



Lipémie postprandiale et lactoferrine : le Lipolysis Stimulated Receptor comme cible potentielle

Nazir Ahmad

► To cite this version:

Nazir Ahmad. Lipémie postprandiale et lactoferrine : le Lipolysis Stimulated Receptor comme cible potentielle. Alimentation et Nutrition. Université de Lorraine, 2012. Français. NNT : 2012LORR0167 . tel-01749366

HAL Id: tel-01749366

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01749366>

Submitted on 29 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



École Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires (ENSAIA)

École Doctorale Ressources Procédés Produits Environnement (RP2E)

Thèse

Présentée pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université de Lorraine

Discipline : Procédés Biotechnologiques et Alimentaires

Soutenue publiquement le 5 Décembre 2012 par

Nazir AHMAD

Lipémie postprandiale et lactoferrine : le *Lipolysis Stimulated Receptor* comme cible potentielle

Membres du jury :

Mme Marie-Josèphe AMIOT-CARLIN	Directrice de Recherches INRA, examinatrice Aix-Marseille Université
M. Mustapha CHERKAOUI-MALKI	Professeur (Université de Bourgogne), rapporteur
M. Pascal DEGRAEVE	Professeur (Université de Lyon 1), rapporteur
Mme Catherine CORBIER,	Professeur (Directrice de thèse) Université de Lorraine
Mme Frances YEN POTIN	Directrice de Recherches (Co-directrice de thèse), Université de Lorraine
M. Jean-Michel GIRARDET	HDR, Ingénieur de recherche (co-Encadrant), Université de Lorraine

Unité de Recherche Animal et Fonctionnalités des Produits Animaux (UR AFPA, USC INRA 0340)

Equipe : Protéolyse et Biofonctionnalités des Protéines et des Peptides (PB2P)

et

Métabolisme lipidique et neurodégénérescence dans la maladie d'Alzheimer (LIPIDOMIX, EA 3998)

2 avenue de la Forêt de Haye, 54501

54505 Vandœuvre-lès-Nancy

Sommaire

Remerciements.....	8
Liste des abréviations	10
Liste des figures	14
Liste des tableaux	17
INTRODUCTION	18
1. Métabolisme lipidique	19
1.1 Dérégulation du métabolisme lipidique et mortalité	19
1.2 Syndromes liés au dysfonctionnement du métabolisme lipidique.....	20
1.2.1 Dyslipidémie	24
1.2.2 L'obésité et ses conséquences	26
1.2.3 Athérosclérose	28
2. Les différentes classes de lipoprotéines	29
2.1 Les chylomicrons (CM)	31
2.2 Les VLDL	32
2.3 Les LDL	32
2.4 Les HDL.....	33
2.5 Les IDL	33
3. Les différents types d'apoprotéines.....	34
3.1 Apo-AI	34
3.2 Apo-AII.....	34
3.3 Apo-B.....	35
3.4 Apo-CI	36
3.5 Apo-CII.....	36
3.6 Apo-CIII	36
3.7 Apo-E	37
3.8 Apo (a)	37
4. Les récepteurs de lipoprotéines.....	38
4.1 La superfamille du LDL-R.....	38
4.1.1 Low Density Lipoprotein Receptor (récepteur LDL-R).....	39
4.1.2 Receptor-mediated endocytosis (récepteur RME-2)	40
4.1.3 Very low density lipoprotein receptor (récepteur VLDL-R).....	40
4.1.4 Low density lipoprotein receptor-related protein 8 (récepteur LRP8)	40
4.1.5 Low-density lipoprotein receptor-related protein 4 (récepteur LRP4).....	41
4.1.6 Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (récepteur LRP1).....	41

4.1.7 Low-density lipoprotein receptor-related protein 2 (récepteur LRP2) ou mégaline	41
4.1.8 Low-density lipoprotein receptor-related protein suppresseur de tumeurs (récepteur LRP1B).....	42
4.1.9 Low-density lipoprotein receptor-related protein 5 et 6 (récepteurs LRP5 et LPR6)	42
4.1.10 Sortilin-related receptor (récepteur LR11 ou SORL1).....	42
4.2 Les récepteurs éboueurs ou « scavenger receptors » (récepteurs SR).....	43
4.3 Le récepteur des lipoprotéines stimulé par la lipolyse (récepteur LSR)	44
4.3.1 Le LSR, un nouveau récepteur impliqué dans la clairance des particules riches en TG	45
4.3.2 Propriétés structurales et physicochimiques du LSR	46
4.3.3 Mécanisme d'activation du LSR	49
4.3.4 Régulation de l'expression ou de l'activité du LSR.....	49
4.3.5 Autres rôles du LSR	53
5. La lactoferrine	54
5.1 Généralités et aspects structuraux	54
5.2 Glycosylation de la Lf.....	55
5.3 La fixation du fer et des anions par la Lf.....	56
5.4 Activités biologiques de la Lf	58
5.5 Récepteurs de la Lf	60
6. Contexte de l'étude et objectifs du travail.....	62
MATERIELS ET METHODES	64
1. Méthodes électrophorétiques et techniques attenantes.....	65
1.1 Electrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de.....	65
sodium (SDS-PAGE).....	65
1.2 Electrophorèse bidimensionnelle couplant une isoélectrofocalisation (IEF) et une SDS-PAGE.....	65
1.3 Electrotransfert de protéines	67
1.3.1 Transfert semi-sec.....	67
1.3.2 Transfert en cuve	67
1.4 Révélation des protéines	68
1.4.1 Révélation des protéines au bleu de Coomassie R-250	68
1.4.2 Révélation des protéines au nitrate d'argent.....	68
1.4.3 Révélation des protéines sur la membrane de PVDF	68
1.4.4 Révélation des protéines sur la membrane de nitrocellulose.....	69
1.4.4. Révélation des glycoprotéines sur la membrane de PVDF	69
2. Hydrolyses enzymatiques	69
2.1 Hydrolyse ménagée de la lactoferrine par la trypsine (génération des lobes N-et C-terminaux)	69
2.2 Hydrolyse trypsique/chymotrypsique (génération des peptides)	70
3. Préparation des échantillons protéiques avant chromatographie.....	70

3.1 Préparation de protéines lactosériques bovines	70
3.2 Préparation de protéines de membranes hépatiques enrichies en LSR	71
4. Chromatographie liquide	72
4.1 Purification de la lactoferrine sur CM-Sephadex C-50	72
4.2 Purification de la lactoferrine sur colonne Hitrap-CM-FF	73
4.3 Purification du N-lobe de la lactoferrine sur colonne TSK SP-5PW	73
4.4 Purification du C-lobe de la lactoferrine sur colonne C4	73
5. Séquençage des protéines et des peptides	74
5.1 Microséquençage protéique N-terminal par dégradation d'Edman	74
5.2 Identification des N- et C-Lobes par spectrométrie de masse	75
5.3 Analyse des peptides en spectrométrie de masse	76
6. Dosage des protéines	77
7. Immunodétection du LSR par Western blot	77
8. Effet du traitement de la lactoferrine sur TG postprandiale chez les souris.....	78
9. Dosage enzymatique des TG plasmatiques de souris	79
10. Couplage de la sonde de fluorescence Alexa Fluor-488 à la lactoferrine	79
11. Mise en évidence de la colocalisation du LSR et de la lactoferrine sur des hépatocytes	80
12. Mise en évidence de l'interaction entre la lactoferrine (ou ses fragments) et le LSR par la technique du Ligand blot	81
13. Effet de la lactoferrine sur l'expression du LSR au niveau cellulaire	82
14. Détermination de l'expression de l'ARNm du LSR par PCR en temps réel	82
RESULTATS ET DISCUSSION.....	84
CHAPITRE 1.....	85
Purification, hydrolyse et caractérisation de la lactoferrine et de ses fragments	85
1. Optimisation d'une méthode de purification de la lactoferrine bovine.....	86
1.1 Purification de la lactoferrine selon des méthodes existantes	86
1.2 Mise au point d'une nouvelle méthode de purification de la lactoferrine	87
2. Hydrolyses enzymatiques de la lactoferrine en conditions ménagées.....	89
2.1 Hydrolyse de la lactoferrine par la trypsine pour la génération de ses deux lobes	89
3. Séquençage des fragments générés	91
3.1 Séquençage chimique selon la méthode d'Edman.....	91
3.2 Identification par spectrométrie de masse	92
4. Purification des fragments de la lactoferrine.....	93
4.1. Purification des fragments du N-lobe	93
4.2. Purification du C-lobe de la lactoferrine sur colonne C4.....	96
5. Hydrolyse trypsique/chymotrypsique pour la génération de petits peptides de Lf.....	98

6. Discussion.....	99
CHAPITRE 2.....	101
<i>Purification et caractérisation physico-chimique du récepteur LSR</i>	101
1. Purification du LSR à partir de membrane plasmique de foie de rat	102
2. Immunodétection du LSR par Western blot	103
3. Caractérisation du LSR par électrophorèse bidimensionnelle 2D-PAGE	104
4. Recherche de glycosylations éventuelles du LSR.....	107
5. Discussion.....	108
CHAPTER 3	111
<i>Effet de la lactoferrine sur la lipémie postprandiale et évidence d'une interaction directe entre la lactoferrine et le recepteur LSR</i>	111
1. La lipémie postprandiale chez des souris traitées par la lactoferrine	112
2. Effet de la Lf sur la transcription du gène <i>lsr</i> dans des cellules Hepa1-6	115
3. Influence de la Lf sur le taux d'expression protéique du récepteur LSR dans des cellules Hepa 1-6.....	117
4. Interaction LSR-Lactoferrine	118
4.1 Colocalisation de la lactoferrine et du LSR à la surface de cellules Hepa 1-6	118
4.2 Etude de l'interaction LSR/Lf par la technique du <i>ligand-blot</i>	121
4.3 Expériences de compétition entre la Lf et les VLDL pour la fixation sur le LSR.....	122
4.4 Interaction entre les produits d'hydrolyse ménagée de la Lf et le LSR	123
4.5 Interaction entre le LSR et les domaines N- et C-terminaux de la	124
4.6 Interaction entre le LSR et les peptides issus de l'hydrolyse de la Lf par la trypsine et la chymotrypsine	125
5. Discussion.....	126
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	129
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	133
ANNEXES	158
Annexe 1.	159
Détermination des masses moléculaires par FTICR-MS des fragments tryptiques de pp51.....	159
Annexe 2.	160
Détermination des masses moléculaires par FTICR-MS des fragments tryptiques de pp44.....	160
Annexe 3.	161
Détermination des masses moléculaires par FTICR-MS des fragments chymotryptiques de pp34	161
Annexe 4.	162
Détermination des masses moléculaires par FTICR-MS des fragments tryptiques de pp24.....	162

Annexe 5.	163
Analyse par spectrométrie de masse des peptides présents dans le double hydrolysate	163
Annexe 6.	164
Masse moléculaire apparente, nombre de glycanes et pH isoélectrique de la lactoferrine (Lf) et de ses fragments	164

Remerciements

Ce travail a été réalisé au sein de l'équipe Protéolyse et Biofonctionnalité de Protéines et des Peptides (PB2P) de l'UR AFPA et du laboratoire LIPIDOMIX. Je tiens à remercier chaleureusement le Pr. Guido RYCHEN, directeur de l'UR AFPA, le Pr. Annie DARY, animatrice de PB2P et le Dr Frances YEN POTIN, directrice de LIPIDOMIX et co-directrice de ma thèse pour m'avoir accueilli au sein de leur laboratoire ou de leur équipe.

Je tiens à adresser mes plus chaleureux remerciements à ma directrice de thèse pour m'avoir donné la chance de pouvoir réaliser ce travail. Cette partie de remerciements est à mon avis la plus satisfaisante à écrire de toute ma thèse et je souhaite témoigner de ma reconnaissance et de mon admiration d'abord à ma chère directrice de thèse, Pr Catherine CORBIER, qui est un modèle professionnel pour sa gestion calme de son temps pourtant si chargé de responsabilités importantes et bien sûr pour sa maîtrise remarquable de notre domaine. En dehors des aspects qui concernent ma formation, sachez que votre soutien dans la vie quotidienne, vos interactions avec SFERE et la Haute Commission du Pakistan ont été très appréciés et que je m'en souviendrai toujours.

Une grand merci au Dr Jean-Michel GIRARDET, co-encadrant de ma thèse, pour m'avoir suivi et encouragé pendant la thèse et formé à tous les aspects de protéolyse des protéines et à leur purification et caractérisation. Jean-Michel, merci pour ta disponibilité, ta sensibilité aux contextes personnels à travers lesquels tes étudiants tentent d'atteindre tous les objectifs d'un doctorat, merci pour ton ouverture à nos caractères et à notre touche propre en recherche, merci pour la liberté que tu me laisses en nous témoignant ta confiance dans notre travail. Ce sont cette confiance et cette liberté qui, à mon avis, nous laissent spontanément faire ressortir le meilleur de nous-même dans notre travail et comme personne. Merci de reconnaître nos efforts et nos difficultés. Merci pour la relation que nous avons pu développer depuis mon entrée, merci aussi de m'avoir dirigé et encouragé à passer le doctorat et d'avoir ainsi joué un rôle majeur dans ma découverte de possibilités de carrières qui me motivent vraiment. Merci enfin pour ton soutien incroyablement solide, attentif, cordial dans la dernière ligne droite de ces dernières semaines.

