultured adult rat hepatocytes reversibly enhances lactoferrin binding and endocytosis. *J Cell Physiol*, **171** : 75-86.
- 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.
- 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., Auld P.W., Alexander H.D. (1991). Lactoferrin inducible monocyte cytotoxicity defective in esterase deficient monocytes. *Br J Haematol*, **77** : 287-290.
- Mead P.E., Tweedie J.W. (1990). cDNA and protein sequence of bovine lactoferrin. *Nucleic Acids Res*, **18** : 7167.
- 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.
- Michie A.M., Trop S., Wiest D.L., Zunigapflucker J.C. (1999). Extracellular signal-regulated kinase (Erk) activation by the pre-T cell receptor in developing thymocytes in vivo. *J Exp Med*, **190** : 1647-1655.

- Mincheva-Nilsson L., Hammarstrom S., Hammarstrom M.L. (1997). Activated human gamma delta T lymphocytes express functional lactoferrin receptors. *Scand J Immunol*, **46** : 609-618.
- Mitchell R.A., Metz C.N., Peng T., Bucala R. (1999). Sustained mitogen-activated protein kinase (MAPK) and cytoplasmic phospholipase A2 activation by macrophage migration inhibitory factor (MIF). Regulatory role in cell proliferation and glucocorticoid action. *J Biol Chem*, **274** : 18100-18106.
- Miyauchi Y. (1984). Distribution and subcellular localization of lactoferrin in human tissues with special references 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.
- 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.
- Moguilevsky N., Retegui L.A., Masson P.L. (1985). Comparison of human lactoferrins from milk and neutrophilic leucocytes. Relative molecular mass, isoelectric point, iron-binding properties and uptake by the liver. *Biochem J*, **229** : 353-359.
- Montreuil J., Tonnelat J., Mullet S. (1960). Préparation et propriétés de la lactosidérophiline (lactotransferrine) du lait de femme. *Biochim. Biophys. Acta*, **45** : 413-421.
- Moore S.A., Anderson B.F., Groom C.R., Haridas M., Baker E.N. (1997). Three-dimensional structure of diferric bovine lactoferrin at 2.8 Å resolution. *J Mol Biol*, **274** : 222-236.
- Morrison D.K., Heidecker G., Rapp U.R., Copeland T.D. (1993). Identification of the major phosphorylation sites of the Raf-1 kinase. *J Biol Chem*, **268** : 17309-17316.
- Murre C., McCaw P.S., Vaessin H., Caudy M., Jan L.Y., Jan Y.N., Cabrera C.V., Buskin J.N., Hauschka S.D., Lassar A.B., Et A.L. (1989). Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell*, **58** : 537-544.

N

- Nagasawa T., Kiyosawa I., Kuwahara K. (1972). Amounts of lactoferrin in human colostrum and milk. *J Dairy Sci*, **55** : 1651-1659.
- 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 U S A*, **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.S., Huebers H.A. (1990). Iron is not required in the lactoferrin stimulation of thymidine incorporation into the DNA of rat crypt enterocytes. *Pediatr Res*, **27** : 525-528.
- 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.
- Nishizuka Y. (1986). Studies and perspectives of protein kinase C. *Science*, **233** : 305-312.
- Nuijens J.H., Abbink J.J., Wachtfogel Y.T., Colman R.W., Eerenberg A.J., Dors D., Kamp A.J., Strack Van Schijndel R.J., Thijs L.G., Hack C.E. (1992). Plasma elastase alpha 1-antitrypsin and lactoferrin in sepsis: evidence for neutrophils as mediators in fatal sepsis. *J Lab Clin Med*, **119** : 159-168.

O

- 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.
- Olofsson T., Olsson I., Venge P. (1977). Myeloperoxidase and lactoferrin of blood neutrophils and plasma in chronic granulocytic leukaemia. *Scand J Haematol*, **18** : 113-120.
- 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.
- Orkin S.H. (1989). Molecular genetics of chronic granulomatous disease. *Annu Rev Immunol*, **7** : 277-307.
- Orsini M.J., Krymskaya V.P., Eszterhas A.J., Benovic J.L., Panettieri R.A., Penn R.B. (1999). MAPK superfamily activation in human airway smooth muscle: mitogenesis requires prolonged p42/p44 activation. *Amer J Physiol-Lung Cell M Ph*, **21** : L479-L488.

P

- Pakdaman R., Petitjean M., El Hage Chahine J.M. (1998). Transferrins--a mechanism for iron uptake by lactoferrin. *Eur J Biochem*, **254** : 144-153.

- 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.
- Pardoll D.M., Topalian S.L. (1998). The role of CD4+ T cell responses in antitumor immunity. *Curr Opin Immunol*, **10** : 588-594.
- Park D.J., Rho H.W., Rhee S.G. (1991). CD3 stimulation causes phosphorylation of phospholipase C-gamma 1 on serine and tyrosine residues in a human T-cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88** : 5453-5456.
- Partiseti M., Le Deist F., Hivroz C., Fischer A., Korn H., Choquet D. (1994). The calcium current activated by T cell receptor and store depletion in human lymphocytes is absent in a primary immunodeficiency. *J Biol Chem*, **269** : 32327-32335.
- Peen E., Johansson A., Engquist M., Skogh T. (1998). Hepatic and extrahepatic clearance of circulating human lactoferrin: an experimental study in rat. *Eur J Haematol*, **61** : 151-159.
- 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., Garre 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.
- Pierce A., Colavizza D., Benaissa M., Maes P., Tartar A., Montreuil J., Spik G. (1991). Molecular cloning and sequence analysis of bovine lactotransferrin. *Eur J Biochem*, **196** : 177-184.
- Powell M.J., Ogden J.E. (1990). Nucleotide sequence of human lactoferrin cDNA. *Nucleic Acids Res*, **18** : 4013.

R

- Rado T.A., Bollekens J., St Laurent G., Parker L., Benz Ej J.R. (1984). Lactoferrin biosynthesis during granulocytopenia. *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.
- Rebello I., Carvalho-Guerra F., Pereira-Leite L., Quintanilha A. (1995). Lactoferrin as a sensitive blood marker of neutrophil activation in normal pregnancies. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, **62** : 189-194.
- Regoeczi E., Chindemi P.A., Debanne M.T., Prieels J.P. (1985). Lactoferrin catabolism in the rat liver. *Am J Physiol*, **248** : G8-14.

- 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.
- 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., Crepin M., Montreuil J., Spik G. (1992). Characterization of lactotransferrin receptor in epithelial cell lines from non-malignant human breast, benign mastopathies and breast carcinomas. *Anticancer Res*, **12** : 2047-2051.

S

- Saito T., Watanabe N. (1998). Positive and negative thymocyte selection. *Crit Rev Immunol*, **18** : 359-370.
- 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.
- Salmon P., Giovane A., Wasyluk B., Klatzmann D. (1993). Characterization of the human CD4 gene promoter: transcription from the CD4 gene core promoter is tissue-specific and is activated by Ets proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90** : 7739-7743.
- Sanchez L., Aranda P., Perez M.D., Calvo M. (1988). Concentration of lactoferrin and transferrin throughout lactation in cow's colostrum and milk. *Biol Chem Hoppe Seyler*, **369** : 1005-1008.
- 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.
- Sawada S., Littman D.R. (1991). Identification and characterization of a T-cell-specific enhancer adjacent to the murine CD4 gene. *Mol Cell Biol*, **11** : 5506-5515.
- Sawada S., Littman D.R. (1993). A heterodimer of HEB and an E12-related protein interacts with the CD4 enhancer and regulates its activity in T-cell lines. *Mol Cell Biol*, **13** : 5620-5628.
- Sawada S., Scarborough J.D., Killeen N., Littman D.R. (1994). A lineage-specific transcriptional silencer regulates CD4 gene expression during T lymphocyte development. *Cell*, **77** : 917-929.
- Sebzda E., Mariathasan S., Ohteki T., Jones R., Bachmann M.F., Ohashi P.S. (1999). Selection of the T cell repertoire. *Annu Rev Immunol*, **17** : 829-874.
- Seger R., Ahn N.G., Boulton T.G., Yancopoulos G.D., Panayotatos N., Radziejewska E., Ericsson L., Bratlien R.L., Cobb M.H., Krebs E.G. (1991). Microtubule-associated protein 2 kinases, ERK1 and ERK2, undergo autophosphorylation on both tyrosine and threonine residues: implications for their mechanism of activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88** : 6142-6146.

- Seger R., Seger D., Reszka A.A., Munar E.S., Eldar-Finkelman H., Dobrowolska G., Jensen A.M., Campbell J.S., Fischer E.H., Krebs E.G. (1994). Overexpression of mitogen-activated protein kinase kinase (MAPKK) and its mutants in NIH 3T3 cells. Evidence that MAPKK involvement in cellular proliferation is regulated by phosphorylation of serine residues in its kinase subdomains VII and VIII. *J Biol Chem*, **269** : 25699-25709.
- Sekine K., Ushida Y., Kuhara T., Iigo M., Baba-Toriyama H., Moore M.A., Murakoshi M., Satomi Y., Nishino H., Kakizoe T., Tsuda H. (1997a). 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.
- 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. (1997b). Inhibition of azoxymethane-initiated colon tumor by bovine lactoferrin administration in F344 rats. *Jpn J Cancer Res*, **88** : 523-526.
- Sergeant N., Lyon M., Rudland P.S., Fernig D.G., Delehedde M. (2000). Stimulation of DNA synthesis and cell proliferation of human mammary myoepithelial-like cells by hepatocyte growth Factor/Scatter factor depends on heparan sulfate proteoglycans and sustained phosphorylation of mitogen-activated protein kinases p42/44. *J Biol Chem*, **275** : 17094-17099.
- Shao H., Kono D.H., Chen L.Y., Rubin E.M., Kaye J. (1997). Induction of the early growth response (Egr) family of transcription factors during thymic selection. *J Exp Med*, **185** : 731-744.
- Sharp L.L., Schwarz D.A., Bott C.M., Marshall C.J., Hedrick S.M. (1997). The influence of the MAPK pathway on T cell lineage commitment. *Immunity*, **7** : 609-618.
- 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.
- 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 T. (1996). Promoter-specific activation of mouse lactoferrin gene by epidermal growth factor involves two adjacent regulatory elements. *Mol Endocrinol*, **10** : 732-741.
- Shi H.P., Zhang Z.P., Wang X., Liu S.G., Teng C.T. (1999). Isolation and characterization of a gene encoding human kruppel-like factor 5 (iklf): binding to the caat/gt box of the mouse lactoferrin gene promoter. *Nucl Acid Res*, **27** : 4807-4815.
- Shimazaki K., Tazume T., Uji K., Tanaka M., Kumura H., Mikawa K., Shimo-Oka T. (1998). Properties of a heparin-binding peptide derived from bovine lactoferrin. *J Dairy Sci*, **81** : 2841-2849.
- 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 U S A*, **94** : 2198-2203.
- Sitaram M.P., McAbee D.D. (1997). Isolated rat hepatocytes differentially bind and internalize bovine lactoferrin N- and C-lobes. *Biochem J*, **323** : 815-822.
- Sitaram M.P., Moloney B., McAbee D.D. (1998). Prokaryotic expression of bovine lactoferrin deletion mutants that bind to the Ca²⁺-dependent lactoferrin receptor on isolated rat hepatocytes. *Protein Express Purif*, **14** : 229-236.
- Siu G., Wurster A.L., Duncan D.D., Soliman T.M., Hedrick S.M. (1994). A transcriptional silencer controls the developmental expression of the CD4 gene. *Embo J*, **13** : 3570-3579.
- Sørensen M. and Sørensen S.P.L. (1939). The protein in wey. *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.
- Spik G., Strecker G., Fournet B., Bouquelet S., Montreuil J., Dorland L., Van Halbeek H., Vliegenthart J.F. (1982). Primary structure of the glycans from human lactotransferrin. *Eur J Biochem*, **121** : 413-419.
- Spik G., Coddeville B., Montreuil J. (1988). Comparative study of the primary structures of sero-, lacto- and ovotransferrin glycans from different species. *Biochimie*, **70** : 1459-1469.
- Straus D.B., Weiss A. (1992). Genetic evidence for the involvement of the lck tyrosine kinase in signal transduction through the T cell antigen receptor. *Cell*, **70** : 585-593.
- Streb H., Irvine R.F., Berridge M.J., Schulz I. (1983). Release of Ca²⁺ from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-trisphosphate. *Nature*, **306** : 67-69.
- Sugawara T., Moriguchi T., Nishida E., Takahama Y. (1998). Differential roles of ERK and p38 MAP kinase pathways in positive and negative selection of T lymphocytes. *Immunity*, **9** : 565-574.
- 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.
- Szamel M., Resch K. (1995). T-cell antigen receptor-induced signal-transduction pathways--activation and function of protein kinases C in T lymphocytes. *Eur J Biochem*, **228** : 1-15.