Merci également au Dr. Frances YEN POTIN, ma co-directrice qui m'a accueilli le premier jour à LIPIDOMIX et qui m'a initié à quasiment toutes les techniques que j'ai été amené à utiliser pour la réalisation des études présentées dans le dernier chapitre de ce manuscrit. Elle n'a pas simplement dirigé ma thèse, mais elle m'a transmis la passion de la

recherche et n'a eu de cesse de m'encourager et de me soutenir durant ces années. J'ai pu apprécier non seulement sa dimension scientifique, mais aussi son non moins importante dimension humaine. Merci beaucoup Frances pour vos précieuses remarques.

Je suis très honoré que M. les Professeurs Pascal DEGRAEVE et Mustapha CHERKAOUI-MALKI aient accepté d'être rapporteurs de ce travail. Je les remercie vivement pour leur disponibilité et le temps qu'ils m'auront consacré. C'est également un très grand honneur d'avoir comme membre du jury, Mme Marie-Josèphe AMIOT-CARLIN, Directeur de recherches, que je remercie d'avoir accepté de participer à ce jury.

Je remercie également très sincèrement Dr. Céline CAKIR-KIEFER de m'avoir accompagné dans le projet Biacore à Strasbourg. J'en profite pour lui exprimer ici ma plus profonde gratitude.

Je suis très honoré d'avoir passé un bon moment de ma vie d'étudiant avec mes collègues thésards Faïza, Maira, Zeeshan, Nawara, Wessam, Hamed, Xavier et Ounki. Merci pour leur soutien au quotidien et pour leur bonne humeur.

Je souhaite également remercier tous les membres de l'équipe PB2P, Laurent, Magali, Chantal, Emeline, Katy, Alain, Clarisse, Gérard mais aussi Franck pour leur enthousiasme, leur sympathie et leur soutien.

Un grand merci à Christophe, Samina et Marine, les membres de l'équipe LIPIDOMIX, pour leur enthousiasme et leur soutien toujours très généreux dans mes débuts surtout.

Enfin, je souhaite remercier ma famille pour son soutien constant. Cette thèse est un aboutissement de longues années d'études. Pour conclure, je souhaite bien évidemment remercier le HEC (*Higher Education Commission Pakistan*) qui a financé la thèse.

Liste des abréviations

2-D :	Bidimensionnelle
ACN:	Acétonitrile
ADP :	Adénosine diphosphate
AG :	Acide gras
AGL :	Acide gras libre
APOER2 :	Récepteur apoE2
ARF-1 :	<i>ADP-Ribosylation Factors-1</i>
ASGP :	Asialoglycoprotein
BCG :	<i>Bacillus Calmette-Guérin</i>
bLf :	Lactoferrine bovine
BMP :	<i>Bone morphogenetic protein</i>
BSA :	Sérumalbumine bovine
C :	Rapport (en %) de la masse de bisacrylamide sur la masse d'acrylamide + bisacrylamide
CAPS :	Acide 3-[cyclohexylamino]-1-propanesulfonique
CD-36, -68 :	<i>Cluster differentiation-36, -68</i>
CDT :	<i>Clostridium Difficile Transferase</i>
Ce :	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CETP :	<i>Cholesteryl ester transfer protein</i>
CHAPS :	3-[(3-cholamidopropyl)-diméthylammonio]-1-propanesulfonate
CL :	Cholestérol libre
CM :	Chylomicrons
CMR :	Chylomicrons remnants
CST :	<i>Clostridium spiroforme toxin</i>
DabAB-1 :	Gène <i>Disabled-1</i>
DAPI :	4',6-diamidino-2-phénylindole
DMEM :	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO :	Diméthyl sulfoxyde
DTT :	Dithiothréitol
E/S :	Rapport enzyme sur substrat
EC :	Esters de cholestérol
EDTA :	Acide éthylènediaminetétracétique

EGTA :	Acide éthylène glycol-bis (β -aminoéthyl éther)-N,N,N',N'-tetracétique
EGF :	<i>Epidermal growth factor</i>
EGIR :	<i>European Group for the Study of Insulin Resistance</i>
ERK :	<i>Extracellular -signal -regulated kinases</i>
ESI-MS :	<i>Electrospray ionisation mass spectrometry</i>
ESPCI :	Ecole supérieure de physique et de chimie industrielles de la ville de Paris
FPLC :	<i>Fast protein liquid chromatography</i>
FT-ICR :	<i>Fourier transform ion cyclotron resonance</i>
FTMS :	<i>Fourier Transform mass spectrometry</i>
HDL :	<i>High density lipoproteins</i>
HEPES :	Acide 2-[4-(2-hydroxyéthyl) piperazine-1-yl]éthanesulfonique
HL :	Lipase hépatique
HPLC :	<i>High performance liquid chromatography</i>
HPRT :	Hypoxanthine guanine phosphoribosyltransférase
HRP :	<i>Horseradish peroxidase</i> (peroxidase de raifort)
IDF :	<i>International Diabetes Federation</i>
IDL :	<i>Intermediate density lipoproteins</i>
IEF :	Isoélectrofocalisation
IFG :	<i>Impaired fasting glucose</i>
IFN :	Interferon
ERK :	<i>Extracellular signal related kinase</i>
IgG :	Immunoglobulines G
IGT :	<i>Impaired glucose tolerance</i>
IMC :	Indice de masse corporelle
Int :	<i>Intégration site</i>
IPG :	<i>Immobilized pH gradient</i>
IR :	<i>Insulin resistance</i>
α -LA :	α -lactalbumine
β -LG :	β -lactoglobuline
LCAT :	<i>Lecithin-cholesterol acyltransferase</i>
LC-MS :	<i>Liquid chromatography - mass spectrometry</i>
LDL :	<i>Low Density Lipoproteins</i>
LDL-R :	<i>Low Density Lipoprotein Receptor</i>

Lf :	Lactoferrine
Lf-R :	Récepteur de la lactoferrine
LOX1 :	<i>Lectin like oxidized LDL receptor</i>
Lp :	<i>Lipid peroxidase</i>
LPL :	<i>Lipoprotein lipase</i>
LRP1 :	<i>Low-density lipoprotein receptor-related protein 1</i>
LSP :	Protéines de lactosérum
LSR :	<i>Lipolysis stimulated receptor</i>
LTQ :	<i>Linear Trap Quadripole</i>
m/v :	masse par volume
m/z :	Masse par charge
MAPK :	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MEGF7 :	<i>Multiple epidermal growth factor-type repeat containing protein 7</i>
MNT :	Maladies non transmissibles
MTP :	<i>Microsomal triglyceride transfer protein</i>
NCEP ATP III :	<i>National Cholesterol Education Program-Third Adult Treatment Panel III</i>
NIHES :	<i>National Institute of Health Sciences</i>
OMS :	Organisation Mondiale de la Santé
PAGE :	<i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i>
PAS :	<i>Periodic acid Schiff</i>
PBS :	<i>Phosphate buffer saline</i>
PI3K :	Phosphoinositide 3 kinase
PITC :	Phénylisothiocyanate
PL :	Phospholipides
PM :	Protéines de membrane hépatique
PMSF :	Fluorure de phénylméthylsulfonyle
PP3 :	Composant-3 des protéoses-peptones ou lactophorine
PTC :	<i>Phénylthiocarbamyl</i>
PTH :	<i>Phénylthiohydantoïne</i>
PVDF :	Fluorure de polyvinylidène
RAP :	<i>Receptor associated protein</i>
RIPA :	Tampon pour dosage par radioimmunoprecipitation
RME-2 :	<i>Receptor-mediated endocytosis-2</i>
RT-PCR :	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>

SDS :	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SIM :	<i>Secondary ion mass</i>
SORL :	<i>Sortilin-related receptor</i>
SORLA :	<i>Sortilin-related receptor with A-type repeats</i>
SPE :	<i>Extraction en phase solide</i>
SR :	<i>Scavenger receptors</i>
SR-A:	Récepteurs de la classe A
SRCR :	<i>Scavenger Receptor Cysteine-Rich domain</i>
STM :	Tampons contenant du saccharose, du Tris et du magnésium
T :	Rapport (en %) de la masse de acrylamide + bisacrylamide sur le volume de gel
T2D :	Diabète de type 2
TBST :	<i>Tris-Buffered Saline with Tween 20</i>
TCA :	Acide trichloroacétique
TFA :	Acide trifluoroacétique
TG :	Triglycérides
TJ :	<i>Tight junctions</i> (jonctions serrées)
TNF :	<i>Tumor necrosis factor</i>
Tris :	Tris(hydroxyméthyl)aminométhane
uma :	Unité de masse atomique
v/v :	Volume par volume
VLDL :	<i>Very Low Density Lipoproteins</i>
VLDL-R :	<i>Very Low Density Lipoprotein Receptor</i>
WC :	<i>Waist circumference</i> (tour de taille)
Wg :	<i>Wingless</i> (sans ailes)
WHO :	<i>World Health Organization</i>

Liste des figures

PARTIE : INTRODUCTION	18
Figure 1: Evolution du pourcentage d'individus obèses dans différents pays du monde.....	26
Figure 2: Evolution de la prévalence de l'obésité en France.....	27
Figure 3: Lipoprotéines et risque cardiovasculaire.....	29
Figure 4: Schéma illustrant la structure générale des lipoprotéines.....	30
Figure 5: Schéma illustrant la structure générale des lipoprotéines.....	30
Figure 6: Famille des récepteurs LDL-R.....	39
Figure 7: Structure des récepteurs « éboueurs ».....	43
Figure 8: Représentation schématique illustrant le rôle du LSR dans la capture des lipides alimentaires sous forme de chylomicrons pendant la phase postprandiale.....	46
Figure 9 : Séquences des sous-unités α , α' et β de LSR de rat.....	47
Figure 10 : Représentation schématique de la sous-unité α indiquant la localisation des différents domaines ainsi que les régions excisées dans les deux autres sous-unités.....	48
Figure 11 : Modèle hypothétique de la structure du complexe LSR sous forme inactive et sous forme activée par la présence d'acides gras libres.....	49
Figure 12 : Effets de la leptine sur la régulation de l'expression du LSR et de la lipémie postprandiale.....	50
Figure 13 : Effet inhibiteur de la protéine RAP sur l'activité du LSR.....	51
Figure 14 : Effet de l'apoC-III sur la fixation l'internalisation et la dégradation des chylomicrons, des VLDL, et des LDL.....	52
Figure 15: Inhibition de la fixation de particules LDL sur le récepteur LSR par la lactoferrine.....	53
Figure 16 : Domaines structuraux de la lactoferrine.....	55
Figure 17 : Structure primaire de la lactoferrine bovine.....	56
Figure 18 : Représentation des sites de liaison du fer situés dans la cavité du lobe N-terminal de la LF bovine.....	57
Figure 19 : Schéma représentant les rôles proposés pour la Lf.....	58
PATIE : MATERIALS ET METHODES	64
Figure 20 : Etapes du microséquençage N-terminal par la méthode d'Edman.....	75
PARTIE : CHAPITRE 1	85
Figure 21 : Caractérisation électrophorétique (SDS-PAGE 15%) de la lactoferrine purifiée.....	87
Figure 22 : Profil chromatographique des protéines lactosériques obtenu par ÄKTA-FPLC d'échange de cations sur colonne HiTrap CM.....	88
Figure 23 : Caractérisation électrophorétique (SDS-PAGE 15%) des fractions F1-F3 collectées lors du fractionnement ÄKTA-FPLC des protéines lactosériques.....	88
Figure 24 : Analyse électrophorétique (SDS-PAGE 15%) des hydrolysats tryptiques ménagés de la lactoferrine bovine.....	89
Figure 25 : Profil électrophorétique (SDS-PAGE 15%) des fragments produits par hydrolyse tryptique ménagée de la Lf bovine.....	90

Figure 26 : Représentation schématique de l'hydrolyse ménagée de la lactoferrine bovine par la trypsine, générant les peptides pp24, pp34, pp44 et pp51.....	93
Figure 27 : Profil chromatographique ÄKTA-FPLC d'échange de cations sur colonne TSK SP-5PW de l'hydrolysats tryptique ménagé de lactoferrine.....	94
Figure 28 : Caractérisation électrophorétique (SDS-PAGE à 15% d'acrylamide) des fractions collectées après séparation chromatographique de l'hydrolysats tryptique ménagé de lactoferrine.....	95
Figure 29 : Profil chromatographique ÄKTA-FPLC d'échange de cations sur colonne TSK SP-5PW de l'hydrolysats tryptique ménagé de lactoferrine traité par dialyse.....	96
Figure 30 : Caractérisation électrophorétique (SDS-PAGE 15 %) des fractions collectées après séparation chromatographique de l'hydrolysats tryptique ménagé de lactoferrine et dialyse.....	96
Figure 31 : Chromatographie HPLC en phase inversée de l'hydrolysats tryptique en conditions ménagées de la Lf.....	97
Figure 32 : Profil électrophorétique (SDS-PAGE à 15% d'acrylamide) des fractions F1-F6 collectées lors du fractionnement RP-HPLC de l'hydrolysats tryptique de lactoferrine (Lf).....	97
Figure 33: Profil électrophorétique (SDS-PAGE 15%) des différents types d'hydrolysats (Hyd) de la lactoferrine (Lf).....	98
PARTIE : CHAPITRE 2.....	101
Figure 34 : Profil chromatographique obtenu lors de la purification du LSR à partir de membrane hépatique par échange d'anions sur colonne Mono Q HR5/5 connectée à un système ÄKTA-FPLC.....	103
Figure 35 : Profil électrophorétique (SDS-PAGE à 12% d'acrylamide) des fractions chromatographiques F1 à F4 collectées lors de la séparation des protéines de membranes hépatiques par ÄKTA-FPLC.....	103
Figure 36 : Immunodétection du LSR purifié.....	104
Figure 37 : Electrophorèse bidimensionnelle (première dimension : IEF ; deuxième dimension: SDS- PAGE à 10% d'acrylamide) des sous-unités du LSR présentes dans la fraction chromatographique F4.....	105
Figure 38 : Modifications post-traductionnelles potentielles de la sous-unité α du LSR de rat.....	106
Figure 39 : Prédiction d'O-glycosylations en fonction de la séquence du LSR de rat.....	107
Figure 40 : Révélation spécifique des glycoprotéines électroélues sur membrane PVDF après migration par SDS-PAGE en conditions non réductrices.....	108
PARTIE : CHAPITRE 3.....	111
Figure 41: SDS-PAGE 12% montrant le profil électrophorétique des Lfs utilisées dans cette étude.....	112
Figure 42 : Effet de la Lf sur le taux de triglycérides plasmatiques de souris en phase postprandiale.....	113
Figure 43 : Augmentation du taux de TG plasmatiques 1h après injection de Lf purifiée ou commerciale....	114
Figure 44 : Influence de la lactoferrine sur la transcription du gène lsr dans des cellules Hepa1-6.....	115
Figure 45 : Influence de la Lf sur la quantité relative d'ARNm correspondant aux 3 sous-unités du LSR.....	116
Figure 46 : Effet de la Lf sur l'expression protéique du LSR dans des cellules Hepa 1-6.....	117
Figure 47 : Images de microscopie confocale illustrant la colocalisation du LSR et de la Lf à la surface de cellules Hepa 1-6.....	119
Figure 48 : Images de microscopie confocale illustrant l'effet de la présence d'oléate et du temps d'incubation sur la colocalisation du LSR et de la Lf à la surface de cellules Hepa 1-6.....	120
Figure 49 : Expériences de ligand blot montrant l'interaction de la Lf bovine avec le LSR.....	122

Figure 50 : Expériences de compétition entre la Lf et les VLDL pour la fixation sur le LSR.....	123
Figure 51 : Ligand-blot montrant l'interaction des domaines N- et C-terminaux de la Lf avec le LSR.....	124
Figure 52 : Expériences de ligand blot montrant l'interaction entre les fragments d'hydrolyse de la Lf et le LSR.....	126

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les dix principaux facteurs de risque responsables de décès prématurés.....	19
Tableau 2 : Définitions cliniques du syndrome métabolique selon les différents organismes.....	22
Tableau 3 : Syndromes métaboliques : les déficiences associées et leurs conséquences.....	23
Tableau 4 : Propriétés physico-chimiques et composition des lipoprotéines plasmatiques humaines.....	31
Tableau 5 : Primers spécifiques pour le LSR et chaque sous-unité.....	83
Tableau 6 : Identification des fragments pp51, pp44, pp34 et pp24 de la lactoferrine obtenus par hydrolyse trypsique ménagée.....	91
Tableau 7 : Caractérisation des masses moléculaires apparentes et des pHi expérimentaux des sous-unités du LSR de rat.....	105

INTRODUCTION

1. Métabolisme lipidique

1.1 Dérégulation du métabolisme lipidique et mortalité

Les lipides apportés par l'alimentation jouent un rôle essentiel en raison de l'apport énergétique qu'ils représentent et de leurs nombreuses fonctions biologiques ou structurales. Cependant, des concentrations anormales de lipides dans le plasma sanguin conduisent à des pathologies telles que l'obésité, le diabète, certaines maladies cardiovasculaires, ou encore des maladies mentales et des cancers (Murray & Lopez, 1996). Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS ; données consultables sur le site www.who.int), en 2005, 17,1 millions de personnes étaient concernées par des problèmes notoires de santé publique liés à une dérégulation du métabolisme lipidique qui représentaient 29% des cas de mortalité dans le monde.

Le syndrome métabolique lié au déséquilibre lipidique se caractérise essentiellement par une hyperinsulinémie, une dyslipidémie, une hypertension chronique avec un risque élevé d'athérosclérose (Ramachandran *et al.*, 2001). Des études épidémiologiques sur des populations spécifiques exposées à ces risques sont donc primordiales afin de contrôler au mieux les problèmes de santé publique liés aux déséquilibres lipidiques (Last, 1988).

Les problèmes d'obésité, d'hypertension, de taux de cholestérol excessif ou encore les complications liées au tabagisme ou à l'alcoolisme sont parmi les facteurs de risques de mortalité les plus fréquents (Tableau 1).

Tableau 1: Les dix principaux facteurs de risque responsables de décès prématurés

	Pays développés	Pays en développement
1	Tabagisme	Insuffisance pondérale
2	Hypertension	Rapports sexuels non protégés
3	Alcool	Insalubrité de l'eau
4	Cholestérol	Air/fumées toxiques
5	Surpoids	Carence en zinc
6	Faible consommation de fruits et légumes	Carence en fer
7	Manque d'activité physique	Carence en vitamine A
8	Usage de drogues illicites	Hypertension
9	Rapports sexuels non protégés	Tabagisme
10	Carence en fer	Cholestérol

(Source: http://www.who.int/whr/2002/en/whr02_en.pdf)

Un modèle de transition épidémiologique a été introduit il y a une quarantaine d'années (Omran, 1971) pour illustrer l'évolution du profil épidémiologique au cours du temps et le fait que les maladies contagieuses sont peu à peu remplacées par les maladies non transmissibles (MNT) en ce qui concerne les principales causes de décès, dans les pays développés mais aussi progressivement, dans les pays en développement.

Le premier rapport sur la situation mondiale des maladies non transmissibles a été publié en Avril 2011 par l'OMS. Il confirme que les maladies non transmissibles sont devenues la première cause de décès dans le monde. En 2008, selon ce rapport, 36,1 millions de personnes sont décédées d'affections telles que les cardiopathies, les accidents vasculaires cérébraux, les pneumopathies chroniques, les cancers et le diabète. Plus de 80% de ces décès sont survenus dans les pays à revenu faible ou moyen. Les maladies cardio-vasculaires sont responsables de la plupart des décès par MNT, à savoir 17 millions de personnes chaque année ; elles sont suivies par le cancer (7,6 millions), les maladies respiratoires (4,2 millions) et le diabète (1,3 million). Ces quatre groupes de maladies représentent près de 80% de l'ensemble des décès par MNT et ont en commun quatre facteurs de risque : le tabagisme, la sédentarité, l'usage nocif de l'alcool, une alimentation déséquilibrée.

Les MNT ont été responsables de 63% de la mortalité mondiale en 2008. Cela équivaut à 36 millions de personnes et près de 80% de ces décès sont survenus dans des pays à revenu faible ou moyen, ce qui va à l'encontre des idées reçues selon lesquelles ces affections seraient principalement un problème de pays riches. Faute de mesures, on prévoit que l'épidémie des MNT tuera 52 millions de personnes en 2030.

1.2 Syndromes liés au dysfonctionnement du métabolisme lipidique

Les physiopathologies du métabolisme lipidique se traduisent la plupart du temps par des dysfonctionnements du métabolisme des lipoprotéines, qui engendrent un problème de transport ou de stockage des lipides. Ces perturbations, telles que l'obésité et les dyslipidémies, constituent un facteur de risques pour les maladies cardiovasculaires, comme l'athérosclérose.

L'ensemble de ces facteurs de risques ajouté à la résistance à l'insuline et l'hypertriglycéridémie a été appelé « syndrome métabolique ».

La définition du syndrome métabolique a évolué fortement depuis les années 1990, suite au travail de différents groupes internationaux qui ont établi des critères permettant la définition et le diagnostic de ce syndrome. La définition clinique des syndromes varie légèrement selon les groupes de travail, comme indiqué dans le Tableau 2. Ainsi, l'OMS (ou WHO) donne pour critère obligatoirement requis un diagnostic de diabète de type 2, avec une perte de tolérance au glucose ou insulino-résistance, à laquelle doivent s'ajouter au moins deux des quatre critères suivants : une obésité centrale (définie par le rapport taille/hanche, ou l'Indice de Masse Corporelle (IMC)), une dyslipidémie (taux de triglycérides – TG – élevé et/ou de *high density lipoproteins* – HDL – faible), une pression sanguine élevée et une dysfonction rénale (Tableau 2). L'EGIR (*European Group for the Study of Insulin Resistance*) a basé sa définition sur l'insulino-résistance, le taux d'insuline à jeun et le taux de glucose à jeun plutôt que sur les valeurs de tolérance au glucose, comme critère central. De plus, 2 des 4 critères suivants doivent être retrouvés : obésité centrale, taux de TG élevé ou de HDL faible, glucose plasmatique après 2 h à jeun et pression artérielle élevée (Tableau 2). Le *National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III* (NCEP-ATP III) ne pose pas de critère obligatoire, mais considère que 3 des 5 critères suivants doivent être satisfaits : anomalie des taux de glucose à jeun, obésité abdominale définie par la circonférence de la taille, taux élevé de TG plasmatiques, taux insuffisant de HDL, pression sanguine élevée (Tableau 2). Enfin, d'après la définition établie en 2005 par la Fédération Internationale du Diabète (IDF), le critère obligatoire est une obésité centrale (circonférence de taille précisée suivant les spécificités ethniques ou $IMC > 30 \text{ kg/m}^2$) qui doit être complétée par au moins 2 des 4 symptômes suivants : anomalies des taux de glucose plasmatique, taux élevé de TG plasmatiques, taux insuffisant de HDL ; pression sanguine élevée (Tableau 2).

Tableau 2: Définitions cliniques du syndrome métabolique selon les différents organismes

Symptômes	OMS (WHO) 1999	EGIR 1999	NCEP-ATP III 2005	IDF 2011
Critère obligatoire	Résistance à l'insuline (IGF*T2D ou autre évidence)	Hyperinsulinémie (insuline plasmatique >75%)	Aucun	Obésité centrale
Autres critères	Résistance à l'insuline ou diabète plus 2 des 5 critères suivants	Hyperinsulinémie plus 2 des 4 critères suivants	3 des 5 critères suivants	Obésité, plus 2 des 4 critères suivants
Obésité	Rapport taille/hanches > 0.90 (M) > 0.85 (F)	Circonférence de la taille ≥ 94 cm (M) ≥ 80 cm (F)	Circonférence de la taille ≥ 102 cm (M) ≥ 90 cm (F)	Circonférence de la taille ≥ 94 cm (M) ≥ 80 cm (F)
Hyperglycémie	(Résistance à l'insuline déjà requise)	(Résistance à l'insuline déjà requise)	Glucose à jeun ≥ 100 mg/dL	Glucose à jeun ≥ 100 mg/dL
Dyslipidémie				
TG	≥ 1.7 mmol/L	≥ 2.0 mmol/L	≥ 1.7 mmol/L	≥ 1.7 mmol/L*
ou HDL				
Homme	< 0.9 mmol/L	< 1.0 mmol/L	< 1.03 mmol/L	< 1.03 mmol/L*
Femme	< 1.0 mmol/L	< 1.0 mmol/L	< 1.29 mmol/L	< 1.29 mmol/L*
Pression artérielle	≥ 140/90 mmHg*	≥ 140/90 mmHg*	≥ 130/85 mmHg*	≥ 130/85 mmHg*
Dysfonction rénale :	vitesse d'excrétion de l'albumine ≥ 20 g / min ou rapport albumine/créatine > 30 mg/g	-	-	-

Abréviations: World Health Organization: WHO ; European Group for study of Insulin Resistance: EGIR, National Cholesterol Education Program-Third Adult Treatment Panel: NCEP ; ATP III, Triglycérides: TG, High Density Cholesterol: HDL, International Diabetes Federation: IDF, T2D: type 2 diabetes, IR: insulin resistance, Waist Circumference: WC, impaired glucose tolerance/impaired fasting glucose: IGT/IFG ,

* : ou traitement spécifique, ** : valeurs pour les populations européennes, (valeurs variables suivant les ethnies d'origine)

Tableau de synthèse élaboré d'après les indications disponibles dans Alberti, 2005 et comme source spécifique pour l'IDF: http://www.idf.org/webdata/docs/IDF_Meta_def_final.pdf

Par ailleurs, les différents types d'hyperlipidémie peuvent être précisés en fonction des lipoprotéines concernées et du type de déficience (Tableau 3).