T

- Talhok R.S., Neiswander R.L., Schanbacher F.L. (1998). Effect of substratum on growth, cell morphology and lactoferrin synthesis and secretion in bovine mammary cell culture. *Tissue Cell*, **30** : 226-235.
- Tanaka T., Omata Y., Isamida T., Saito A., Shimazaki K., Yamauchi K., Suzuki N. (1998). Growth inhibitory effect of bovine lactoferrin to *Toxoplasma gondii* tachyzoites in murine macrophages: tyrosine phosphorylation in murine macrophages induced by bovine lactoferrin. *J Vet Med Sci*, **60** : 369-371.
- Teng C.T. (1995). Mouse lactoferrin gene: a marker for estrogen and epidermal growth factor. *Environ Health Perspect*, **103 Suppl 7** : 17-20.
- Teng C.T. (1999). Regulation of lactoferrin gene expression by estrogen and epidermal growth factor: molecular mechanism. *Cell Biochem Biophys*, **31** : 49-64.
- 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.
- Tobe K., Kadowaki T., Tamemoto H., Ueki K., Hara K., Koshio O., Momomura K., Gotoh Y., Nishida E., Akanuma Y., Et A.L. (1991). Insulin and 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate activation of two immunologically distinct myelin basic protein/microtubule-associated protein 2 (MBP/MAP2) kinases via de novo phosphorylation of threonine and tyrosine residues. *J Biol Chem*, **266** : 24793-24803.
- Towbin H., Staehelin T., Gordon J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA*, **76** : 4350-4354.
- Traverse S., Gomez N., Paterson H., Marshall C., Cohen P. (1992). Sustained activation of the mitogen-activated protein (MAP) kinase cascade may be required for differentiation of PC12 cells. Comparison of the effects of nerve growth factor and epidermal growth factor. *Biochem J*, **288** : 351-355.

U

- Ushida Y., Sekine K., Kuhara T., Takasuka N., Iigo M., Maeda M., Tsuda H. (1999). Possible chemopreventive effects of bovine lactoferrin on esophagus and lung carcinogenesis in the rat. *Jpn J Cancer Res*, **90** : 262-267.

V

- Valnes K., Brandtzaeg P., Elgjo K., Stave R. (1984). Specific and nonspecific humoral defense factors in the epithelium of normal and inflamed gastric mucosa. Immunohistochemical localization of immunoglobulins, secretory component, lysozyme, and lactoferrin. *Gastroenterology*, **86** : 402-412.
- Van Berkel P.H., Geerts M.E., Van Veen H.A., Kooiman P.M., Pieper F.R., de Boer H.A., Nuijens J.H. (1995). Glycosylated and unglycosylated human lactoferrins both bind iron and show identical affinities towards human lysozyme and bacterial lipopolysaccharide, but differ in their susceptibilities towards tryptic proteolysis. *Biochem J*, **312** : 107-114.
- 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 Berkel P.H., Geerts M.E., Van Veen H.A., Mericskay M., de Boer H.A., Nuijens J.H. (1997). N-terminal stretch Arg2, Arg3, Arg4 and Arg5 of human lactoferrin is essential for binding to heparin, bacterial lipopolysaccharide, human lysozyme and DNA. *Biochem J*, **328** : 145-151.
- Van Dijk M.C., Ziere G.J., Boers W., Linthorst C., Bijsterbosch M.K., Van Berkel T.J. (1991). Recognition of chylomicron remnants and beta-migrating very-low-density lipoproteins by the remnant receptor of parenchymal liver cells is distinct from the liver alpha 2-macroglobulin-recognition site. *Biochem J*, **279** : 863-870.
- Van Dijk M.C., Ziere G.J., Van Berkel T.J. (1992). Characterization of the chylomicron-remnant-recognition sites on parenchymal and Kupffer cells of rat liver. Selective inhibition of parenchymal cell recognition by lactoferrin. *Eur J Biochem*, **205** : 775-784.
- Van Leeuwen J.E., Samelson L.E. (1999). T cell antigen-receptor signal transduction. *Curr Opin Immunol*, **11** : 242-248.
- Van Snick J.L., Masson P.L. (1976). The binding of human lactoferrin to mouse peritoneal cells. *J Exp Med*, **144** : 1568-1580.
- Van Vugt H., Van Gool J., Ladiges N.C., Boers W. (1975). Lactoferrin in rabbit bile: its relation to iron metabolism. *Q J Exp Physiol Cogn Med Sci*, **60** : 79-88.
- 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.

W

- Wada T., Aiba Y., Shimizu K., Takagi A., Miwa T., Koga Y. (1999). The therapeutic effect of bovine lactoferrin in the host infected with *Helicobacter pylori*. *Scand J Gastroenterol*, **34** : 238-243.

- Walmer D.K., Wrona M.A., Hughes C.L., Nelson K.G. (1992). Lactoferrin expression in the mouse reproductive tract during the natural estrous cycle: correlation with circulating estradiol and progesterone. *Endocrinology*, **131** : 1458-1466.
- Ward P.P., Mendozameneses M., Mulacjericevic B., Cunningham G.A., Saucedocardenas O., Teng C.T., Conneely O.M. (1999). Restricted spatiotemporal expression of lactoferrin during murine embryonic development. *Endocrinology*, **140** : 1852-1860.
- Weil R., Cloutier J.F., Fournel M., Veillette A. (1995). Regulation of Zap-70 by Src family tyrosine protein kinases in an antigen-specific T-cell line. *J Biol Chem*, **270** : 2791-2799.
- Weiss A., Littman D.R. (1994). Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell*, **76** : 263-274.
- Wichmann L., Vaalasti A., Vaalasti T., Tuohimaa P. (1989). Localization of lactoferrin in the male reproductive tract. *Int J Androl*, **12** : 179-186.
- Wight T.N., Heinegard D.K., Hascall V.C. (1993). Cell Biology of the Extracellular Matrix (Hay E.D., ed) 2nd Ad., Plenum Press, New York.
- 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.
- Wu H.F., Monroe D.M., Church F.C. (1995). Characterization of the glycosaminoglycan-binding region of lactoferrin. *Arch Biochem Biophys*, **317** : 85-92.

Y

- Yamauchi K., Wakabayashi H., Hashimoto S., Teraguchi S., Hayasawa H., Tomita M. (1998). Effects of orally administered bovine lactoferrin on the immune system of healthy volunteers. *Adv Exp Med Biol*, **443** : 261-265.
- Yang N., Teng C.T. (1994). Identification of Coup-tf binding element in the human lactoferrin promoter. *Endocrine Journal*, **2** : 241-248.
- Yang N., Shigeta H., Shi H., Teng C.T. (1996). Estrogen-related receptor, hERR1, modulates estrogen receptor-mediated response of human lactoferrin gene promoter. *J Biol Chem*, **271** : 5795-5804.
- Yoo Y.C., Watanabe S., Watanabe R., Hata K., Shimazaki K., Azuma I. (1997). Bovine lactoferrin and lactoferricin, a peptide derived from bovine lactoferrin, inhibit tumor metastasis in mice. *Jpn J Cancer Res*, **88** : 184-190.

York R.D., Yao H., Dillon T., Ellig C.L., Eckert S.P., McCleskey E.W., Stork P.J. (1998). Rap1 mediates sustained MAP kinase activation induced by nerve growth factor. *Nature*, **392** : 622-626.

Z

Zheng C.F., Guan K.L. (1994). Activation of MEK family kinases requires phosphorylation of two conserved Ser/Thr residues. *Embo J*, **13** : 1123-1131.

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., Wlaszczyk A., Cheneau P., Brunel A.S., Mazurier J., Spik G., Kubler A. (1998). Immunoregulatory effects of a nutritional preparation containing bovine lactoferrin taken orally by healthy individuals. *Arch Immunol Ther Exp*, **46** : 231-240.

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

Zucali J.R., Broxmeyer H.E., Dinarello C.A., Gross M.A., Weiner R.S. (1987). Regulation of early human hematopoietic (BFU-E and CFU-GEMM) progenitor cells in vitro by interleukin 1-induced fibroblast-conditioned medium. *Blood*, **69** : 33-37.

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

Annexes

Lactoferrin upregulates the expression of CD4 antigen through the stimulation of the mitogen-activated protein kinase in the human lymphoblastic T Jurkat cell line.

Isabelle Dhennin-Duthille, Maryse Masson, Eve Damiens, Carine Fillebeen, Geneviève Spik and Joël Mazurier *

Laboratoire de Chimie Biologique, Unité Mixte de Recherche du Centre National de la Recherche Scientifique n°8576, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq cedex, France

Short title : Effect of lactoferrin on the CD4 expression

The abbreviations used are : MAP, mitogen-activated protein; MBP, myelin basic protein; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; MEK, MAP kinase kinase.

* To whom all correspondence should be addressed

Dr Joël Mazurier, Unité Mixte de Recherche du CNRS n°8576, Laboratoire de Chimie Biologique, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq cedex, France. tel : (33)320337239 ; fax : (33)320436555 ; email : joel.mazurier@univ-lille1.fr

ABSTRACT

The main biological properties of lactoferrin are thought to concern inflammation and immunomodulation processes, including maturation of immature B and T cells. Lactoferrin accelerates T-cell maturation by inducing the expression of the CD4 surface marker. In this report, using the Jurkat T-cell line, we have shown that lactoferrin upregulates the expression of CD4 antigen through the activation of a transduction pathway. Using an anti-phosphotyrosine antibody, lactoferrin was demonstrated to induce a cascade of phosphorylation of numerous proteins on their tyrosine residues. This tyrosine-phosphorylation was transient, reaching maxima between 5 and 10 min. We also identified the mitogen-activated protein kinase (MAP kinase) which presented an enhanced catalytic activity, reaching a maximum at 10 min of incubation with lactoferrin. Moreover, the use of inhibitors such as genistein and PD98059, tyrosine kinases and MAP kinase kinase (or MEK) inhibitors respectively, allowed us to correlate the activation of MAP kinase with the upregulation of CD4 expression. Finally, using Lck-defective Jurkat cells, our results showed that the p56^{lck} (Lck) kinase is necessary for MAP kinase activity and CD4 expression. This paper demonstrates that lactoferrin activates transduction pathway(s) in lymphoblastic T-cells, and that Lck and the Erk2 isoform of MAP kinase are implicated in the upregulation of CD4, induced by lactoferrin in these cells.

Key words: lactoferrin, Jurkat cells, maturation, CD4, MAP kinase, p56^{lck}.