Tableau 3: Les différents types d'hyperlipidémie : les déficiences associées et leurs conséquences

Syndrome	Déficiences	Conséquences
Type I (Déficit familial en LPL, hyperchylomicronémie familiale)	(a) Déficit en LPL; (b) Production anormale de LPL; (c) Déficit en apoC-II	Clairance lente des chylomicrons ; taux réduits de LDL et de HDL. Traitement par régime pauvre en lipides et riche en glucides complexes. Pas de risque accru de maladies coronariennes
Hypercholestérolémie familiale Hyperlipoprotéinémie de type IIA	4 classes de mutations entraînant des déficiences du récepteur LDL	Réduction de la clairance des LDL conduisant à l'hypercholestérolémie, et entraînant l de l'athérosclérose et des maladies coronariennes
Type III (dysbetalipoprotéinémie familiale ; « <i>broad beta disease</i> » ; Déficience en apolipoprotéine E)	Le plus souvent, défaut de clairance des remnants hépatiques due à la déficience en apoE ; les patients n'expriment que l'isoforme apoE2 qui n'interagit que faiblement avec le récepteur apoE	Cause de xanthomes, d'hypercholestérolémie et d'athérosclérose dans les artères coronaires et périphériques en raison des niveaux élevés de chylomicrons et VLDL.
Type IV (hypertriglycéridémie familiale)	Production élevée de VLDL associés à l'intolérance au glucose et hyperinsulinémie	Fréquemment associé au diabète de type II non insulino-dépendant, à l'obésité, à l'alcoolisme ou à l'administration d'hormones progestatives ; taux de cholestérol élevé en raison de la quantité élevée de VLDL
Type V Familial	Chylomicrons et VLDL élevés, cause encore inconnue	Hypertriglycéridémie et hypercholestérolémie avec diminution des LDL et HDL
Hyperalphalipoprotéinémie familiale de type II	Augmentation du taux de HDL	Maladie rare qui est bénéfique pour la santé et la longévité
Hyperbetalipoprotéinémie familiale de type II	Augmentation de la production de LDL et clairance retardée des Triglycérides et des acides gras	Fortement associée à un risque accru de maladie coronarienne
ApoB défectueuse pour la fixation de ligands (familial)	2 mutations différentes: Gln pour Arg (acides aminés 3500) ou Cys pour Arg (acides aminés 3531), chacune conduisant à une affinité faible des LDL pour le récepteur LDL	Augmentation très importante du taux de LDL; aucun effet sur les taux de HDL, VLDL ou de triglycérides plasmatiques; cause d'hypercholestérolémie de maladies coronariennes

Déficiencia familiar en LCAT « Maladie de Norum, ou Fish-eye disease »	Absence de LCAT conduisant à l'incapacité des HDL à transporter le cholestérol (transport inverse du cholestérol)	Diminution du taux de esters de cholestérol plasmatiques et de lysolécithine; VLDL et LDL anormales (Lp-X) ; opacités de la cornée, déficiencias rénales
Maladie de Wolman (stockage des esters de cholestérols)	Défaut en cholesteryl ester hydrolase ; affecte le métabolisme des LDL	Réduction de la clairance des LDL conduisant à l'hypercholestérolémie, ce qui entraîne des maladies des artères coronaires et de l'athérosclérose
Déficiencia en « heparin-releasable hepatic triglyceride lipase »	Déficit en lipase conduisant à l'accumulation de HDL riches Triglycérides et en remnants de VLDL (IDL)	Provoque des xanthomes et des maladies coronariennes
Abetalipoprotéinémie (acanthocytose, syndrome de Bassen-Kornzweig)	Défaut de l'expression d'apoB entraînant l'absence de chylomicrons, VLDL et LDL	Maladie rare; malabsorption des graisses, rétinite pigmentaire, ataxie neuropathique, hématies en oursins
Hypobetalipoprotéinémie familiale	Au moins 20 mutations identifiées dans le gène de l'apoB, taux de LDL à 10-20% de la normale, taux de VLDL légèrement inférieur à la normale et taux d'HDL normal	Pathologie légère ou inexistante
Maladie de Tangier	Réduction des concentrations en HDL, aucun effet sur la production de chylomicrons ou des VLDL	Tendance à hypertriglycéridémie avec augmentation des VLDL; amygdales hypertrophiées avec une apparence orange

Sources: <http://themedicalbiochemistrypage.org/lipoproteins.html#uptake>

Abréviations : Lecithin-cholesterol acyltransferase : LCAT, lipoprotein lipase: LPL, apoprotein: apo, lipid peroxidase, lipoprotein-x: Lp-x.

1.2.1 Dyslipidémie

On parle de dyslipidémie lorsque les taux de cholestérol total, de TG et de cholestérol lié aux lipoprotéines de type *low density lipoprotein* (LDL) sont élevés et le taux de cholestérol lié aux lipoprotéines de type *high density lipoprotein* (HDL) est bas (Swan, 1999). Ce désordre serait dû à des fonctionnements anormaux de certains récepteurs membranaires de lipoprotéines (Steinberg & Witztum, 1999), à un faible catabolisme des particules riches en TG, ou à l'inverse, à un catabolisme accru des HDL (Chung *et al.*, 2003).

Les perturbations des activités des enzymes lipolytiques et des protéines de transport de lipides contribuent à augmenter la dyslipidémie (Antikainen *et al.*, 1993). En outre, celle-ci est généralement associée au diabète : en effet, 90% des patients diabétiques présentent également une mauvaise absorption des lipides par l'intestin et le foie (Fagot-Campagna *et al.*, 2000).

- L'hypertriglycémie est la forme la plus fréquente d'hyperlipidémie observée chez les patients ayant un diabète de type 2 (Durrington, 1995 ; Malmström *et al.*, 1997). L'hypertriglycémie est caractérisée par une forte proportion de particules de type *very low density lipoprotein* (VLDL) ou de type chylomicrons (CM) riches en TG, associée à des lipoprotéines de type *intermediate density lipoprotein* (IDL) et par une forte proportion de particules de LDL athérogènes de faible diamètre (dénommés *small dense LDL* ; Tan *et al.*, 1995 ; Lamarche *et al.*, 1997 ; Duell, 1999 ; Tushuizen *et al.*, 2005). Or, une teneur en TG plasmatiques supérieure à 10 mmol/L (0,113 mg.dL⁻¹) engendre un risque important de développer une maladie cardiovasculaire (Criqui *et al.*, 1993 ; Alberti *et al.*, 2006). Plusieurs études effectuées sur des milliers de patients ont conclu qu'une élévation du taux de TG de 1 mmol/L (0,0113 mg.dL⁻¹), sans modification du taux de HDL, augmente de 32% le risque de maladies cardiovasculaires chez les hommes et de 76% chez les femmes (Hokanson & Austin, 1996). L'augmentation des particules riches en TG a également pour effet d'augmenter la viscosité plasmatique, le taux de molécules inflammatoires comme l'apolipoprotéine (a), d'altérer la fibrinolyse et d'augmenter la prothrombose (Criqui *et al.*, 1993 ; Hokanson & Austin, 1996 ; Hodis *et al.*, 1999 ; Koschinsky & Marcovina, 2004).
- L'hypercholestérolémie est souvent liée à un facteur héréditaire (Kardia *et al.*, 2003). En présence de l'allèle ε4 du gène codant pour l'apoprotéine E, on observe une forte proportion de LDL-cholestérol plasmatique alors qu'en présence de l'allèle ε2, cette proportion est faible (Davignon *et al.*, 1988). Une augmentation du cholestérol plasmatique total de 5,2 à 6,2 mmol/L (soit de 200 à 240 mg/dL) augmente par 3 le risque de mort par maladie cardiovasculaire (Stamler *et al.*, 2000). L'augmentation du taux de LDL induit une altération des cellules endothéliales de la paroi artérielle (Hennig & Chow, 1988) et

gène des processus inflammatoires (Ross, 1999). L'oxydation des particules de LDL-cholestérol provoque la migration des monocytes de la circulation sanguine vers les lésions par chimiotactisme et les monocytes se différencient en macrophages (Regnström *et al.*, 1992). Les cellules spumeuses générées par l'accumulation de lipides dans les macrophages forment alors des plaques d'athéromes dans lesquelles s'accumulent les cristaux de cholestérol (Libby, 2003). Un infarctus du myocarde peut ensuite se produire lors de la rupture des plaques en cas d'ischémie.

1.2.2 L'obésité et ses conséquences

L'obésité peut être définie comme l'accumulation anormale de lipides dans les tissus adipeux ou comme une distribution régionale excessive de lipides dans l'organisme, ce qui entraîne des problèmes de santé (Bray & Gray, 1988). L'obésité est considérée actuellement comme une maladie ; elle est la conséquence de facteurs héréditaires, mais aussi du comportement alimentaire des personnes et de la sédentarité. Au niveau mondial, le surpoids est le sixième facteur de risque de contracter une maladie plus grave (Friedman, 2000). L'évolution du pourcentage d'obèses dans différents pays du monde est présenté en Figure 1.

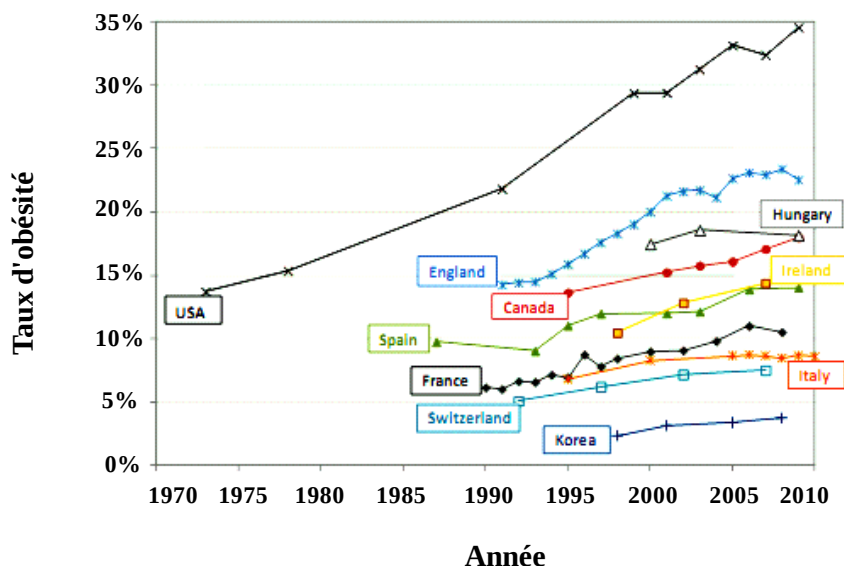


Figure 1.

Evolution du pourcentage d'individus obèses dans différents pays du monde. Les taux présentés sont les taux d'obésité chez les hommes ou les femmes de 15-64 ans (données normalisées en fonction de l'âge et du sexe)

(Source: <http://www.oecd.org/els/healthpoliciesanddata/49716427.pdf>)

Les études statistiques montrent qu'entre 1988 et 1994, 59,4% des hommes et 50,7% des femmes étaient en surpoids ou obèses aux Etats-Unis (NIHES : *The National Institute of Health Sciences* 1998) et environ 15% des hommes et 25% des femmes en Europe (Epstein *et al.*, 1992). L'évolution de la prévalence de l'obésité en France est représentée sur la Figure 2.

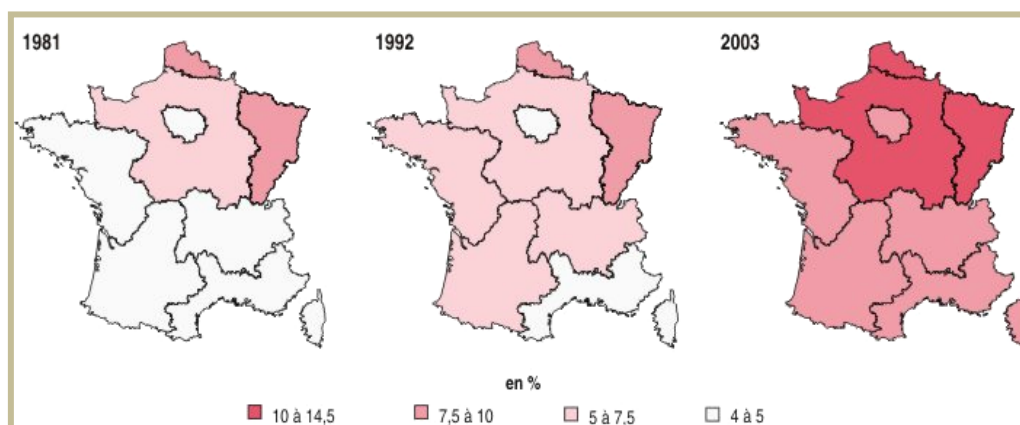


Figure 2.

Evolution de la prévalence de l'obésité en France. Ces cartes montrent l'augmentation de la prévalence de l'obésité et du surpoids depuis les années 1990 : la prévalence de l'obésité passe de 5 à 10% pour les hommes et de 6 à 10% pour les femmes entre 1992 et 2003. La France compte ainsi 3,6 millions d'adultes de moins de 65 ans obèses en 2003. Quant au surpoids, il touche toujours beaucoup plus les hommes (35%) que les femmes (21%). En revanche, les femmes obèses sont aujourd'hui plus nombreuses que les femmes en sous-poids. Les couleurs indiquent le pourcentage d'individus obèses, comme indiqué au bas de la figure. (Source : Enquêtes Santé, Insee : Insee Première N°1123 - février 2007, http://www.insee.fr/fr/themes/document.asp?ref_id=ip1123®_id=0)

L'obésité peut entraîner des complications telles que l'hypercholestérolémie, l'hypertension, l'hyperglycémie et constitue donc un facteur de risque d'athérosclérose (NCEP, 2002). Indépendamment du sexe, l'obésité multiplie par 5 le risque de développer un diabète de type 2 (ou diabète « gras » non insulino-dépendant), et donc le risque de contracter au final une maladie cardiovasculaire (NCEP ATPIII 2001 ; Chan *et al.*, 2002). Le diabète de type 2 représente 90% des diabètes ; il est la cause majeure de mort prématurée par maladie cardiovasculaire (80% des décès suite à des complications cardiovasculaires sont associés à un diabète de type 2 ; WHO, 1994). D'autres complications sont liées au diabète de type 2 (perte de la vue, amputation suite à une perte de la sensibilité au niveau des pieds, insuffisance rénale) et contribuent à augmenter la charge économique et sociale liée aux soins (WHO, 1994). L'intolérance au glucose liée à la résistance à l'insuline résulte en des

concentrations élevées en glucose dans le sang et conduit à une détérioration du pancréas. Le taux élevé de TG plasmatiques contribue aussi à l'augmentation de la résistance à l'insuline et endommage le système microvasculaire et donc les cellules du foie, des yeux ainsi que du système nerveux. La dyslipidémie athérogène liée au taux élevé de TG est très fréquente dans le cas de diabète de type 2. L'accumulation de glucose sanguin induit une surproduction de VLDL dans le foie, ainsi que de TG et d'apolipoprotéine B (apoB) associés aux VLDL, et une baisse de la production des particules HDL-cholestérol (Yusuf *et al.*, 2004).

1.2.3 Athérosclérose

L'athérosclérose est une maladie artérielle qui résulte d'un dépôt lipidique (essentiellement constitué de LDL-cholestérol formant des plaques d'athérome) sur la paroi interne des artères (aorte abdominale, coronaires, artères cérébrales, artères de jambes). Les signes cliniques principaux de cette maladie sont l'ischémie, l'infarctus du myocarde et des douleurs aux jambes (Isomaa *et al.*, 2001; Hansel *et al.*, 2004). Le profil lipidique pro-athérogène est associé à une dyslipidémie et diabétique 2. Il est caractérisé par de fortes teneurs en LDL, en TG associés aux VLDL et par un taux faible de HDL. La Figure 3 donne la composition des lipoprotéines athérogènes et anti-athérogènes du foie (Millán *et al.*, 2009).

Toutes les particules athérogènes fixent une molécule d'apolipoprotéine B, alors que l'apoprotéine A-1, anti-athérogène, est le composant protéique principal des HDL (Figure 3). En conséquence, le rapport entre apoB and apoA-1 est un indicateur du risque cardiovasculaire : plus ce rapport est élevé, plus le risque est grand (Millán *et al.* 2009).

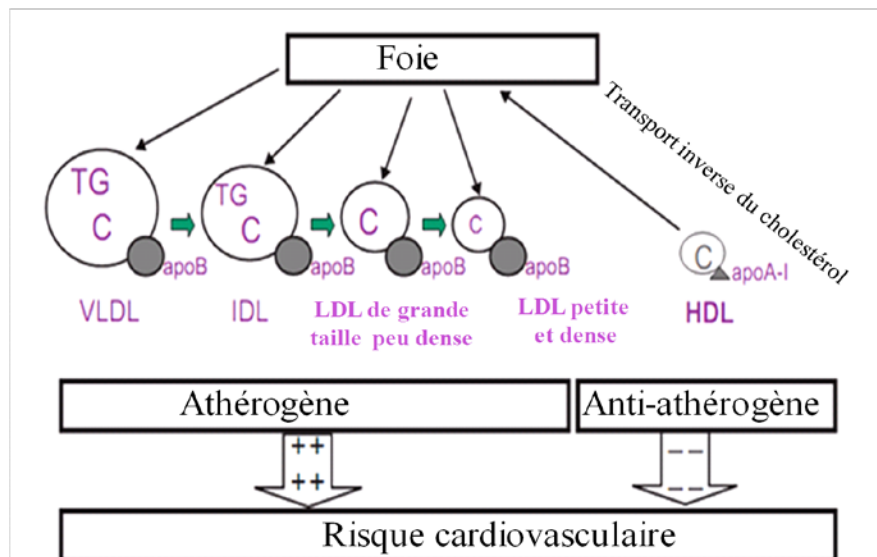


Figure 3.

Lipoprotéines et risque cardiovasculaire. Ce schéma illustre le fait que toutes les particules athérogènes (VLDL, IDL ou LDL) fixent chacune une molécule d'apolipoprotéine B (apoB). Le taux d'apoB est donc directement corrélé au taux de particules potentiellement athérogènes. L'apolipoprotéine A-1 (apoA-1) est le principal composant protéique des lipoprotéines de type HDL (anti-athérogènes), et initie le transport inverse de cholestérol. Le rapport ApoB/ApoA-1 est donc indicateur du risque cardiovasculaire. Plus ce rapport est élevé, plus le risque est grand (D'après Millán et al., 2009).

Abréviations: TG, triglycérides ; C, cholestérol ; + +, risqué augmenté ; - -, risque diminué.

2. Les différentes classes de lipoprotéines

Les particules de lipoprotéines forment un complexe macromoléculaire et sont composées de 3 types de molécules. Le cœur interne non polaire est constitué d'esters de cholestérol et de TG. Il est entouré d'un manteau formé de phospholipides, de cholestérol libre et d'apolipoprotéines (Figure 4). Ces macromolécules diffèrent les unes des autres selon leur contenu en protéines et lipides et sont classées de manière conventionnelle en fonction de leurs propriétés physiques telles que la charge, la densité ou la taille des particules (Figure 5). On distingue les chylomicrons, les VLDL, les LDL, les IDL ou encore les HDL. Les lipoprotéines sont également classées selon leur contenu en apoprotéines situées à la surface des particules (Tableau 4)

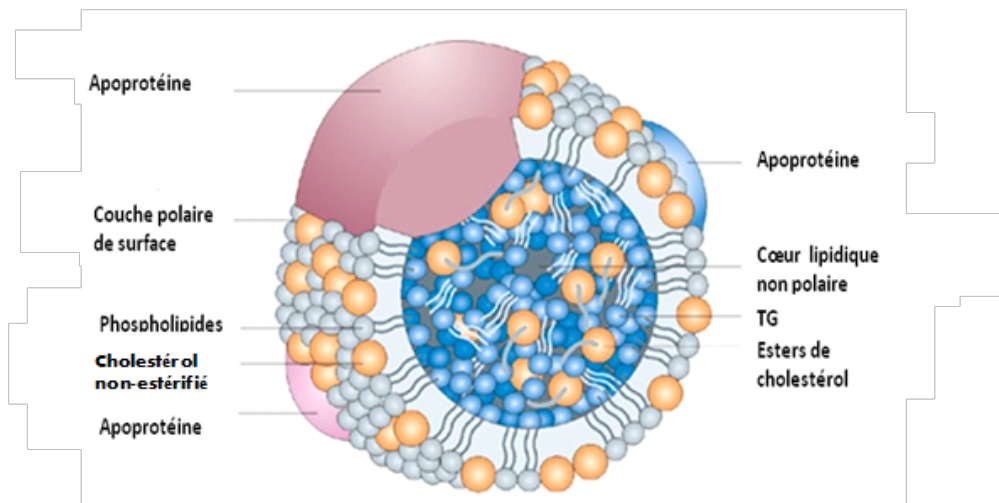


Figure 4.

Schéma illustrant la structure générale des lipoprotéines. Les esters de cholestérol et de TG sont situés au cœur des lipoprotéines et recouverts par une monocouche de phospholipides. Les apolipoprotéines sont enchâssées dans la couche de phospholipides qui confère les propriétés structurales et fonctionnelles à la molécule (D'après Wasan et al., 2008).

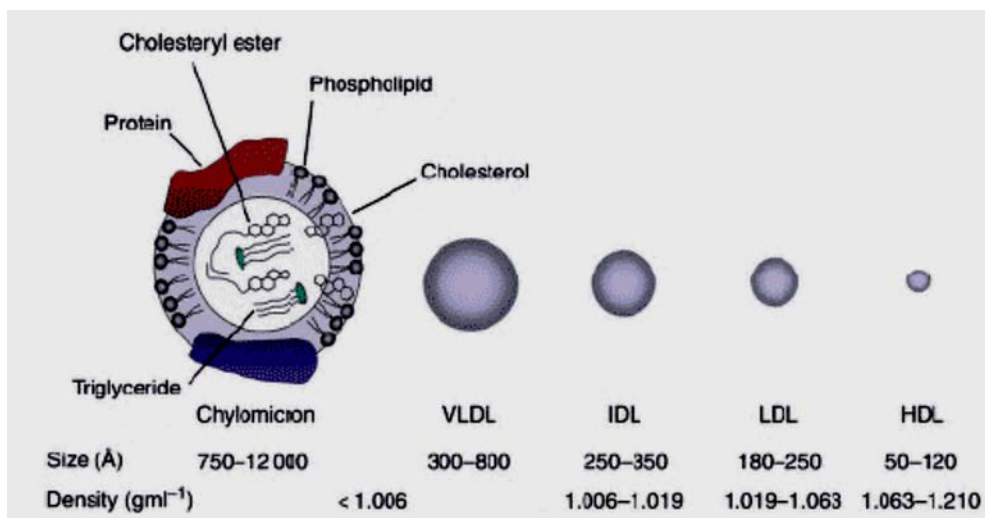


Figure 5.

Schéma illustrant les différents types de lipoprotéines (d'après F.E. Thorngate & D.L. Williams : <http://www.morphology.dp.ua/dict/?wid=770>)

Tableau 4. Propriétés physico-chimiques et composition des lipoprotéines plasmatiques humaines

<u>Propriétés physiques</u>				<u>Propriétés chimiques</u>					
Classe	Taille (nm)	Densité (g/mL)	Mobilité	<u>Coeur (%)</u>		<u>Surface (%)</u>		<u>Apoprotéines</u>	
				TG	EC	CL	PL	Principales	Autres
CM	75-1200	0,93	à l'origine	86	3	2	7	ApoB-48	A-I, A-IV, C-I, C-II, C-III
CMR	30-80	0,930-0,006	slow pre-β	58	-	-	-	ApoB-48	E, A-I, A-IV, C-I, C-II, C-III
VLDL	30-80	0,95-1,006	pre-β	55	12	7	18	ApoB-100	E, A-I, A-II, A-V, C-I, II, III
IDL	25-35	1,006-1,019	slow pre-β	23	29	9	19	ApoB-100	E, C-I, C-II, C-III
LDL	18-25	1,019-1,063	β	6	42	8	22	ApoB-100	
HDL	5-12	1,062-1,21	α	5	17	5	33	ApoA-I	A-II, A-IV, E, C-III

EC, Esters de cholestérol; CL, cholestérol libre; PL, phospholipides; TG, triglycérides.
D'après Mansbach & Dowell (1995) et Rader *et al.*, (2008)

2.1 Les chylomicrons (CM)

Les lipides alimentaires sont absorbés par les cellules de la muqueuse intestinale. A ce niveau, le cholestérol et les TG forment des particules de CM avec les apo-B48, apo-CI et apo-CII. Ces particules sont secrétées par la muqueuse intestinale à travers le système lymphatique mésentérique vers la circulation sanguine (Wasan & Classidy, 1998). Les CM acquièrent les esters de cholestérol des HDL à l'aide de la « *Cholesteryl Ester Transfer Protein* (CETP) » et de certaines apo-C. Les apo-C participent à la reconnaissance des CM par la lipoprotéine lipase liée à l'endothélium capillaire des tissus adipeux et les muscles squelettiques (Cahil, 2006). L'hydrolyse des TG des CM par la lipoprotéine lipase est facilitée par le cofacteur apo-CII et convertit les CM en CM résiduels ou "remnants" (CMR). Les AG sont libérés du cœur interne des CM et fournissent l'énergie nécessaire aux tissus extra-hépatiques. Les CMR sont plus petits et plus riches en cholestérol que les CM. La perte de l'apo-A, le remplacement de l'apo-C par l'apo-E diminue l'affinité du CMR pour la lipoprotéine lipase. Les remnants retournent alors dans la circulation et sont captés par un récepteur hépatique pour être incorporés dans le foie par endocytose. Le récepteur des remnants, localisé à la surface des hépatocytes, reconnaît l'apo-E des CMR tandis que l'apo-

B100 est plutôt un composant structural des remnants et n'est pas un site de reconnaissance (Wasan & Classidy, 1998 ; Havel, 2010).

2.2 Les VLDL

Les particules VLDL sont riches en TG et sont surproduites lors d'un diabète dyslipidémique (Taskinen, 2003 ; Adiels *et al.*, 2006). L'étude de la formation et de la surproduction des VLDL a été cruciale pour la compréhension des troubles du métabolisme lipidique (Taskinen, 2003). La protéine microsomale de transfert (MTP) de TG dans le réticulum endoplasmique rugueux est essentielle à la sécrétion d'apo-B100 (Boren *et al.*, 1992 ; Raabe *et al.*, 1998) et à l'assemblage lipidique des VLDL dans le foie (Olofsson *et al.*, 2000 ; Olofsson & Boren, 2005) via des pré-VLDL primordiaux (Bostrom *et al.*, 1988). Ces particules de pré-VLDL sont maturées par lipidation et secrétées par les cellules du réticulum endoplasmique (Stillemark *et al.*, 2005). Une protéine G, le facteur ARF-1 de ribosylation de l'ADP, est le facteur-clé de la lipidation et de la transmission membranaire des VLDL du réticulum endoplasmique vers l'appareil de Golgi, dans lequel la synthèse finale des VLDL a lieu (Stillemark *et al.*, 2000 ; Asp *et al.*, 2005). Les particules VLDL sont secrétées par le foie et subissent une hydrolyse importante. Les TG sont hydrolysés par l'action combinée de la lipoprotéine lipase (LPL) et la lipase hépatique (HL). Les VLDL riches en TG sont alors convertis en IDL par la LPL. La LPL peut être inhibée par l'apo-CIII (Arbeeny & Rifici, 1984 ; Ginsberg *et al.*, 1986). Les IDL sont alors transformées en LDL riches en cholestérol par l'action de la CETP qui transporte les esters de cholestérol (Arbeeny & Rifici, 1984). C'est le taux d'enrichissement en cholestérol et la teneur en apo-E des VLDL qui sont les facteurs orientant les VLDL vers un type particulier de récepteurs. Les particules avec une teneur élevée en apo-E et en cholestérol sont métabolisées de la même manière que les CMR (Arbeeny & Rifici, 1984), alors que les remnants VLDL sériques, autrement dits les LDL, sont pour la plupart éliminés par les récepteurs des LDL (Cooper *et al.*, 1982).