Lactoferrin, also called lactotransferrin [Montreuil et al., 1960], an iron-binding glycoprotein produced by epithelial cells and neutrophilic leukocytes precursors, is found in most biological fluids [Masson et al., 1969]. Lactoferrin function involves more than simple chelation of iron. Lactoferrin has been shown to be involved in inflammatory, antitumoral and differentiation processes. In fact, this protein regulates the production of proinflammatory cytokines [Crouch et al., 1992; Sorimachi et al., 1997], and modulates the adhesive properties of leukocytes to the endothelial cells at inflammatory sites [Boxer et al., 1982; Kurose et al., 1994]. *In vivo* lactoferrin also reduces solid tumour growth and inhibits experimental metastasis [Bezault et al., 1994]. This seems to be due to the activation of the NK cells' cytotoxicity [Nishiya and Horwitz, 1982], and to the inhibition of the proliferation of tumoral cells [Damiens et al., 1998]. Indeed lactoferrin inhibits *in vitro* growth arrest of breast epithelial cancer cells at the G1 to S transition of the cell cycle by modulating the expression and activity of key regulatory proteins [Damiens et al., 1999]. Finally, lactoferrin accelerates the differentiation process of immature B- and T-lymphocytes: CD4⁻ CD8⁻ murine thymocytes acquired the CD4 antigen characteristic for the helper cell phenotype [Zimecki et al., 1991]. Similarly, in the presence of lactoferrin, murine splenic B cells show phenotypic changes in the ratio of surface IgM and IgD, which is characteristic of the maturation process [Zimecki et al., 1995]. Biological activities induced by lactoferrin depend on its target cells, and on the presence of specific binding proteins at their surface. Lactoferrin is a multifunctional protein which is able to specifically recognize the low density lipoprotein-receptor-related protein (LRP) [Ziere et al., 1992], the lymphocyte receptor [Mazurier et al., 1989], the asialoglycoproteins receptor [Bennatt et al., 1997] and proteoglycans [Mann et al., 1994].

Up to date, little is known concerning the intracellular molecular events triggered by lactoferrin in target cells. It was suggested that lactoferrin specifically interacts with DNA consensus sequences and acts as a transcription factor [He et Furmanski, 1995]. However it was recently

demonstrated that the binding of lactoferrin to LRP in hepatocytes stimulates a G protein-dependent signaling pathway [Goretzki et Mueller, 1998].

Until now, the involvement of transduction pathways in the mechanism by which lactoferrin affects immature T-cells has not been investigated. To gain further insights into the maturation of T-cells through the expression of CD4, we used the human lymphoblastic T Jurkat cell line. These cells, which express the lymphocyte receptor of lactoferrin [Bi et al., 1994; Legrand et al., 1997] and a low density of CD4 antigen at the cell surface, constitute a good model for our study. In the present paper we investigated the effects of lactoferrin on the expression of CD4 at the cell surface and on the tyrosine phosphorylation of cytosolic proteins. The catalytic activity of MAP kinase (also called extracellular signal-regulated kinase, or Erk) was also studied because of its key role in signal transduction from many receptors in response to their ligands. The MAP kinase activation was then correlated with the CD4 upregulation, using genistein, a tyrosine kinase inhibitor, and PD98059, a specific MEK inhibitor. Finally the implication of the p56^{lck} kinase in the CD4 expression induced by lactoferrin was investigated using a Lck-defective Jurkat cell line.

METHODS

Materials and antibodies

The Jurkat E6 lymphoblastic T-cell line and the J.CaM1.6 cell line, a mutant derivative of Jurkat which is defective in Lck kinase expression, were obtained from the ECACC. RPMI 1640 medium was from Gibco-BRL (Eragny, France) and bovine serum albumine (BSA) was from Boehringer Mannheim (Mannheim, Germany). Enhanced chemiluminescence system (ECL) was from Amersham (UK), DEAE Sepharose CL-6B was purchased from Pharmacia Biotech (Uppsala, Sweden), and PD98059 was from Calbiochem (Meudon, France). Myelin basic protein (MBP), protein kinase inhibitor (PKI), genistein, forskolin, polyclonal anti-MAP kinase and FITC-conjugated anti-mouse antibodies were from Sigma Chem. Co. (St Louis, MO, USA). Monoclonal anti-phosphotyrosine antibody (clone PY20, IgG2b) was from Transduction Laboratories (Lexington, KY, USA), monoclonal anti-P-Erk antibody (clone E10) was from New England Biolabs (Beverly, UK), whereas monoclonal anti-CD3 (clone X35, IgG2a), anti-CD4 (clone 13B8.2, IgG1 κ), and anti-CD71 (clone YDJ.1.2.2., IgG1) antibodies were from Immunotech (Marseille, France). Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-mouse and anti-rabbit antibodies were purchased from Sanofi-Pasteur (Steenvoorde, France) and Biosys (Compiègne, France) respectively.

Lactoferrin was prepared from pooled human lactoserum as described by Spik et al. [1982]. Purity of the protein was checked by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. Moreover, a saline shock was performed to remove lipopolysaccharides (LPS) bound to lactoferrin. Briefly lactoferrin was passed on a SP-sepharose fast flow column equilibrated in 0.1 M NaCl, followed by injection of 0.5 M NaCl onto the column. Human lactoferrin was then eluted with 2 M NaCl and desalted on PD10G25 column [Baveye et al., 2000]. LPS contamination of lactoferrin was less than 50 pg of endotoxin per mg of protein, as estimated by the Limulus amoebocyte lysate assay (QCL 1000, BioWhittaker).

Cell culture

Jurkat cells (E6 and CaM1.6) were routinely grown at 37°C in a humidified atmosphere under 5% CO₂ in RPMI 1640 medium pH 7.4, containing 5 µg/ml gentamycin, 2 mM L-glutamine, 20 mM Hepes and supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum. Cells were kept at logarithmic growth phase and used at a cell density of 6×10^5 /ml.

Evaluation of upregulation of CD4 antigen and cell cycle analysis

Cells were diluted at a density of 2×10^5 per ml and grown for 48 h in the presence of lactoferrin at concentrations ranging from 0 µg to 100 µg per ml. Expression of CD4 and CD71 antigens were measured at the cell surface and cell cycle analysis were performed every 24 h. Briefly, cells (6×10^5) were incubated for 1 h in 100 µl of phosphate buffered saline (PBS) with mouse monoclonal IgG against CD71 or CD4 antigens (diluted 1:25). Cells were then washed twice by centrifugation and incubated for 30 min with the secondary antibody of FITC-conjugated anti-mouse IgG (diluted 1:40). An isotype control (IgG1) was used to evaluate the non-specific binding of the antibody and the fluorescence intensity was measured using a FACScan flow cytometer (Becton and Dickinson, Sunnyvale, CA). The variation of CD4 density was calculated as follow : $(\text{mean of CD4} - \text{mean of isotype}) \times 100 / \text{mean of isotype}$.

For cell cycle analysis, cells (1×10^6) were fixed with cold 70% ethanol for 3 h on ice. Fixed cells were then stained at 37°C with propidium iodide (28 µg/ml) in the presence of RNase (28 µg/ml) for 45 min. After 2 washings in PBS, cells were analysed on FACScan using the cellFit software program (Becton and Dickinson).

Binding of fluorescent-labeled lactoferrin to the cells

The fluorescein labeling of lactoferrin was carried out through its glycan moiety using 5-(((2-(carbohydrazino) methyl) thio) acetyl) aminofluorescein (HyF) as previously described [Leveugle et al., 1993]. Cells (3×10^5) were incubated in 100 μ l of RPMI medium, containing 0.04% of sodium azide, with various concentrations of [HyF]-labeled lactoferrin ranging from 0 to 40 μ g/ml during 45 min at 4°C, and washed with the incubation buffer. Non-specific binding was measured in the presence of a 100 molar excess of unlabeled lactoferrin. The cells were analysed by flow cytometry, and the mean fluorescence variations were calculated from means of total (MT) and non-specific (MNS) fluorescent intensities as follow: $(MT - MNS) \times 100 / MNS$.

Cellular lysate

Jurkat T cells were incubated without or with lactoferrin (at time varying from 0 to 45 min and at concentrations ranging from 0 to 100 μ g/ml) in RPMI 1640 medium pH 7.4 containing 0.1% BSA, washed in PBS pH 7.4, and then lysed in ice cold lysing-buffer (155 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.6, 1% Triton X-100, 1% deoxycholate, 1 mM EGTA, 0.2 mM Na_3VO_4 , 100 mM NaF, 1 mM PMSF, 50 μ g/ml leupeptin, 200 μ M aprotinin) for 2 h at 4°C. Nuclei and insoluble matter were removed by centrifugation for 15 min at 13,000 g, before performing the P-Tyr immunostaining or the MAP kinase activity assays. For the P-Erk immunostaining, cells were incubated as described above but lysed in 20 % SDS buffer containing β -mercaptoethanol by heating for 10 min at 100°C.

Immunoblotting

Protein concentrations were determined using the BCA protein assay reagent with BSA as a standard (Pierce), and the lysates were separated on SDS-PAGE 10% and then transferred

electrophoretically onto nitrocellulose membranes. **P-Tyr immunostaining.** The blots were incubated for 1 h in Tris-buffered saline (TBS : 150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.6) containing 3% BSA and 0.1% Tween 20. Membranes were then incubated for 2 h at room temperature with primary anti-P-Tyr mouse monoclonal antibody (1 $\mu\text{g/ml}$) in TBS containing 0.1% BSA and 0.1% Tween 20, followed by washing in the same buffer without BSA. Blots were incubated with secondary antibody (HRP-conjugated anti-mouse IgG, 1 $\mu\text{g/ml}$) in TBS containing 0.1% Tween 20 for 1 h at room temperature, washed and then developed using the ECL system. **P-ERK immunostaining.** The blots were incubated for 1 h in TBS containing 0.1 % Tween 20 and 5 % non fat milk. Membranes were incubated for 2 h at room temperature with primary anti-P-Erk mouse monoclonal antibody (0.5 $\mu\text{g/ml}$) in TBS containing 0.1 % Tween 20 and 1 % non fat milk, washed and then incubated with HRP-conjugated anti-mouse IgG (0.5 $\mu\text{g/ml}$) for 1 h in the same buffer. For the MAP kinase detection, blots were incubated in the same conditions with primary anti-MAP kinase rabbit polyclonal antibody (3.1 $\mu\text{g/ml}$), followed by the HRP-conjugated anti-rabbit IgG (0.5 $\mu\text{g/ml}$). The different blots were then washed and developed using the ECL system.

Determination of MAP kinase activity on MBP

The "**minicolumn**" assay consisted in fractionating the cytosolic extracts on DEAE-Sepharose to estimate kinase activities. Briefly, DEAE Sepharose CL-6B resin (0.4 ml) was prepared in buffer A (50 mM β -glycerophosphate pH 7.3, 1.5 mM EGTA, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1 mM Na_3VO_4), and washed with buffer A added of 0.02 M NaCl. Cytosolic extracts (0.5 ml, 8×10^6) were loaded onto the minicolumn followed by two washes of buffer A containing 0.02 M NaCl. Then MAP kinase was eluted with 0.75 ml of buffer A added of 0.22 M NaCl. Finally, aliquots (6.25 μl) of the MAP kinase fraction were incubated with 2.1 μl of MBP (2 mg/ml) and 4.15 μl of buffer B (30 mM MgCl_2 , 4.5 mM DTT, 75 mM β -glycerophosphate pH 7.3,

0.15 mM Na₃VO₄, 6 μM PKI, 3.75 mM EGTA, 2.5 mg/ml BSA) containing 2 μCi of [γ -³²P] ATP. After 15 min at 30°C, an aliquot of 10 μl was spotted onto phosphocellulose paper squares and washed with 150 mM phosphoric acid. The substrate phosphorylation was quantified by β-counting (LKB, Beckman).

Immunoprecipitation of MAP kinase. The lysate (100 μl, 4 x 10⁶) was precleared by addition of 1 μl of non-immune rabbit serum for 12 h at 4°C, followed by incubation with 50 μl of 2% protein A-Sepharose for 30 min at 4°C. After centrifugation, the supernatant (140 μl) was added to 62 μg of polyclonal anti-MAP kinase antibody, 360 μl H₂O, 500 μl of 2X immunoprecipitation buffer (1X= 1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 10 mM Tris pH 7.4, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0.2 mM Na₃VO₄, 0.2 mM PMSF, 0.5% NP-40) and incubated for 1 h at 4°C. Protein A-Sepharose (50 μl, 2%) was then added for 30 min at 4°C. The pellet was washed two times by centrifugation with 1X immunoprecipitation buffer, one time with the minicolumn assay buffer B, and then incubated with 7.5 μl of MBP (2 mg/ml) and 12.5 μl of buffer B containing 2 μCi of [γ -³²P] ATP. After 15 min at 30°C the samples were heated at 100°C and the supernatants were separated on SDS-PAGE 15%. The gel was dried and submitted to an autoradiography.

RESULTS

Upregulation of CD4 antigen by lactoferrin

The density of CD4 surface antigen was analysed by flow cytometry. Incubation of untreated cells with anti-CD4 antibody resulted in greater levels of fluorescence (mean 379) than those detected with the isotype control (mean 356), demonstrating that Jurkat cells present a basal density of CD4 at their surface (Fig.1A). The basal expression of this marker was enhanced in the presence of lactoferrin (mean 407) after 48 h of treatment. This effect was dose-dependent, and an optimal increase (2.4 fold) was observed with a concentration of 10 µg/ml of lactoferrin (Fig.1B). In the same experimental conditions forskolin, which was previously shown to promote the CD4 gene transcription, was used as a positive control. We effectively observed that 10 µM of forskolin enhanced (about 4 fold) the CD4 density at the cell surface (data not shown). Moreover the increase of the CD4 antigen expression was neither accompanied by a variation of the density of CD71, a marker of proliferation, nor by a modification of the cells repartition in the different phases of the cycle (data not shown).

Throughout these experiments, we demonstrated that lactoferrin induces a dose-dependent expression of the CD4 antigen at the cell surface, with a maximum observed at a concentration of 10 µg/ml, without blocking the cell proliferation.

Time-dependence of the tyrosine-phosphorylation induced by lactoferrin

Since we observed that an optimal CD4 expression was obtained with 10 µg/ml of lactoferrin, the Jurkat T-cells were treated with this concentration of lactoferrin for various lengths of time, lysed, and P-Tyr polypeptides from total lysate were assayed by immunoblotting using an anti-P-Tyr monoclonal antibody. In untreated cells (Fig.2, first lane), we observed the presence of polypeptides, phosphorylated on tyrosine residues: p37, p52, p55, p67, p72, and p100. The increase of tyrosine-phosphorylation was rapidly detected after the addition of lactoferrin, and

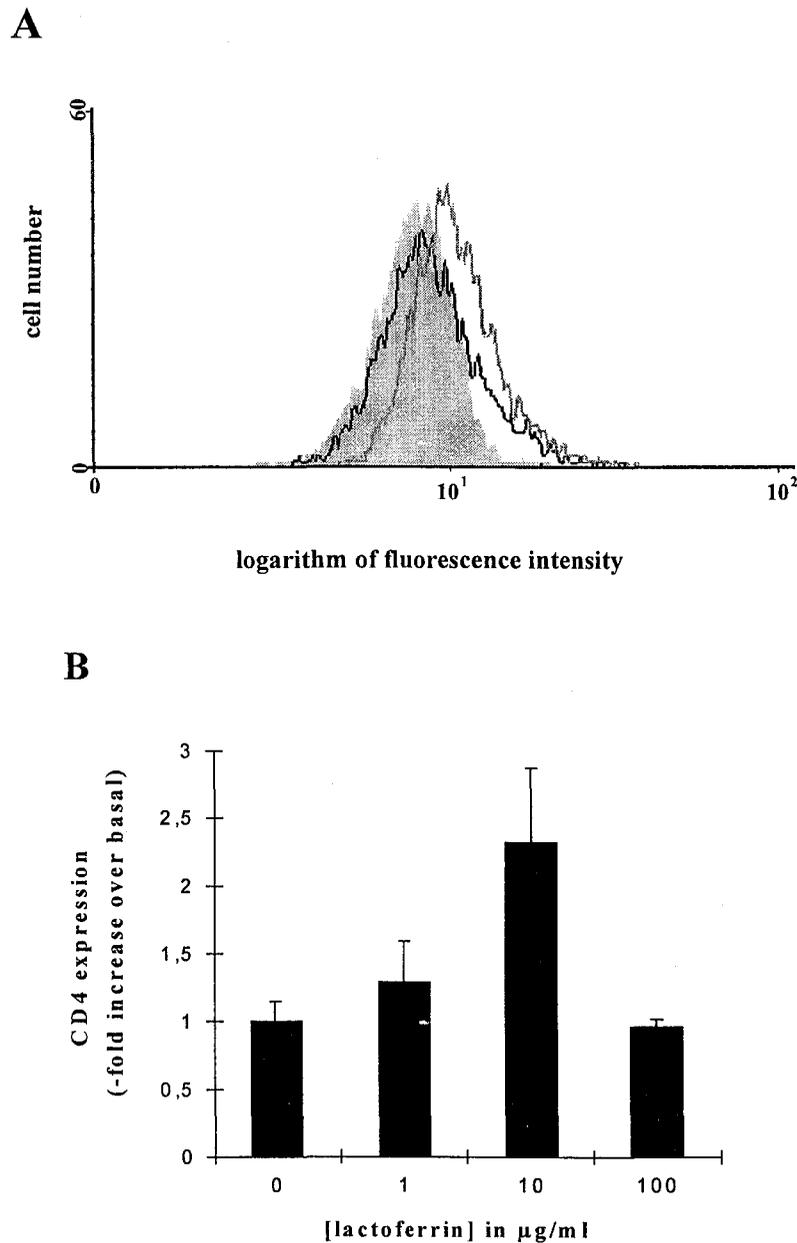


Fig.1. Regulation of the CD4 antigen by lactoferrin at the cell surface

(A) Effect of lactoferrin on CD4 surface density. Jurkat T cells (2×10^5) were cultured in complete RPMI medium under 5% CO_2 atmosphere, and treated with or without 10 $\mu\text{g/ml}$ of lactoferrin during 48 h. The CD4 antigen was detected using flow cytometry and data were expressed as variation of logarithm of fluorescence intensity: *filled peak*, isotype control; *open black peak*, CD4 antigen on untreated cells; *open grey peak*, CD4 antigen on treated cells. **(B) Dose-dependent effect of lactoferrin on CD4 expression.** Jurkat cells were treated for 48 h with different concentrations of lactoferrin before analysis of CD4 expression by flow cytometer. The variation of CD4 density was calculated as explained in "methods" and expressed as the average fold increase (lactoferrin-treated divided by untreated) for three independent experiments. The data is statistically significant ($P < 0.05$, Student's *t*-test).

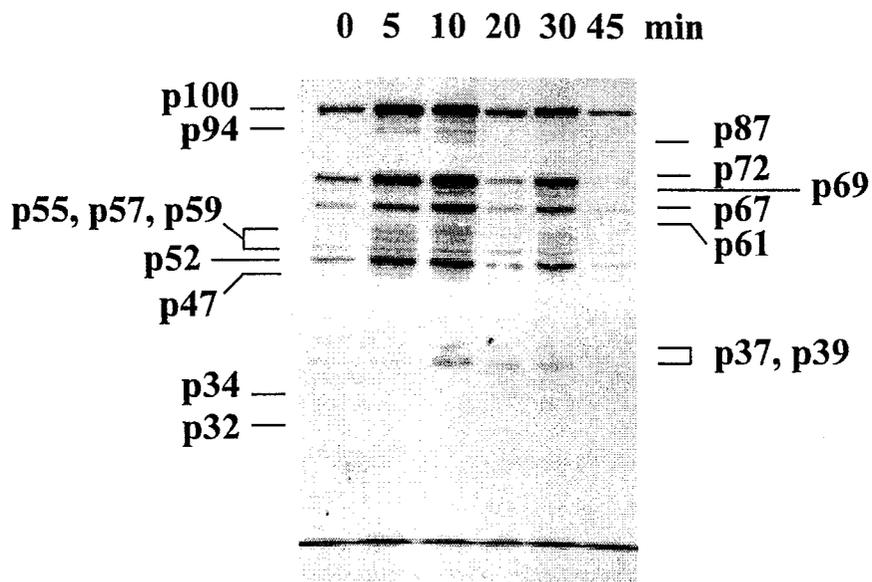


Fig.2. Tyrosine-phosphorylation induced by lactoferrin treatment

Jurkat T-cells (1×10^6) were incubated for the indicated times with $10 \mu\text{g/ml}$ of lactoferrin. Cells were lysed and analysed by SDS-PAGE in the presence of β -mercaptoethanol using a 10% acrylamide gel. Phosphorylated proteins were detected by Western Blotting using anti-P-Tyr antibody. This experiment was performed three times and we showed the most representative result, as well as the overexposition of the lower region of the blot.

was transient, reaching a maximum between 5 and 10 min (Fig.2). In fact, the P-Tyr proteins could be divided into three groups, based on the time at which phosphorylation reached a maximum. The first group (p47, p52, p55, p57, p59, p94 and p100) was rapidly phosphorylated, peaking between 5 and 10 min. The second group, which included the 37, 39, 61, 67, 69, 72 and 87 kDa proteins, clearly showed a maximal tyrosine-phosphorylation at 10 min. Whereas all these P-Tyr polypeptides returned to baseline levels by 20 min, the proteins of the third group (p32 and p34) were phosphorylated more slowly, reaching a maximum at about 20 min. We also observed that the phosphorylation of all the other polypeptides increased again at 30 min and decreased at 45 min.

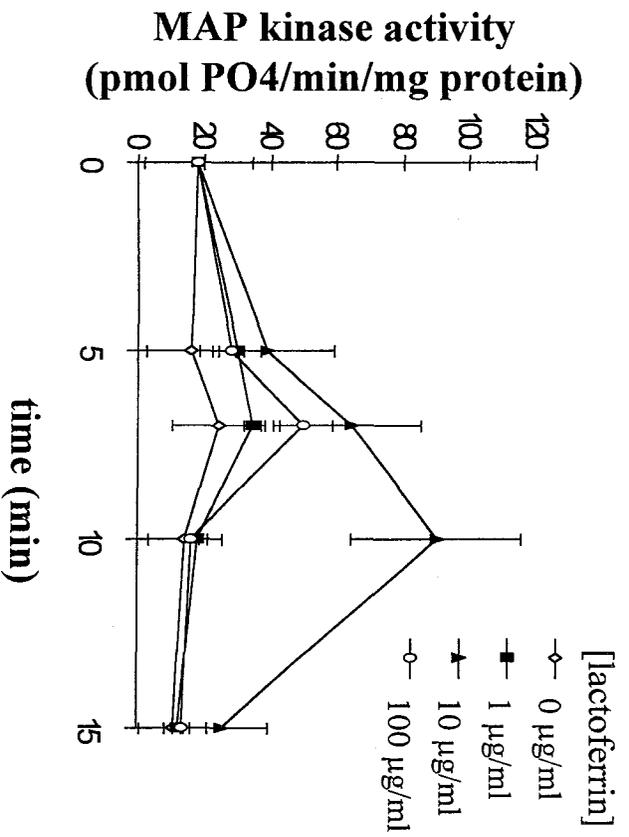
These results indicated that lactoferrin rapidly activates a cascade of phosphorylation of numerous cytosolic proteins on tyrosine residues, and that this event was time-dependent with a maximum of tyrosine-phosphorylated-proteins after 5 and 10 min of incubation with 10 µg/ml of lactoferrin.

MAP kinase is activated by lactoferrin treatment

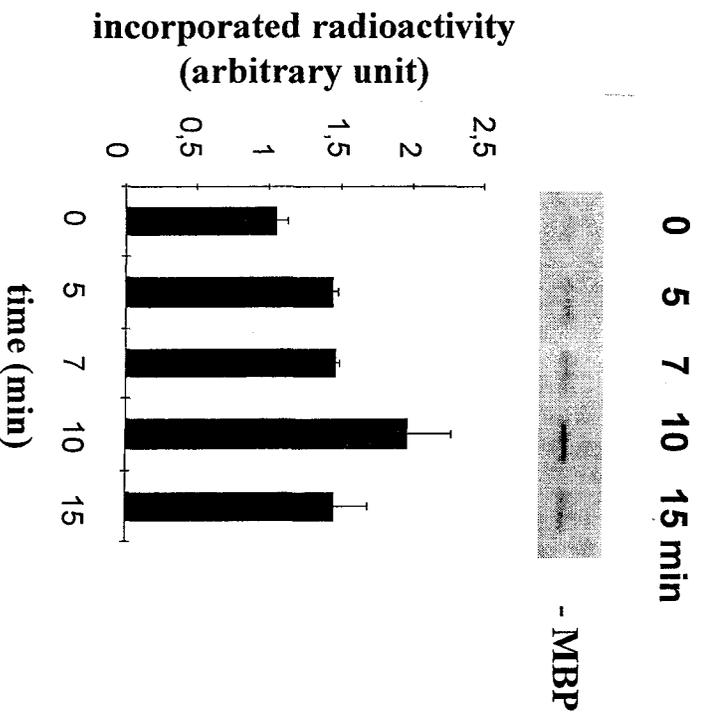
The large number of P-Tyr polypeptides consecutive to lactoferrin treatment led us to investigate the possible activation of the MAP kinase, an enzyme involved in several transduction pathways. MAP kinase activity was studied by analysing the ability of this enzyme to phosphorylate the myelin basic protein (MBP), one of its synthetic substrates.