2.3 Les LDL

Les particules de LDL sont constituées d'un cœur formé d'esters de cholestérol et de TG entouré d'un manteau composé de cholestérol non-estérifié, de phospholipides, d'apo-B100 et parfois de petites apoprotéines telles que l'apo-CIII et l'apo-E (Lee & Alaupovic, 1974). La reconnaissance des LDL par les récepteurs LDL est modulée par l'apo-B100 (Lund-Katz *et al.*, 1998). La concentration en apo-B100 est directement proportionnelle à la concentration en LDL, car chaque particule de LDL possède une molécule d'apo-B100 dans

la circulation plasmatique qui participe à l'élimination des LDL du plasma (Segrest *et al.*, 2001).

La lipolyse par action de la HL transforme les IDL en LDL de grande taille (Zambon *et al.*, 2003) et, associée à l'action de la CETP, conduit à l'obtention de petites particules de LDL (Deckelbaum *et al.*, 1984). Ces petites particules de LDL diffèrent des grandes, car elles ont un faible taux de cholestérol, estérifié ou non (Capell *et al.*, 1996 ; McNamara *et al.*, 1996). La CETP effectue un transfert net des esters de cholestérol depuis les HDL vers les VLDL, et des TG depuis les VLDL vers les HDL (Collet *et al.*, 1999). Les VLDL jouent le rôle de réservoir d'esters de cholestérol pour les HDL.

2.4 Les HDL

Les particules de HDL représentent un groupe de lipoprotéines ayant des proportions de lipides et de protéines presque équivalentes. Elles sont classées sur la base de leurs caractéristiques physiques et leur contenu en apoprotéines qui jouent un rôle primordial dans la reconnaissance des HDL par les récepteurs et dans la régulation métabolique (Eisenberg, 1984 ; Pieters *et al.*, 1994; Havel & Kane, 1995; Breslow, 1995).

Le groupe majeur des apoprotéines inclut les apo-AI et apo-AII et le groupe mineur contient les apo-AIV, apo-C, apo-D et apo-E (Eisenberg, 1984 ; Pieters *et al.*, 1994 ; Breslow, 1995). Les HDL de classe 1 contiennent un taux élevé en phospholipides et apo-AI, au contraire des HDL de classe 2, ou pré β -HDL, ont une teneur plus faible en apo-AI et en phospholipides. Les HDL de classe 3 riches en cholestérol, ou α -HDL, sont les HDL les plus abondantes et possèdent deux apoprotéines supplémentaires à la surface externe de la particule (Eisenberg, 1984 ; Pieters *et al.*, 1994 ; Breslow, 1995). Les HDL sont des transporteurs de phospholipides et de cholestérol et permettent de recycler ces lipides lors du processus de transport inverse du cholestérol. La seconde fonction principale des HDL est d'être un réservoir d'apo-E et d'apo-C, ces protéines contribuant à la formation des lipoprotéines riches en TG et à l'activation de leur lipolyse.

2.5 Les IDL

Les TG des VLDL sont hydrolysées par la LPL générant ainsi les particules d'IDL. Ces IDL sont éliminées de la circulation soit par endocytose, soit par l'action de la HL et de la CETP (Havel & Kane, 1995). Les IDL sont les précurseurs principaux des LDL athérogènes (Soutar *et al.*, 1982 ; Fisher *et al.*, 1991 ; Cummings *et al.*, 1995), mais les IDL ne sont pas les

précurseurs directs des LDL impliqués dans l'hyperlipidémie familiale. En effet, dans le cas d'une hyperlipidémie familiale, les VLDL ne subissent pas l'action des lipoprotéines lipases et les IDL ne sont donc pas formées (Goldberg, 1996).

3. Les différents types d'apoprotéines

Les apoprotéines interagissent individuellement avec les particules lipidiques pour former les lipoprotéines. Parmi les différents types d'apoprotéines connus (apo-AI, -AII, -AIV, -B, -CI, -CII, -CIII, -D, -E et apo(a)), l'apo-B est le composant principal dans la formation et le métabolisme des lipoprotéines (Scanu, 1966 ; Scanu *et al.*, 1969 ; Jackson *et al.*, 1974 ; Jackson *et al.*, 1977). Leurs fonctions de base sont la reconnaissance de récepteurs par les particules lipoprotéiques, le transport et le métabolisme lipidique (La Rosa *et al.*, 1970 ; Havel *et al.*, 1970 ; Cooper *et al.*, 1991). Lorsque les apoprotéines s'associent aux particules lipidiques, elles subissent un changement conformationnel et voient leur taux d'hélices α augmenter, tandis que la fixation des phospholipides entraîne un « shift » de la fluorescence des résidus de tryptophanes (décalage de la longueur d'onde d'émission vers des valeurs plus faibles), témoignant d'un microenvironnement devenu plus hydrophobe (Segrest *et al.*, 1974). Par ailleurs, Cooper *et al.* (1991) ont montré que le dosage des apoprotéines était plus approprié que le dosage des lipoprotéines pour la recherche de maladies coronariennes.

3.1 Apo-AI

L'apo-AI est le paramètre le plus adapté pour doser les HDL (Kottke *et al.*, 1986 ; Durrington *et al.*, 1988 ; Cooper *et al.*, 1991 ; Stampfer *et al.*, 1991). L'apo-AI représente environ 70% de la partie protéique des HDL (Brewer *et al.*, 1972). Elle est composée d'une seule chaîne polypeptidique de 223 résidus d'acides aminés pour une masse moléculaire de 28 kDa. L'apo-AI active la LCAT qui est responsable de l'estérification du cholestérol plasmatique (Brewer *et al.*, 1974). Les études de Miller (1987) ont montré que les taux d'ARNm de l'apo-AI sont inversement proportionnels au risque de développer une maladie coronarienne.

3.2 Apo-AII

L'apo-AII est la seconde apoprotéine la plus abondante, elle représente 20% de la masse protéique totale des HDL. La forme plasmatique existe à l'état de dimère constitué de deux chaînes identiques de 77 résidus d'acides aminés (masse moléculaire des monomères de

8,7 kDa), reliées par un pont disulfure (Brewer *et al.*, 1972 ; Schonfeld *et al.*, 1978 ; Tall, 1998). De nombreuses études tendent à montrer qu'une augmentation du taux d'apo-AII perturbe le transport inverse du cholestérol (Barbaras *et al.*, 1987 ; Mehrabian *et al.*, 1993 ; Castellani *et al.*, 1997 ; Tall, 1998). Une surexpression de l'apo-AII dans des souris transgéniques montre que les lipoprotéines deviennent de moins bons substrats pour la HL, ce qui entraîne une baisse de la vitesse d'hydrolyse des VLDL et des CM et une augmentation des TG associés à l'hyperlipidémie (Lawrence *et al.*, 2008). L'apo-AII est transférée des HDL vers les VLDL, ce qui réduit l'affinité des VLDL pour les enzymes lipolytiques. La surexpression de l'apo-AII dans les souris induit une hyperlipidémie et une hypercholestérolémie marquées, un taux plasmatique en acides gras libres (AGL) élevé, ainsi que le développement d'une résistance à l'insuline, l'apparition de tissu adipeux et une augmentation de l'athérosclérose (Hedrick *et al.* ; 1993 ; Warden *et al.*, 1993 ; Castellani *et al.*, 1997 ; 2001 ; 2004). Selon Lawrence *et al.* (2008), l'hypertriglycémie est essentiellement une conséquence de la résistance à l'insuline chez des souris surexprimant l'apo-AII.

Le dosage de l'apo-AII est un indicateur pour diagnostiquer des maladies telles que le diabète de type 2, l'athérosclérose et l'obésité abdominale (Vohl *et al.*, 1997 ; Baier *et al.*, 1998 ; Elbein *et al.*, 1998 ; Cerne *et al.*, 2000 ; van't Hooft *et al.*, 2001). L'apo-AII est également impliquée dans l'hyperlipidémie familiale combinée (Allayee *et al.*, 2003).

3.3 Apo-B

Dans le plasma humain, l'apo-B existe sous deux isoformes, l'apo-B48 et l'apo B100 (revues de Smith *et al.*, 1978 et Kane *et al.*, 1995). L'apo-B100 est une protéine monomérique de masse moléculaire égale à 515 kDa, contenant 4536 résidus d'acides aminés. Elle est synthétisée dans le foie et est nécessaire à l'assemblage des VLDL. L'apo-B100 entre également dans la composition des IDL et des LDL. Après le relargage des apo-A, apo-C, et apo-E, elle devient le principal constituant apoprotéique des LDL. Après hydrolyse des TG, les particules de VLDL sont converties en LDL, qui sont à leur tour catabolisées *via* un processus médié par un récepteur spécifique des LDL, le LDL-R. L'apo-B100 est le ligand physiologique principal du LDL-R (Havel, 1984). L'apo-B100 est nécessaire à la sécrétion des lipoprotéines riches en TG par le foie et reste associée aux particules jusqu'à leur élimination de la circulation sanguine (Hamilton, 1983). Un métabolisme anormal des

lipoprotéines contenant l'apo-B100 génère une hyperlipidémie et augmente le risque de maladies cardiovasculaires (Schneeman *et al.*, 1993).

Chez l'homme, l'apo-B d'origine intestinale est représentée par l'isoforme apo-B48 qui est la forme protéique majoritaire des CM et des remnants CMR. L'apo-B48 correspond approximativement à la moitié de la séquence amino-terminale de l'apo-B100. Sa synthèse résulte de la présence d'un codon stop sur l'ARNm intestinal de l'apo-B (Hussain *et al.*, 2001). L'apo-B48 est essentielle à l'absorption intestinale des lipides alimentaires et à l'assemblage des CM (Kendrick *et al.*, 2001).

3.4 Apo-CI

L'apo-CI est composée de 55 résidus d'acides aminés et possède une masse moléculaire de 6,6 kDa (Jackson *et al.*, 1974). L'Apo-CI active la LCAT (Hamsten *et al.*, 2005). L'association de l'apo-CI et des lipoprotéines riches en TG permet à ces particules de se lier aux récepteurs hépatiques (Jong *et al.*, 1999). Le transfert de l'apo-CI des HDL aux LDL riches en TG contribue à l'enrichissement en cholestérol des remnants de LDL notamment, et au développement précoce d'athérosclérose (Hamsten *et al.*, 2005).

3.5 Apo-CII

L'apo-CII possède une masse moléculaire de 8,5 kDa et 78 résidus d'acides aminés (Jackson *et al.*, 1977). L'apo-CII active la LPL qui hydrolyse les TG dans les particules CM. En effet, la région carboxy-terminale de l'apo-CII forme des hélices α amphipathiques qui ancrent l'apoprotéine dans la particule lipidique et qui lui permettent d'interagir avec la LPL (Smith *et al.*, 1980). Des personnes déficientes en apo-CII présentent une accumulation importante de lipoprotéines riches en TG dans le plasma (Catapano *et al.*, 1979) et une hypertriglycéridémie aigüe est observée chez les individus qui ne peuvent pas synthétiser l'apo-CII (Fojo & Brewer, 1991 ; Fojo *et al.*, 1991).

3.6 Apo-CIII

L'apo-CIII contient 79 résidus d'acides aminés pour une masse moléculaire de 8,7 kDa (Brewer *et al.*, 1974). L'apo-CIII est le constituant protéique majeur des CM riches en TG et des VLDL. C'est un marqueur du taux de lipoprotéines riches en TG. L'apo-CIII est

produite par le foie et l'intestin. Elle inhibe l'activation de la LPL par l'apo-CII et donc l'hydrolyse des TG des CM et VLDL, et au final, inhibe l'élimination de ces particules par le foie (Ginsberg *et al.*, 1986 ; McConathy *et al.*, 1992). La surexpression d'apo-CIII se traduit par une hypertriglycémie importante (Jong *et al.*, 1999 ; Hulthe *et al.*, 2000).

3.7 Apo-E

L'apo-E est un constituant des lipoprotéines riches en TG, les CM, VLDL et HDL (Ou *et al.*, 1998). L'apo-E est une protéine glycosylée de 299 résidus d'acides aminés et de masse moléculaire comprise entre 34 et 37 kDa en fonction des isoformes E2, E3 et E4 (Rall *et al.*, 1983). La fréquence des trois variants parmi la population est de 8% pour E2, 77% pour E3 et 15% pour E4 (Ou *et al.*, 1998). La présence de l'allèle $\epsilon 2$ a un faible impact sur le taux de cholestérol plasmatique tandis que la présence de l'allèle $\epsilon 4$ est responsable de son augmentation, et particulièrement de celle du LDL-cholestérol (Davignon *et al.*, 1988 ; Ou *et al.*, 1998 ; Song *et al.*, 2004). L'apo-E est impliquée dans le transport des TG, des phospholipides, des esters de cholestérol et du cholestérol libre dans la cellule et hors de la cellule. Elle possède une forte affinité pour le récepteur LDL-R. L'apo-E est considérée comme un marqueur fort dans la prédiction du risque de contracter une maladie cardiovasculaire (Mahley & Rall, 2000).