Jurkat T cells were incubated with lactoferrin (0 to 100 µg/ml) for periods of time ranging from 0 to 15 min. At each time of lactoferrin treatment, MAP kinase enzyme was partially purified from Jurkat lysate, incubated with MBP and [γ -³²P]ATP, and the peptide substrate phosphorylation was measured by β -counting. The results in Fig.3A show a time- and dose-dependent phosphorylation of MBP : we observed that low (1 µg/ml) and high (100 µg/ml) concentrations of lactoferrin did not affect the kinase activity toward MBP, whereas the

A



B



C

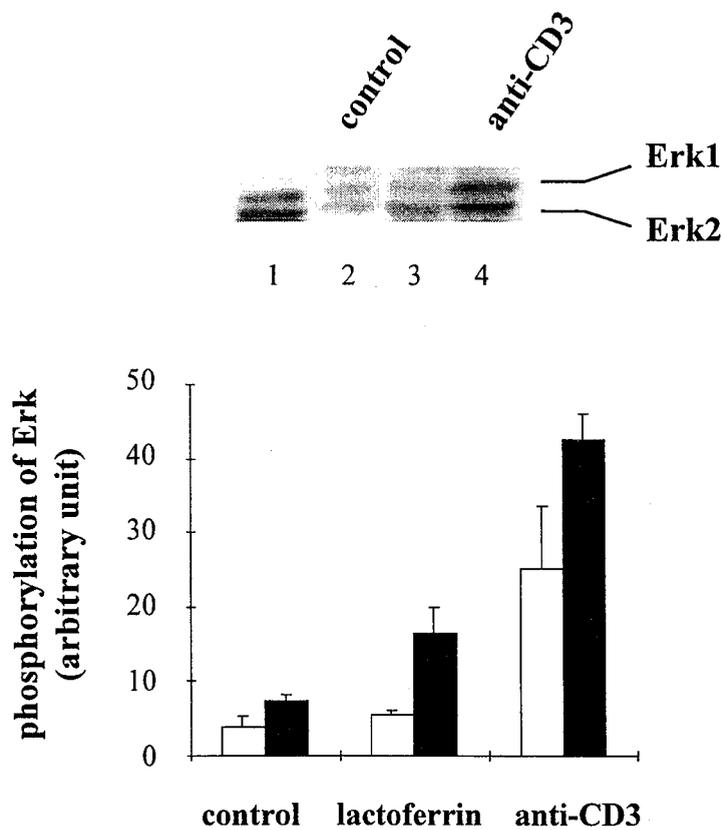


Fig.3. Stimulation of MAP kinase activity by lactoferrin

(A) *Phosphorylation of exogenous substrate using the "minicolumn assay"*. Jurkat cells (8×10^6) were incubated with lactoferrin (from 0 to 100 $\mu\text{g/ml}$) for increasing periods of time and lysed. MAP kinase activity was determined by phosphate ($[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$) incorporation into MBP using MAP kinase fractionated on DEAE Sepharose. Data were expressed as mean values of three separate experiments performed in duplicate. (B) *Immunoprecipitation of MAP kinase*. After treatment of Jurkat cells (4×10^6) for the indicated times, MAP kinase was immunoprecipitated from total lysate with a polyclonal antibody, incubated with MBP and $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, and subjected to SDS-PAGE using a 10% acrylamide gel. The gel was then analysed by autoradiography and the most representative experiment was shown. *Inset*, ^{32}P incorporation into the MBP substrate. The *graph* indicates the quantification of incorporated radioactivity expressed as the mean values of two experiments. (C) *Phosphorylation of MAP kinase isoforms*. Jurkat cells ($8 \cdot 10^6$) were incubated or not for 10 min with 10 $\mu\text{g/ml}$ of lactoferrin or 0.1 $\mu\text{g/ml}$ of anti-CD3. After cell lysis, proteins were separated by SDS-PAGE and detected by Western Blotting using an anti-MAP kinase antibody (lane 1) or an anti-P-Erk antibody (lanes 2-4). *Inset*, the most representative data was shown, and the *graph* expressed the mean values of the phosphorylated-Erk1 (white columns) or -Erk2 (black columns) of two distinct experiments.

concentration of 10 $\mu\text{g/ml}$ considerably increased the substrate phosphorylation. This effect reached a maximum after 10 min of treatment (4-5 fold) and rapidly returned to the baseline level. Then to confirm that this kinase activity was the MAP kinase activity, the enzyme was immunoprecipitated using a specific polyclonal antibody. The complex was then incubated with [γ - ^{32}P]ATP and MBP, and submitted to SDS-PAGE and autoradiography. The quantification of the radioactivity incorporated in the substrate (Fig.3B) indicated that the activity of MAP kinase towards the MBP was enhanced and reached a maximum after 10 min of incubation with 10 $\mu\text{g/ml}$ of lactoferrin.

Finally, the activated Erk isoform was identified by Western-Blotting using an antibody directed against the phosphorylated Erk1 and Erk2 isoforms of MAP kinase. These two isoforms were present at a constant level during lactoferrin treatment, Erk2 being more expressed than Erk1 (Fig.3C, lane 1). Erk2 was also the most phosphorylated in untreated Jurkat cells (Fig.3C, lane 2). Incubation of the cells during 10 min with the anti-CD3 antibody, as a positive control, caused a 6 fold increase of the phosphorylation of the two MAP kinase isoforms, whereas lactoferrin only induced the phosphorylation of Erk2 (2.2 fold) (Fig.3C, lane 3-4).

Taken together, these data showed that the enhanced catalytic activity of MAP kinase, which presented a maximum following 10 min of treatment with 10 $\mu\text{g/ml}$ of lactoferrin, was due to the phosphorylation and activation of Erk2, one of the MAP kinase isoforms.

Implication of MAP kinase in upregulation of CD4 antigen

In order to correlate tyrosine phosphorylation, MAP kinase activation and CD4 upregulation which were dose-dependent and maximal at the same concentration of 10 $\mu\text{g/ml}$ of lactoferrin, we investigated the effect of genistein and PD98059 inhibitors on these events. Jurkat cells

were pretreated for 45 min with inhibitors and lactoferrin was then added during 48 h for the CD4 detection or 10 min for the MAP kinase assay (Table 1).

Genistein, which affects several cellular processes, presented a dose-dependent cytotoxicity towards the Jurkat cells. Indeed the viability remained maximal upon 15 μM of genistein and concentrations beyond 30 μM appeared to be toxic (data not shown). Detection of the CD4 antigen by flow cytometry at the cell surface showed that the increase of the CD4 density by lactoferrin was inhibited (77 %) by pretreatment of the cells with 10 μM of genistein. At the same concentration, this inhibitor also caused 82 % inhibition of MAP kinase activity (Table 1). Conversely PD98059, which is a specific MAP kinase cascade inhibitor, did not affect the cell viability whatever the concentration was (from 0 to 100 μM), and presented an inhibitory effect on the CD4 expression. We noticed that CD4 upregulation due to lactoferrin was totally abolished by a dose of 10 μM of PD98059 (Table 1).

These experiments showed that MAP kinase stimulation by lactoferrin was abolished by 10 μM of genistein, and that the increase of CD4 density at the cell surface upon lactoferrin treatment was inhibited by both genistein and PD98059 at a concentration of 10 μM .

Role of Lck kinase in CD4 upregulation

The implication of Lck kinase, also called p56^{lck}, in CD4 upregulation and MAP kinase activation due to lactoferrin was investigated using the J.CaM1.6 cell line, a mutant derivative of Jurkat which are defective in Lck kinase expression. By flow cytometry using [HyF]-labeled lactoferrin at different concentrations, we first checked that the specific binding of lactoferrin was similar on the Jurkat and J.CaM1.6 cell lines (data not shown).

The effect of lactoferrin on the CD4 density at the surface of J.CaM1.6 was then studied. In untreated cells the fluorescent peak obtained with the anti-CD4 antibody (mean 359) was similar to those detected with the IgG1 isotype control (mean 354), showing that the J.CaM1.6

	CD4 expression				MAP kinase activity		
lactoferrin	-	+	+	+	-	+	+
genistein	-	-	-	+	-	-	+
PD98059	-	-	+	-	-	-	-
-fold increase	1	2.32	1.19	1.3	1	2.99	1.36
over basal	± 0.15	± 0.55	± 0.26	± 0.08	± 0.02	± 0.23	± 0.12

Table 1: Effect of inhibitors on CD4 expression and MAP kinase activity induced by lactoferrin.

Jurkat cells were pretreated with either genistein or PD98059 at the concentration of 10 μ M for 45 min. Lactoferrin (10 μ g/ml) was then added for 48 h or 10 min for the study of the CD4 expression and the MAP kinase activity respectively. The density of CD4 antigen was measured using flow cytometry and the data were expressed as the average fold increase for three independent experiments. The MAP kinase activity was performed using the "minicolumn assay" and the results were expressed as the mean values of two separate experiments performed in duplicate. The data presented in this table is statistically significant ($P < 0.05$, Student's *t*-test).

mutant cells did not present a basal density of CD4. Moreover the expression of this surface marker was not enhanced in the presence of 10 µg/ml of lactoferrin (mean 356) or 10 µM of forskolin (mean 353) (data not shown). Then, analysis of MAP kinase activity in J.CaM1.6 cells showed that lactoferrin produces an insignificant effect on the enzyme, compared to experiments performed in Jurkat cells (Fig.4). In the same way, treatment of the cells with 10 µM of forskolin did not stimulate MAP kinase in J.CaM1.6 cells, whereas it greatly enhanced the kinase activity in Jurkat cells.

Taken together, these observations demonstrated that, opposing to the Jurkat cells, lactoferrin binding to J.CaM1.6 cells induced neither the MAP kinase activity nor the expression of the CD4 antigen at their surface, suggesting that p56^{lck} kinase is necessary for the CD4 upregulation through the MAP kinase in response to lactoferrin stimulation.

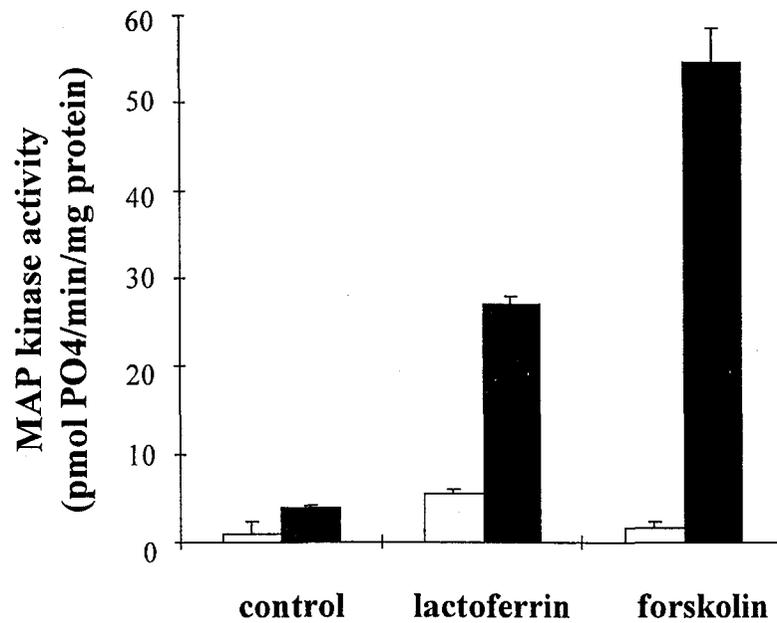


Fig.4. Effect of lactoferrin on MAP kinase activity in J.CaM1.6 cells

Jurkat cells (black columns) and J.CaM1.6 cells (white columns) were untreated or treated with lactoferrin (10 μ g/ml) or forskolin (10 μ M) during 10 min. MAP kinase activity was then analysed using the "mini-column assay", and the results were expressed as the mean values of two experiments performed in duplicate.

DISCUSSION

In this investigation, we elucidated a part of the mechanism by which lactoferrin affects CD4 expression during the process of T-cell maturation. We showed that lactoferrin binding on Jurkat T-cells induces one or several transduction pathway(s) involving protein kinases, such as p56^{lck} and MAP kinase, which control CD4 expression at the cell surface.

Lactoferrin has previously been described to present different effects on immature T-lymphocytes. In non-physiological conditions, in an iron-deprived medium, human lactoferrin increased the proliferation of phytohemagglutinin-stimulated lymphocytes and Jurkat cells [Mazurier et al., 1989; Bi et al., 1997]. Conversely, in the presence of 10% fetal calf serum (FCS) in culture medium, human lactoferrin has been shown to promote T-cell maturation by increasing the expression of CD4 surface antigen in double negative thymocytes and Jurkat cells [Zimecki et al, 1995; Bi et al., 1997]. In this report, using Jurkat cells as a model, we observed that the effect of lactoferrin on CD4 surface density was dose-dependent. Indeed, in a FCS-complemented medium, CD4 expression was upregulated with an optimal response after 48 h of incubation with 10 µg/ml of lactoferrin. Moreover this event is not accompanied by an arrest of the cell proliferation, suggested by the CD71 density and cell cycle analysis.

The early stages of signal transduction leading to the CD4 expression were next investigated and in particular the protein phosphorylation, one of the fundamental intracellular messengers involved in the signaling process. Our findings showed that lactoferrin increases the tyrosine-phosphorylation of numerous intracellular polypeptides, reaching a maximum at 5-10 min. The large number of substrates which were rapidly phosphorylated indicates that protein tyrosine kinases regulate several primary events in the signal transduction mechanism induced by lactoferrin in Jurkat cells. The second peak of phosphorylation occurring after 30 min may be due to the activation of the same transduction pathways by the recycled lactoferrin after endocytosis. Indeed, the binding of lactoferrin on Jurkat cells is followed by an internalization

of the ligand which is then recycled (60-70%) in the culture medium at each round of endocytosis [Bi et al., 1996].

The activity of MAP kinase, a key regulatory enzyme involved in the differentiation and proliferation process, was examined. Two complementary methods demonstrated that the treatment of the cells with lactoferrin (10 $\mu\text{g/ml}$ during 10 min) leads to rapid and transient increase of the MAP kinase activity towards the MBP, one of its specific substrates. The two isoforms of MAP kinase, p44^{Erk1} and p42^{Erk2} [Boulton et al., 1991], are present in Jurkat cells, as shown by their detection using a polyclonal antibody. The activation of these Erk species occurs through phosphorylation of the Tyr202 and Thr204 residues [Seger et al., 1991]. Using a specific antibody directed against the doubly phosphorylated Tyr and Thr of Erk1 and Erk2, we demonstrated that lactoferrin only induces the phosphorylation of Erk2. Moreover, the use of genistein, an inhibitor of tyrosine kinase [Akiyama et al., 1987], indicates that the tyrosine kinases are located upstream from MAP kinase activation and CD4 expression. Finally, experiments with PD98059, a selective inhibitor of the MAP kinase-activating enzyme, MEK [Dudley et al., 1995], confirms that MAP kinase is required for the signal transduction induced by lactoferrin, leading to the CD4 upregulation.

Our results, concerning the transient stimulation of MAP kinase associated with a normal cell cycle progression, are in agreement with previous observations dealing with the importance of the duration of MAP kinase activation for cell signaling decisions [Marshall, 1995; Yaka et al., 1998]. Indeed sustained stimulation of the MAP kinase cascade is required for MAP kinase translocation to the nucleus where it initiates the gene transcription events implied in differentiation, whereas transient MAP kinase activation is associated with proliferation. Moreover, our results concerning the implication of MAP kinase in the Jurkat T-cells maturation agrees with recent papers which demonstrated that the enzyme plays a crucial role in positive thymocyte selection [Alberola-Ila et al., 1995; Sugawara et al., 1998], and particularly

affects the CD4/CD8 lineage commitment by favoring the differentiation into the CD4 lineage [Sharp et al., 1997; Bommhardt et al., 1999].

We also identified a second protein involved in the CD4 expression due to lactoferrin : the p56^{lck}, a lymphocyte-specific protein kinase. Using the J.CaM1.6 cell line, a mutant cell line defective in Lck kinase expression [Straus and Weiss, 1992], we showed that binding of lactoferrin was not able to increase MAP kinase activity and cell surface CD4 density, suggesting that Lck is involved in the MAP kinase pathway leading to the maturation of Jurkat cells following lactoferrin treatment. Moreover the absence of the effect of forskolin, an activator of adenylate cyclase which is known to regulate the transcription of the CD4 gene [Flamand et al., 1998], on MAP kinase activity and on CD4 expression in J.CaM1.6 cells suggests that Lck kinase activation is not selective for lactoferrin signaling, but generally required for CD4 expression. The data concerning the implication of p56^{lck} in Jurkat T-cells maturation are in agreement with papers which demonstrated that the p56^{lck} kinase is not only involved in T-cell signaling, but also in thymocyte development. The Lck kinase is well known to be associated with the cytoplasmic tail of cell surface receptors, such as CD45, interleukine-2 receptor, CD4 and CD8, and to act on numerous substrates, including MAP kinase [reviewed by Anderson et al., 1994]. Independently of its association with the CD4 and CD8 coreceptors, p56^{lck} regulates thymocyte development [Levin et al., 1993]. Moreover a model of thymocyte differentiation was recently proposed, in which Lck activation leads to the maturation into the CD4 lineage [Basson et al., 1998].

Our hypothesis of the existence of a signal transduction induced by lactoferrin in Jurkat T-cells agrees with the internalization study which suggested that native lactoferrin is not imported into the nucleus of these lymphoblastic cells [Bi et al., 1996]. We therefore proposed, for this single effect of T-cell maturation, a different mechanism to those presented by He and Furmanski [1995]. These authors demonstrated the ability of lactoferrin to specifically interact with DNA

and to lead to transcriptional activation. This property requires the translocation of lactoferrin into the nucleus of target cells, where it acts as a transcription factor [Bauerle, 1995]. The mechanism by which lactoferrin is targeted to the nucleus is largely misunderstood. Indeed, there is no evidence that cell-surface lactoferrin receptors can transport lactoferrin either directly or via a new trafficking pathway to the nucleus. Moreover, Siebert and Huang [1997] recently identified and cloned an alternative form of human lactoferrin mRNA (Δ Lf mRNA), lacking the N-terminal signal peptide and containing sequences similar to nuclear targeting signals. The transcriptional nuclear activities of lactoferrin could be due to the protein encoded by the Δ Lf mRNA, whereas the role in immunomodulation and inflammation could be due to the secreted form of lactoferrin through the activation of the transduction pathway.

The molecular events that link the binding of lactoferrin, p56^{lck} stimulation, MAP kinase activation and CD4 expression still remain to be elucidated. Further experiments are necessary to identify the proteins phosphorylated on tyrosine residues in the first minutes following lactoferrin binding, and to analyse the modulation of the activity of the transcription factors involved in the transcription of the CD4 gene.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported in part by the Centre National de la Recherche Scientifique (Unité Mixte de Recherche n°8576, Glycobiologie structurale et fonctionnelle, director: Prof. A. Verbert), by the Université des Sciences et Technologies de Lille, and by a grant from the "Association pour la Recherche sur le Cancer" (contract n°3040). We are grateful to Dr. E. Ellass-Rochard for reviewing the manuscript.

REFERENCES

- Akiyama T, Ishida J, Nakagawa S, Ogawara H, Watanabe S, Itoh N, Shibuya M, Fukami Y. 1987. Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J Biol Chem* 262:5592-5595.
- Alberola-Ila J, Forbush KA, Seger R, Krebs EG, Perlmutter RM. 1995. Selective requirement for MAP kinase activation in thymocyte differentiation. *Nature* 373:620-623.
- Anderson SJ, Levin SD, Perlmutter RM. 1994. Involvement of the protein tyrosine kinase p56^{lck} in T cell signaling and thymocyte development. *Adv Immunol* 56:151-178.
- Baeuerle PA. 1995. Transcriptional activators. Enter a polypeptide messenger. *Nature* 373:661-662.
- Basson MA, Bommhardt U, Mee PJ, Tybulewicz VL, Zamoyska R. 1998. Molecular requirements for lineage commitment in the thymus- antibody- mediated receptor engagements reveal a central role for lck in lineage decisions. *Immunol Rev* 165:181-194.
- Baveye S, Ellass E, Mazurier J, Legrand D. 2000. Lactoferrin inhibits the binding of lipopolysaccharides to L-selectin and subsequent production of reactive oxygen species by neutrophils. *FEBS Lett* 469:5-8.
- Bennett DJ, Ling YY, McAbee DD. 1997. Isolated rat hepatocytes bind lactoferrins by the RHL-1 subunit of the asialoglycoprotein receptor in a galactose-independent manner. *Biochemistry* 36:8367-8376.
- 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 BY, Leveugle B, Liu JL, Collard A, Coppe P, Roche AC, 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 BY, Liu JL, Legrand D, Roche AC, 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 BY, Lefebvre AM, 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.
- Bommhardt U, Basson MA, Krummrei U, Zamoyska R. 1999. Activation of the extracellular signal-related Kinase/Mitogen-activated protein kinase pathway discriminates CD4 versus

- CD8 lineage commitment in the thymus. *J Immunol* 163:715-722.
- Boulton TG, Nye SH, Robbins DJ, Ip NY, Radziejewska E, Morgenbesser SD, Depinho RA, Panayotatos N, Cobb MH, Yancopoulos GD. 1991. ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell* 65:663-675.
- Boxer LA, Haak RA, Yang HH, Wolach JB, Whitcomb JA, Butterick CJ, Baehner RL. 1982. Membrane-bound lactoferrin alters the surface properties of polymorphonuclear leukocytes. *J Clin Invest* 70:1049-1057.
- Crouch SP, Slater KJ, Fletcher J. 1992. Regulation of cytokine release from mononuclear cells by the iron-binding protein lactoferrin. *Blood* 80:235-240.
- Damiens E, Mazurier J, El Yazidi I, Masson M, Duthille I, Spik G, Boilly-Marer Y. 1998. Effects of human lactoferrin on NK cell cytotoxicity against haematopoietic and epithelial tumour cells. *Biochim Biophys Acta* 1402:277-287.
- Damiens E, El Yazidi I, Mazurier J, Duthille I, Spik G, Boilly-Marer Y. 1999. Lactoferrin inhibits G1 cyclin-dependent kinases during growth arrest of human breast carcinoma cells. *J Cell Biochem* 74:486-498.
- Dudley DT, Pang L, Decker SJ, Bridges AJ, Saltiel AR. 1995. A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:7686-7689.
- Flamand L, Romerio F, Reitz MS, Gallo RC. 1998. CD4 promoter transactivation by Human Herpes virus 6. *J Virol* 72:8797-8805.
- Goretzki L, Mueller BM. 1998. Low-density-lipoprotein-receptor-related protein (LRP) interacts with a GTP-binding protein. *Biochem J* 336:381-386.
- He J, Furmanski P. 1995. Sequence specificity and transcriptional activation in the binding of lactoferrin to DNA. *Nature* 373:721-724.
- Kurose I, Yamada T, Wolf R, Granger DN. 1994. P-selectin-dependent leukocyte recruitment and intestinal mucosal injury induced by lactoferrin. *J Leukoc Biol* 55:771-777.
- Legrand D, Van Berkel PH, Salmon V, Van Veen HA, Slomianny MC, Nuijens JH, 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.
- 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.