3.8 Apo (a)

La concentration plasmatique en apo (a) humaine est fortement corrélée à la fréquence de maladies coronariennes (Kostner *et al.*, 1981 ; Armstrong *et al.*, 1986 , Rhoads *et al.*, 1986). L'apo (a) humaine ou simienne présente une homologie étroite avec le plasminogène et présente des séquences internes répétées (MacLean *et al.*, 1987 ; Tomlinson *et al.*, 1989). L'apo (a), en se liant *via* un ou plusieurs ponts disulfures à l'apo-B100, forme la lipoprotéine (a) (Simons *et al.*, 1970 ; Ehnholm *et al.*, 1972 ; Utermann & Weber, 1983). Il existe plusieurs formes polymorphiques d'apo (a) ayant des masses moléculaires comprises entre 419 et 838 kDa (Gaubatz *et al.*, 1983 ; 1990). On suppose que les particules riches en cholestérol et contenant de l'apo (a) seraient athérogènes en se fixant sur la paroi interne des vaisseaux sanguins aux endroits où l'endothélium est endommagé (Stenman *et al.*, 1980 ; Vaheri *et al.*, 1983).

4. Les récepteurs de lipoprotéines

Dans la circulation, les lipoprotéines subissent des modifications par les protéines de transfert, d'enzymes et d'autres transporteurs cellulaires qui délivrent les lipoprotéines de leur tissu d'origine vers d'autres sites cibles. La capture et l'épuration des lipoprotéines est ensuite médiée par des récepteurs membranaires.

4.1 La superfamille du LDL-R

Il existe plusieurs mécanismes pour garantir l'apport adéquat de cholestérol à la cellule et pour réaliser l'absorption du cholestérol apporté par les lipoprotéines. Tous les récepteurs de la superfamille du LDL-R procèdent à l'endocytose des lipoprotéines au moyen de vésicules recouvertes de clathrine (*clathrin-coated pit*), suivie d'une dégradation lysosomale qui libère le cholestérol pour le métabolisme cellulaire (Garcia *et al.*, 2001). La Figure 6 présente les membres de la famille du LDL-R et leur structure. Cette famille est composée de protéines transmembranaires partageant des motifs structuraux caractéristiques du LDL-R. Leur domaine extracellulaire contient (en N-terminal) un domaine de liaison des ligands (lipoprotéines contenant l'apo B100 ou l'apo E) renfermant 7 séquences répétées de 40 résidus riches en résidus de cystéine et la séquence signature Ser-Asp-Glu. Il est suivi d'un domaine de 400 résidus ressemblant au précurseur du facteur de croissance de l'épiderme (*Epidermal Growth Factor* ou EGF) qui serait impliqué dans la dissociation acide-dépendante des LDL et au recyclage du récepteur. Le domaine suivant est un cluster fortement O-glycosylé, riche en résidus Ser et Thr, dont l'importance fonctionnelle n'est pas clarifiée. Le domaine d'ancrage à la membrane relie l'extrémité C-terminale au cluster O-glycosylé. Sa délétion entraîne la sécrétion d'une forme tronquée du récepteur. Enfin, la queue cytoplasmique est constituée de 50 résidus impliqués dans l'adressage du récepteur aux vésicules riches en clathrines et dans la transduction du signal.

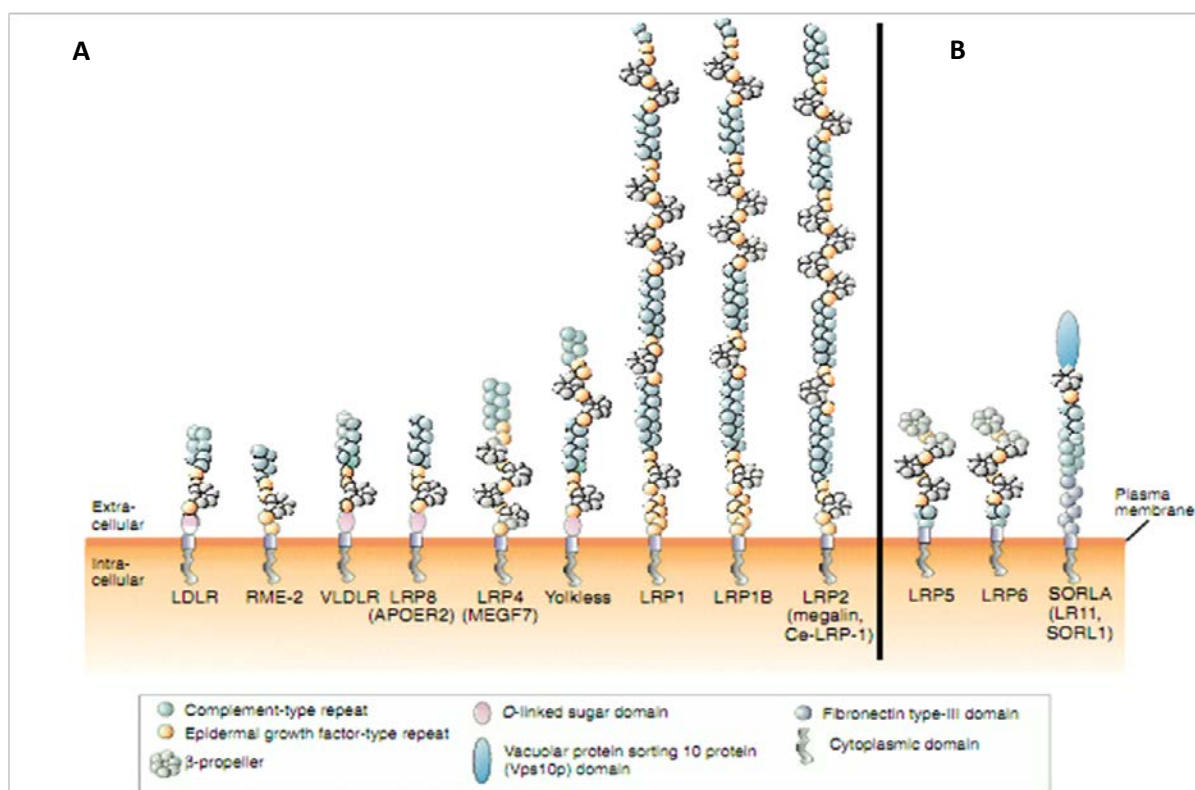


Figure 6.

Famille des récepteurs LDL-R (adapté de Willnow *et al.*, 2007). A: Récepteurs considérés comme les principaux membres de la famille LDL-R. B: Récepteurs plus éloignés, en raison d'un module inversé (LRP5/6) ou combiné à des motifs non retrouvés dans les autres récepteurs.

Abréviations : APOER2, Apo-E receptor 2 ; Ce, *C. elegans* ; LDLR, Low Density Lipoprotein Receptor ; LRP, LDL receptor-related protein ; MEGF7, multiple epidermal growth factor-type repeat containing protein 7; RME-2, receptor-mediated endocytosis-2 ; SORLA, sortilin-related receptor with A-type repeats ; VLDLR, very low-density lipoprotein receptor.

4.1.1 Low Density Lipoprotein Receptor (récepteur LDL-R)

Ce récepteur est l'archétype de la superfamille des LDL-R, il est localisé dans la membrane plasmique des cellules cibles. C'est une glycoprotéine composée d'une seule chaîne polypeptidique de 839 résidus d'acides aminés (récepteur humain) qui fixe les particules de LDL, préalablement à leur endocytose (Daly *et al.*, 1995 ; Goldstein *et al.*, 2001). C'est le régulateur de base de l'homéostasie du cholestérol. Une déficience génétique en LDL-R résulte en l'accumulation du cholestérol circulant dans le sang associée à de l'hypercholestérolémie familiale (Goldstein *et al.*, 2001). Les autres membres de cette famille de récepteurs démontrent d'autres rôles plus éloignés de l'homéostasie du cholestérol, qui sont présentés ci-dessous.

4.1.2 Receptor-mediated endocytosis (récepteur RME-2)

Ce récepteur est constitué de 925 résidus d'acides aminés (Grant & Hirsh, 1999) et sa structure contient deux domaines EGF (*epidermal growth factor* ; Sudhof *et al.*, 1985). Une des fonctions du récepteur RME-2 est de réaliser l'endocytose, par exemple de la vitellogénine chez les ovipares, sous contrôle hormonal (Bujo *et al.*, 1997). Ce récepteur joue un rôle dans le transport des acides gras dans les ovocytes (Grant & Hirsh, 1999), et participe à la formation de gouttelettes de lipides neutres dans la membrane du réticulum endoplasmique (Le *et al.*, 2010).

4.1.3 Very low density lipoprotein receptor (récepteur VLDL-R)

Le récepteur VLDL-R est une protéine de 846 résidus d'acides aminés (Oka *et al.*, 1994). C'est le récepteur le plus proche structuralement du LDL-R dont il ne diffère que par la présence d'un "LDL type-A repeat" additionnel. Cette différence entraîne cependant une spécificité différente pour les lipoprotéines. Alors que le LDL-R reconnaît principalement les LDL, le VLDL-R reconnaît les lipoprotéines riches en TG et contenant de l'apo-E, comme les VLDL, les IDL et les chylomicrons. En revanche, le récepteur ne reconnaît pas les LDL contenant uniquement l'apo-B100 (Takahashi *et al.*, 1992). L'expression du VLDL-R est élevée dans le muscle squelettique, cardiaque et les tissus adipeux, le cerveau, mais très faible dans le foie (Wyne *et al.*, 1996). Son rôle physiologique serait de délivrer des particules riches en TG aux tissus périphériques (Wyne *et al.*, 1996) ou d'immobiliser ces particules à la surface des cellules endothéliales pour faciliter l'action de la Lipoprotein Lipase (LPL) et permettre l'apport d'AGL aux tissus adjacents (Takahashi *et al.*, 1995). Ce récepteur serait également impliqué dans la transduction du signal pour le développement du cerveau (Moheb *et al.*, 2008)

4.1.4 Low density lipoprotein receptor-related protein 8 (récepteur LRP8)

Ce récepteur, également connu sous l'appellation *apo-E receptor 2* (apo-ER2), est constitué d'une chaîne polypeptidique de 782 résidus d'acides aminés (Olson *et al.*, 2007). Il possède un domaine cytoplasmique riche en résidus de sérine et thréonine qui interagit avec la *mitogen-activated protein* (MAP) kinase 8 (Yasuda *et al.*, 1999 ; Stockinger *et al.*, 2000). Chez l'Homme, l'ARNm du récepteur LRP8 est retrouvé dans le cerveau, le placenta et chez

le lapin, l'ARNm a été également retrouvé au niveau des testicules et, dans un degré moindre, au niveau des ovaires (Kim *et al.*, 1996). Le récepteur LRP8 lorsqu'il se lie à la réeline, une protéine primordiale dans le processus de migration neuronale lors du développement du cerveau, déclenche la phosphorylation de la protéine *disabled-1* (DAB-1), un régulateur-clé dans l'activation de la réeline. Les souris déficientes en LRP8 développent une couche anormale de neurones dans le cortex cérébral, l'hippocampe et le cervelet (Trommsdorff *et al.*, 1998 ; 1999) et une incapacité d'apprentissage chez les adultes (Beffert *et al.*, 2005).

4.1.5 Low-density lipoprotein receptor-related protein 4 (récepteur LRP4)

Le récepteur est composé de 1113 résidus d'acides aminés et possède de multiples fonctions. Par exemple, il joue un rôle crucial dans l'ostéogenèse en modulant la transmission (*signaling*) de la protéine BMP (*bone morphogenetic protein*) et stimule la voie complexe Wnt (Tomita *et al.*, 1998) [remarque : le nom Wnt (prononcer [winnt]) est la réunion de Wg (*wingless*, en français « sans aile ») et Int (intégration site). Le gène *wingless* a été identifié en premier lieu en tant que gène impliqué dans la morphogenèse chez *Drosophila melanogaster* (Rijsewijk *et al.*, 1987). En cas de déficience en LRP4, l'embryogénèse n'est pas réalisée correctement et affecte la formation du système limbique (Johnson *et al.*, 2005).

4.1.6 Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (récepteur LRP1)

Le récepteur LRP1 fait également partie de la superfamille des LDL-R (Willow *et al.*, 1994). Il se lie aux lipoprotéines enrichies en apo-E (β -VLDL), à la MAP (mitogen activated proteins) kinase, phosphoinositide 3 kinase (PI3K) et à l'« *Extracellular signal related kinase* » (ERK) (Orr *et al.*, 2003), à la protéine précurseur amyloïde et à certains facteurs de croissance (Boucher *et al.*, 2003). Le récepteur LRP-1 a non seulement un rôle de transport endocytaire de ses ligands, mais il est aussi impliqué comme co-récepteur dans la transduction du signal (Strickland *et al.*, 2003 ; Lillis *et al.*, 2005 ; May *et al.*, 2005).