- Levin SD, Abraham KM, Anderson SJ, Forbush KA, Perlmutter RM. 1993. The protein tyrosine kinase p56^{lck} regulates thymocyte development independently of its interaction with CD4 and CD8 coreceptors. *J Exp Med* 178:245-255.
- Mann DM, Romm E, Migliorini M. 1994. Delineation of the glycosaminoglycan-binding site in the human inflammatory response protein lactoferrin. *J Biol Chem* 269:23661-23667.
- Marshall CJ. 1995. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* 80:179-185.
- Masson PL, Heremans JF, Schonke E. 1969. Lactoferrin, an iron-binding protein in neutrophilic leukocytes. *J Exp Med* 130:643-658.
- Mazurier J, Legrand D, Hu WL, 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.
- Montreuil J, Tonnelat J, Mullet S. 1960. Préparation et propriétés de la lactosidérophiline (lactotransferrine) du lait de femme. *Biochim Biophys Acta* 45:413-421.
- Nishiya K, Horwitz DA. 1982. Contrasting effects of lactoferrin on human lymphocyte and monocyte natural killer activity and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol* 129:2519-2523.
- Seger R, Ahn NG, Boulton TG, Yancopoulos GD, Panayotatos N, Radziejewska E, Ericsson L, Bratlien RL, Cobb MH, Krebs EG. 1991. Microtubule-associated protein 2 kinases, ERK1 and ERK2, undergo autophosphorylation on both tyrosine and threonine residues: implications for their mechanism of activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:6142-6146.
- Sharp LL, Schwarz DA, Bott CM, Marshall CJ, Hedrick SM. 1997. The influence of the MAPK pathway on T cell lineage commitment. *Immunity* 7:609-618.
- Siebert PD, Huang BC. 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.
- 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.
- Spik G, Strecker G, Fournet B, Bouquelet S, Montreuil J, Dorland L, Van Halbeek H, Vliegthart JF. 1982. Primary structure of the glycans from human lactotransferrin. *Eur J Biochem* 121:413-419.

- Straus DB, Weiss A. 1992. Genetic evidence for the involvement of the lck tyrosine kinase in signal transduction through the T cell antigen receptor. *Cell* 70:585-593.
- Sugawara T, Moriguchi T, Nishida E, Takahama Y. 1998. Differential roles of ERK and p38 MAP kinase pathways in positive and negative selection of T lymphocytes. *Immunity* 9:565-574.
- Yaka R, Gamliel A, Gurwitz D, Stein R. 1998. NGF induces transient but not sustained activation of ERK in PC12 mutant cells incapable of differentiating. *J Cell Biochem* 70:425-432.
- Ziere GJ, Van Dijk MC, Bijsterbosch MK, Van Berkel TJ. 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.
- 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 JA. 1995. Human lactoferrin induces phenotypic and functional changes in murine splenic B cells. *Immunology* 86:122-127.

Comparative studies of human and bovine lactoferrins effects on the immune system

Isabelle Dhennin-Duthille, Eve Damiens, Maryse Masson, Dominique Legrand, Elisabeth Elass-Rochard, Yolande Boilly Marer and Joël Mazurier
Unité Mixte de Recherche du CNRS n° 8576, Laboratoire de Chimie Biologique, Université des Sciences et Technologies de Lille, Villeneuve d'Ascq Cedex, France

Keywords: CD4, lactoferrins, MAP kinase, NK cells, proteoglycans.

Introduction

Many physiological roles have been ascribed to lactoferrin. Recently, some observations suggested that, in addition to its implication in the host defense against infection [1], lactoferrin [2] plays an important role in the primary defense against tumorigenesis [3]. It has been shown that lactoferrin regulates the development of a tumor either by a direct effect on the tumor cells [4] or by the modulation of the natural killer cell and the lymphokine activated killer cell activity [4,5]. Furthermore, we have demonstrated that lactoferrin accelerates the process of maturation of immature lymphocytes [6]. This broad spectrum of biological functions relies on the interaction of lactoferrin with numerous cells. Some biological activities of lactoferrin are linked to its ability to chelate iron whereas other functions belong to the interactions of the polypeptide chain with target cells including monocytes/macrophages, immature lymphocytes, natural killer cells, epithelial and endothelial cells. Lactoferrin is a multidomain protein which possesses, in addition to the metal binding site, amino-acid sequences allowing it to bind to: proteoglycans [7–9], apo E receptor [10,11], lymphocyte receptor [7,12] and LPS [13–15]. The interaction of lactoferrin with cells will depend on the presence of receptors at the surface of the target cells and of the density of proteoglycans. Implication of each of these different receptors in the activity of lactoferrin has not been defined.

In order to understand the mechanisms by which lactoferrin affects the immune system, we have studied the effect of lactoferrin on natural killer cytotoxicity and we have demonstrated the importance of proteoglycans in the interaction between effector and target cells such as lymphoblastic and epithelial breast cancer cells. In a second part, we have demonstrated that lactoferrin can act by activating a transduction pathway.

Address for correspondence: Joël Mazurier, Laboratoire de Chimie Biologique, Unité Mixte de Recherche n° 8576 du CNRS, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France. Tel.: +33-32-033-72-39. Fax: +33-32-043-65-55.
E-mail: joel.mazurier@univ-lille1.fr

Binding of human and bovine lactoferrins to lymphoblastic cells

The binding parameters of human ($K_d = 69$ nM, $n = 102\ 000$) and bovine ($K_d = 65$ nM, $n = 98\ 000$) lactoferrins to Jurkat lymphoblastic T-cells did not differ. Consecutive removal of N-terminal arginine residues from human lactoferrin progressively increased the binding affinity and decreased the number of binding site, so suggesting that the basic N-terminal cluster of lactoferrins contribute to 80% of the total number of binding sites. Similarly, chlorate treatment of cells (Table 1), which is known to inhibit sulfatation of proteoglycans, leads to the disappearance of this low affinity compartment. These results demonstrate the existence of two kinds of receptors for lactoferrins to lymphoblastic cells. One of low affinity and large volume (80% of the total binding sites) involves interactions between the N-terminal basic cluster and the proteoglycans of cells. The second (20% of the total binding sites) does not require the first N-terminal basic cluster.

Role of heparan sulfate in the interaction between lactoferrin and epithelial breast cancer cells

Breast cancer cells, and particularly the breast cell line MDA-MB-231, possess a high level of proteoglycans. Scatchard's analysis of ^{125}I -lactoferrin binding to MDA-MB-231 cells revealed the presence of two classes of binding sites: a low affinity site with a K_d of about 700 nM and 3.9×10^6 sites and a higher affinity class with a K_d of 45 nM and 2.9×10^5 sites per cell. To investigate the potential regulation of lactoferrin activity by proteoglycans expressed on the MDA-MB-231 cells, we treated these cells with glycosaminoglycan-degrading enzymes or sodium chlorate, a metabolic inhibitor of proteoglycan sulphatation (Table 1). We showed that chondroitinase treatment has no effect, while heparinase or chlorate treatment significantly reduces both the binding of lactoferrin to cell surface sulphated molecules such as heparan sulphate proteoglycans (HSPG), and the affinity of lactoferrin for the higher affinity binding sites.

Table 1. Binding parameters of human lactoferrin to human Jurkat lymphoblastic T-cells and MDA-MB breast epithelial cells. Effect of proteoglycans.

	JURKAT	JURKAT	MDA-MB	MDA-MB	MDA-MB-231	MDA-MB-231
Treatment	HClO ₄		HClO ₄		Heparinase	Chondroitinase
Site 1: K_d	69 nM	70 nM	45 nM	110 nM	122 nM	52 nM
Site 1: n (sites/cell)	20×10^3	20×10^3	290×10^3	275×10^3	260×10^3	320×10^3
Site 2: n (sites/cell)	80×10^3	40×10^3	3.9×10^6	1.5×10^6	1.6×10^6	4.3×10^6

Effects of human and bovine lactoferrins on natural killer cell cytotoxicity

Both human and bovine lactoferrins increase the natural killer cells cytotoxicity against hematopoietic K562 and MDA-MB-231 breast epithelial cancer cells. Lactoferrins modulates cytolysis as a function of the lactoferrin concentrations and on the target cell phenotype, suggesting that lactoferrins act on both natural killer cells (Fig. 1A) and target cells (Fig. 1B). Natural killer cells activation was observed in low concentrations of lactoferrin (5–20 $\mu\text{g/ml}$), while the increase of sensitization of breast cancer cells was observed in concentrations of lactoferrin ranging from 50–100 $\mu\text{g/ml}$. The variability in the target cell response, low with hematopoietic cells and high with epithelial cancer cells, can depend on the difference in the lactoferrin bound at the cell surface. As proteoglycans are involved in the modulation of a number of biological activities, we investigated whether the degradation of chondroitin and heparan sulphate chains, mainly present on the MDA-MB-231 cell surface, affects the lactoferrin activities on these cells. We also investigated the influence of sulphation of GAGs on cell sensitisation to lysis by human lactoferrin. In order to determine the function of these GAGs and their degree of sulphation in cell sensitisation to natural killer

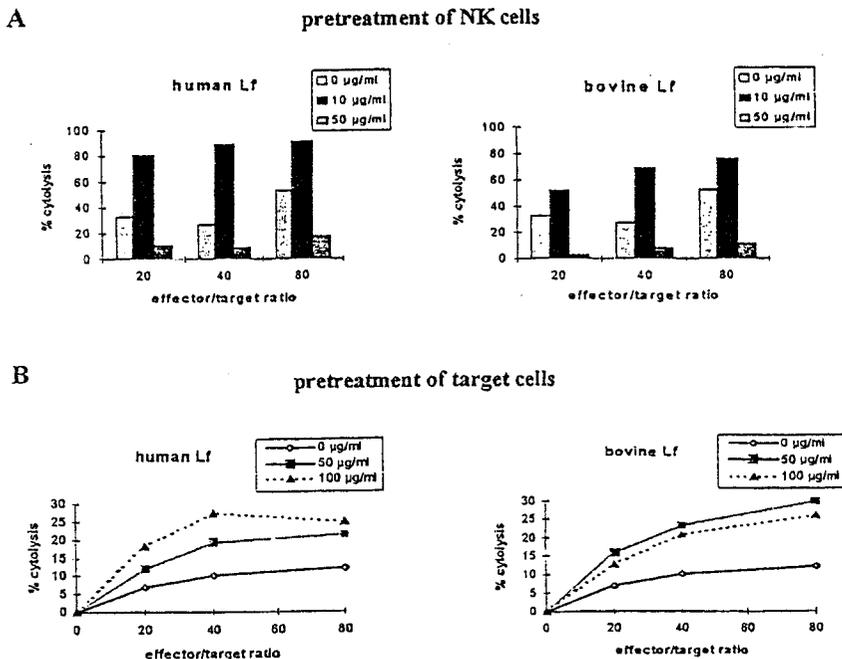


Fig. 1. Effect of lactoferrin on the cytotoxicity of natural killer cells against MDA-MB-231 epithelial breast cancer cells. Natural killer cells were incubated with ^{51}Cr -labelled MDA-MB-231 cells and the cytotoxicity was determined by the ^{51}Cr release assay. Natural killer cells (A) or target cells (B) were incubated with various concentrations of lactoferrin prior the assay, and at various effector target cells ratio.

cell lysis by lactoferrin, we pre-incubated the cells with sodium chlorate, heparinase I or chondroitinase ABC before adding lactoferrin at concentrations ranging from 0–100 $\mu\text{g/ml}$ (Fig. 2). The addition of lactoferrin sensitized the untreated and treated cells to lysis. However, the increase in sensitivity induced by lactoferrin was less on heparinase I or sodium chlorate treated cells. The cell sensitisation to lysis by lactoferrin was dose-dependent and was similar for both control and chondroitinase treated cells. In contrast, whatever the concentration of lactoferrin used, its activity on heparinase I or chlorate treated cell sensitisation to natural killer cell lysis was reduced by about 20–30% as compared to untreated cells. These results suggest that CSPG are not implicated in the lactoferrin effect on cell sensitisation to natural killer cell lysis. In contrast, it appears that the cooperation between the sulphated domains of cell surface associated molecules, in particular HSPG, and the high affinity site for lactoferrin is important for the modulation of lactoferrin activity on MDA-MB-231.

Human and bovine lactoferrins activate a transduction pathway in the human Jurkat lymphoblastic T-cell line

Human and bovine lactoferrins have shown to be involved in maturation of both immature B- and T-cells. We have developed an experimental model using the human lymphoblastic T Jurkat cell line. Jurkat cells express the lactoferrin receptor and a very low density of the CD4 and CD8 antigens at the cell surface. We showed that both human and bovine lactoferrins upregulated the expression of the CD4 antigen with an optimal response after 48 h of treatment of these cells with either bovine or human lactoferrin (Fig. 3). The increase of the CD4 surface antigen density was not accompanied by an arrest of the cell cycle, suggesting that lactoferrin induces the maturation of Jurkat cells without blocking the cell proliferation. Then we examined the possibility of lactoferrin activating a signal

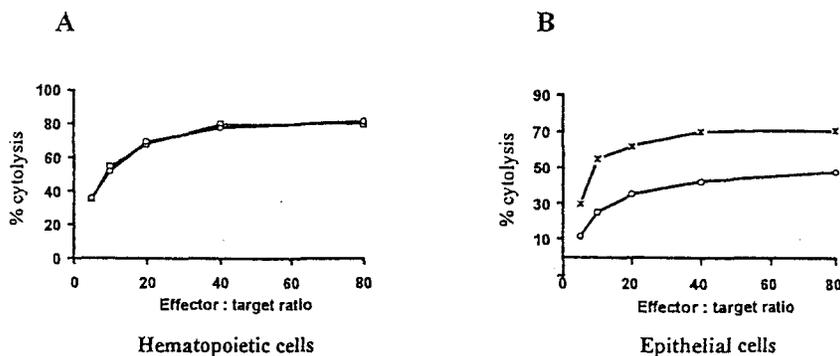


Fig. 2. Effect of heparinase treatments on cancer cells sensitization to natural killer lysis. Jurkat cells (A) or MDA-MB-231 cells (B) cells were untreated (x) or pre-treated (o) with heparinase. Then, cells were incubated with lactoferrin, washed and natural killer cells were added at various effector target cells ratio. The cytotoxicity was determined by the ^{51}Cr release assay.

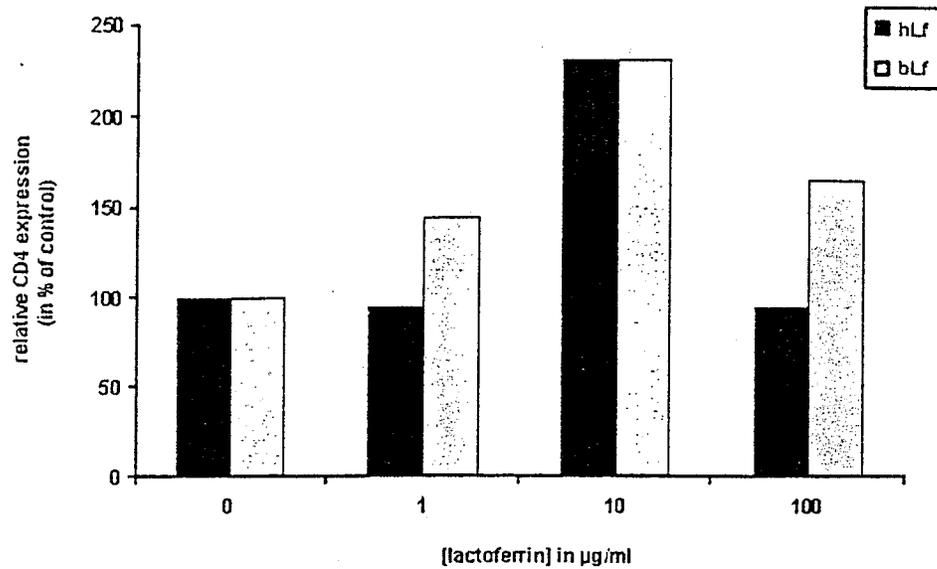


Fig. 3. Effect of lactoferrin on the CD4 antigen expression. Jurkat cells were incubated with increasing concentrations of lactoferrin for 48 h, and the density of the CD4 antigen at the cell surface was measured using flow-cytometry.

transduction that leads to this up-regulation. In a first step, we examined the protein phosphorylation and our findings showed that lactoferrin binding was followed by an increase in tyrosine-phosphorylation of intracellular polypeptides

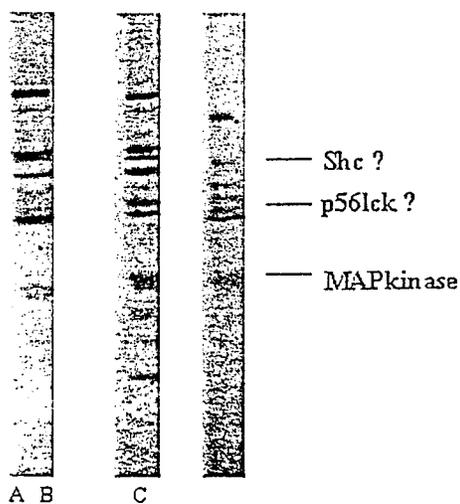


Fig. 4. Electrophoretic patterns of the cytosolic proteins phosphorylated upon binding of anti-CD3 antibodies (A), IL2, (B) and human lactoferrin (C). After solubilization of the cells, proteins were separated by electrophoresis, transferred onto nitrocellulose and stained using anti-phosphotyrosine antibodies.

in Jurkat T-cells (Fig. 4). This tyrosine-phosphorylation was dose- and time-dependent. One of the tyrosine-phosphorylated polypeptides was identified as the mitogen-activated protein kinase (MAP kinase). The phosphorylation of the MAP Kinase was correlated to an enhanced catalytic activity of this enzyme. Up-regulation of the CD4 surface antigen, tyrosine-phosphorylation, and MAP kinase activation were time- and dose-dependent and presented an optimal response for the same concentration of human or bovine lactoferrins. In order to correlate these three events, we investigated the effect of two inhibitors: genistein, a tyrosine kinases inhibitor and PD98059, a MAP kinase inhibitor. Both inhibitors, blocked both the CD4 up-regulation and the MAP kinase activation, indicating that tyrosine kinases are located upstream these two events. These studies suggest that both human and bovine lactoferrins induce T-cell maturation by activating the mitogen-activated protein kinase pathway.

Conclusions

Heparan sulphate proteoglycans and the normal sulphation of cell-associated sulphated molecules are key parameters for the positive regulation of lactoferrin activity in breast cancer cells. In fact, lactoferrin binds cell surface sulphated molecules in particular heparan sulphate proteoglycans which are involved in the binding to high affinity class sites. Consequently, these proteoglycans may control the modulation of the cell proliferation and cancer progression induced by lactoferrin. Therefore, further investigations are needed to confirm their potential significance in the development of chemotherapeutic agents for the treatment of mammary cancer. In the case of lymphocytes, lactoferrin binding on cells induces one or several transduction pathway(s) involving protein tyrosine kinases and MAP kinase. Further experiments are currently in progress to characterise which pathways are involved in MAP kinase stimulation, and to identify the proteins phosphorylated on tyrosine residues in the first minutes following lactoferrin binding. Finally, human and bovine lactoferrins increase the natural killer cell cytotoxicity against MDA-MB-231 breast epithelial cancer cells, and induce CD4 expression on Jurkat lymphoblastic T-cells at the same extent.

Acknowledgements

We are very grateful to the Etablissement de Transfusion Sanguine (Director: Dr J.J. Huart) Lille, France, for providing the citrated blood of healthy donors. This work was supported in part by the Centre National de la Recherche Scientifique (Unité Mixte de Recherche n° 8576, Glycobiologie normale et pathologique; dir: Pr A. Verbert), Université des Sciences et Technologies de Lille, by the Ministère de l'Éducation Nationale, by a grant from the Association pour la Recherche sur le Cancer (Contract n° 3040) and by the following companies: Armor Proteins, Domo-Biopole, Morinaga Milk Industry, Tatua Biological.

References

1. Nuijens JH, van Berkel PHC, Schanbacher FL. Structure and biological actions of lactoferrin. *J Mamm Gland Biol Neoplas* 1996;1:285–295.
2. Montreuil J, Tonnelat J, Mullet S. Préparation et propriétés de la lactosidérophiline (lactotransferrine) du lait de femme. *Biochim Biophys Acta* 1960;45:413–421.
3. Bezault J, Bhimani R, Wiprovnik J, Furmanski P. Human lactoferrin inhibits growth of solid tumors and development of experimental metastases in mice. *Cancer Res* 1994;54:2310–2312.
4. Campbell T, Skilton RA, Coombes RC, Shousha S, Graham MD, Luqmani YA. Isolation of a lactoferrin cDNA clone and its expression in human breast cancer. *Br J Cancer* 1992;65:19–26.
5. Damiens E, Mazurier J, El Yazidi I, Masson M, Spik G, Boilly-Marer Y. Effects of human lactoferrin on natural killer cell cytotoxicity against tumor cells. *Biochim Biophys Acta* 1998;1402:277–287.
6. Zimecki M, Mazurier J, Machnicki M, Wieczorek Z, Montreuil J, Spik G. Immunostimulatory activity of lactotransferrin and maturation of CD4-CD8-murine thymocytes. *Immunol Lett* 1991;30:119–124.
7. Legrand D, van Berkel PHC, Salmon V, van Veen HA, Slomianny MC, Nuijens JH, Spik G. The N-terminal Arg2, Arg3 and Arg4 of human lactoferrin interact with sulfated molecules but not with the receptor present on Jurkat human lymphoblastic T-cells. *Biochem J* 1997;327:841–846.
8. van Berkel PHC, Geerts MEJ, Van Veen HA, Mericskay M, de Boer HA, Nuijens JH. N-terminal stretch Arg2, Arg3, Arg4 and Arg5 of human lactoferrin is essential for binding to heparin, bacterial lipopolysaccharide, human lysozyme and DNA. *Biochem J* 1997;328:145–151.
9. Damiens E, El Yazidi I, Mazurier J, Ellass-Rochard E, Duthille I, Spik G, Boilly-Marer Y. Role of the heparan sulphate in the regulation of human lactoferrin binding and activity in the MDA-MB-231 breast cancer cell line. *Eur J Cell Biol* 1998;77:344–351.
10. Huettinger M, Retzek H, Hermann M, Goldenberg H. Lactoferrin specifically inhibits endocytosis of chylomicron remnants but not α -macroglobulin. *J Biol Chem* 1992;267:18551–18557.
11. Fillebeen C, Descamps L, Dehouck MP, Fenart L, Benaissa M, Spik G, Cecchelli R, Pierce A. Receptor mediated-transcytosis of lactoferrin through the blood-brain-barrier. *J Biol Chem* 1998;274:7011–7017.
12. Mazurier J, Legrand D, Hu W, Montreuil J, Spik G. Expression of human lactotransferrin receptors in phytohemagglutinin-stimulated human peripheral blood lymphocytes. *Eur J Biochem* 1989;179:481–487.
13. Appelmelk BJ, An YQ, Geerts M, Thijs BG, De Boer HA, MacLaren DM, De Graaf J, Nuijens JH. Lactoferrin is a lipid A-binding protein. *Infect Immun* 1994;62:2628–2632.
14. Ellass-Rochard E, Roseanu A, Legrand D, Trif M, Salmon V, Motas C, Montreuil J, Spik G. 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* 1995;312:839–845.
15. Ellass-Rochard E, Legrand D, Salmon V, Roseanu A, Trif M, Tobias PS, Mazurier J, Spik G. Lactoferrin inhibits the endotoxin interaction with CD14 by competition with the lipopolysaccharide binding protein. *Infect Immun* 1998;66:486–491.