4.1.7 Low-density lipoprotein receptor-related protein 2 (récepteur LRP2) ou mégaline

Le récepteur LRP2 est aussi appelé mégaline ou gp330 (Barth & Argraves, 2001). Il est exprimé à la surface apicale de nombreuses cellules épithéliales et est essentiel pour le développement du cerveau (Saito *et al.*, 1994 ; Willnow *et al.*, 1996). Il est aussi

exprimé au niveau des cellules épithéliales neuronales de l'embryon aussi bien qu'au niveau de l'endoderme viscéral du sac vitellin (Zheng *et al.*, 1994 ; Willnow *et al.*, 1996).

4.1.8 Low-density lipoprotein receptor-related protein suppresseur de tumeurs (récepteur LRP1B)

Le récepteur LRP1B, de la superfamille des LDL-R, est constitué de 4599 résidus d'acides aminés (Liu *et al.*, 2000). La région C-terminale 3276-4599 est composée d'un domaine homologue à un précurseur de facteur de croissance épidermique riche en résidus de cystéine (Li *et al.*, 2000 ; 2001 ; Obermoeller *et al.*, 2001). Le récepteur LRP1B altère l'invasion cellulaire par les métastases et est un candidat potentiel pour la suppression des tumeurs (Liu *et al.*, 2001). Le rôle précis de LRP1B dans le métabolisme lipidique est toujours en cours d'investigation, mais des études *in vitro* montrent que LRP1B se lie aux lipoprotéines contenant de l'apoE (HDL et VLDL), suggérant que LRP1B peut lier et internaliser ces lipoprotéines (Haas *et al.*, 2011).

4.1.9 Low-density lipoprotein receptor-related protein 5 et 6 (récepteurs LRP5 et LPR6)

Les récepteurs LRP5 et LRP6 sont des protéines homologues qui ont une seule région transmembranaire (Brown *et al.*, 1998) et agissent comme co-récepteurs dans la voie Wnt (Tamai *et al.*, 2000 ; Semenov *et al.*, 2001). Le récepteur LRP6 est exprimé de façon ubiquitaire pendant le développement embryonnaire (Pinson *et al.*, 2000). LRP6 joue un rôle dans la différenciation cellulaire lors de l'embryogénèse (Brown *et al.*, 1998 ; Wehrli *et al.*, 2000) tandis que LRP5 est impliqué dans le contrôle du maintien de la masse osseuse, de la cholestérolémie ou encore de la sécrétion de l'insuline (Kato *et al.*, 2002).

4.1.10 Sortilin-related receptor (récepteur LR11 ou SORL1)

Le récepteur SORL1 (*sorting protein-related receptor with A-type repeats*) ou LR11 est un récepteur fortement exprimé dans le cerveau qui possède les caractéristiques communes des récepteurs aux lipoprotéines et de la sortiline (Taira *et al.*, 2001 ; Offe *et al.*, 2006). Ce récepteur, exprimé plus particulièrement dans les neurones du système nerveux central et périphérique (Andersen *et al.*, 2005), interagit avec une protéine précurseur du

peptide β - amyloïde, influence son transport et régule la concentration en peptide β -amyloïde responsable de la maladie d'Alzheimer (Jacobsen *et al.*, 2001 ; Andersen *et al.*, 2005 ; 2006).

4.2 Les récepteurs éboueurs ou « scavenger receptors » (récepteurs SR)

Les récepteurs SR capturent les LDL modifiées ou oxydées (Scarselli *et al.*, 2002). Ils sont regroupés en 3 classes structurales (Figure 7).

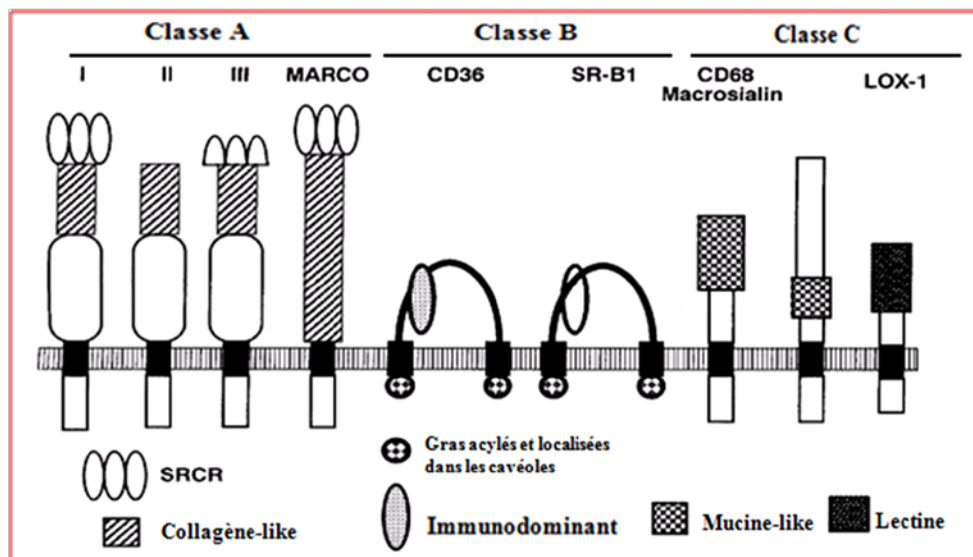


Figure 7.

Structure des récepteurs « éboueurs ». Ces récepteurs sont des protéines trimériques avec un domaine « collagen-like » qui est essentiel pour la liaison du ligand. Les récepteurs de type I, II et III sont générés par épissage alternatif. Les récepteurs AI et MARCO ont un domaine C-terminal riche en cystéines (Scavenger Receptor Cysteine-Rich domain : SRCR). Les récepteurs de classe B, CD36 et SR-B1, ont deux domaines transmembranaires et des domaines cytoplasmiques situés dans les cavéoles. CD36 a un domaine immunodominant. La classe C consiste en la macrosialine, CI et LOX-1 (CD68). La Macrosialine et CI ont une structure de type mucine-like qui pourrait être impliquée la liaison des LDL modifiées. LOX-1 a une structure conservée dans la famille des lectines de type C. Toutes les protéines de la famille des récepteurs scavengers sauf LOX-1 sont exprimées sur les macrophages ou sur les cellules de leur lignée. LOX-1 est le premier récepteur des LDL oxydées exprimé sur des cellules endothéliales aortiques (adapté de Murphy *et al.*, 2005).

Les récepteurs de la classe A (SR-A), présents dans les macrophages, sont des protéines trimériques avec un domaine transmembranaire, un domaine C-terminal riche en résidus cystéines et un domaine de structure proche du collagène (Fraser *et al.*, 1993). Les récepteurs SR-A de types I et II sont des trimères de 220 à 250 kDa qui participent à la capture des LDL oxydées des lésions athérosclérotiques (Hiltunen *et al.*, 2001). Le type II ne contient pas le domaine riche en résidus Cys. Le récepteur SR-A de type III (monomérique)

n'a pas les résidus codés par l'exon 10 du gène des SR-A et est incapable de fixer les ligands comme les LDL. Il agirait comme un régulateur négatif de l'activité des SR-A de type I et II (Hiltunen *et al.*, 2001). Le récepteur MARCO possède une grande structure de type collagène et fait partie de la classe A. Les récepteurs SR-A ont un rôle dans l'immunité innée en facilitant la reconnaissance des pathogènes bactériens. Présents à la surface des macrophages, ces récepteurs permettent la phagocytose des pathogènes (Areschoug & Gordon, 2009).

Les récepteurs de la classe B possèdent 2 régions transmembranaires. Le récepteur SR-B1 est une glycoprotéine exprimée dans de nombreuses cellules hépatiques, telles que les cellules de Kupffer et les cellules endothéliales sinusoidales hépatiques. Ce récepteur contribue au transport des esters de cholestérol par les HDL et LDL (Acton *et al.*, 1996 ; Truong *et al.*, 2000 ; Rhainds & Brissette, 2004). Le récepteur CD-36 (*cluster differentiation 36*) présent dans les plaquettes, monocytes et macrophages, joue un rôle dans l'adhésion cellulaire lors de la phagocytose et dans le métabolisme des acides gras à longues chaînes (Kuchibhotla *et al.*, 2008).

Les récepteurs de la classe C ont une seule région transmembranaire avec une orientation N-terminale à la surface cellulaire ; ils possèdent des domaines de types mucines, fortement glycosylés. Le récepteur CD-68 des macrophages ou macrosialine a un rôle inconnu, il fixe les LDL oxydées. Il en est de même pour le récepteur LOX1 (*lectin like oxidized LDL receptor*) qui est exprimé par les cellules endothéliales aortiques (Mehta *et al.*, 2006; Peter *et al.*, 2006).

4.3 Le récepteur des lipoprotéines stimulé par la lipolyse (récepteur LSR)

Les personnes atteintes d'hypercholestérolémie familiale portent des mutations sur le gène du récepteur LDL-R qui inhibent la fixation des LDL (Goldstein & Brown, 1989). Cependant, l'épuration des CM dans le foie reste normale. Un même constat a été obtenu pour le lapin Watanabe (modèle animal d'hypercholestérolémie familiale) pour lequel une délétion de 12 bases nucléotidiques du gène codant le récepteur LDL-R est observée (Rubinstein *et al.*, 1990). Ainsi, la possibilité d'une autre voie métabolique indépendante a été envisagée. En 1992, un récepteur distinct du LDL-R a été mis en évidence et appelé *lipolysis stimulated receptor* (LSR ; Bihain & Yen., 1992), car il est activé par la présence d'AGL suite à l'action des lipases.

4.3.1 Le LSR, un nouveau récepteur impliqué dans la clairance des particules riches en TG

Les lipides d'origine alimentaire circulent dans le plasma sous forme de chylomicrons. Lors d'un repas, la concentration de ces particules riches en TG exogènes augmente dans la circulation pendant cette phase "post-prandiale". La lipémie post-prandiale, lorsque son niveau est élevé, représente un facteur important dans la distribution des lipides parmi les différents tissus périphériques (Figure 8). La demi-vie de ces particules lipidiques d'origine intestinale est directement liée à la durée de la lipémie post-prandiale, et l'épuration (« clairance ») de ces particules a longtemps été considérée comme survenant dans le foie selon un processus impliquant un récepteur. Le LSR contribue d'une manière significative à l'épuration des lipides d'origine alimentaire (Yen *et al.*, 2008). En effet, il présente une affinité accrue pour les particules lipidiques renfermant de l'apoB ou de l'apo-E riches en TG, notamment les CM (Yen *et al.* 1994 ; Mann *et al.*, 1995). L'expression réduite du LSR chez la souris conduit à une prolongation de la durée de vie des lipoprotéines pendant la phase post-prandiale et par conséquent à une lipémie post-prandiale plus élevée (Yen *et al.*, 2008). Son expression et son activité sont directement liées à l'homéostasie lipidique et donc énergétique, et la réduction de l'activité du LSR se traduit par une augmentation des lipides dans la circulation pendant la phase post-prandiale suivie par une augmentation progressive de poids. Le LSR représente donc une cible importante pour la régulation de la lipémie post-prandiale.

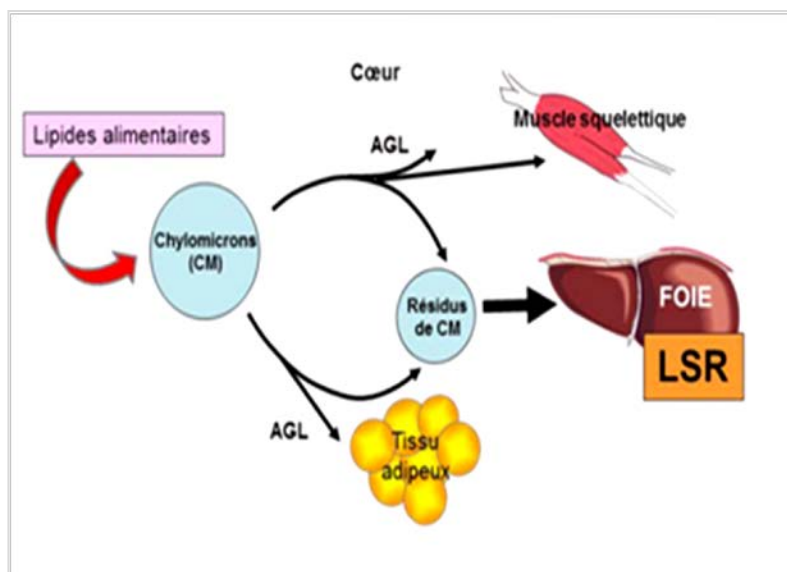


Figure 8.

Représentation schématique illustrant le rôle du LSR dans la capture des lipides alimentaires sous forme de chylomicrons pendant la phase postprandiale. Les lipides d'origine alimentaire circulent dans le sang sous forme de chylomicrons. L'hydrolyse des chylomicrons sous l'action des lipases libère des acides gras libres (AGL) dans le sang. Ces AGL activent alors le récepteur LSR, qui capte ces particules lipidiques et les élimine par endocytose, participant ainsi à la régulation de la quantité de lipides distribués aux tissus périphériques, et notamment aux tissus adipeux.

Source : Yen-Potin, communication personnelle.

4.3.2 Propriétés structurales et physicochimiques du LSR

Le gène *lsr*, identifié après criblage d'une banque d'expression, code pour une protéine contenant plusieurs motifs indicatifs d'un récepteur de type II : une région transmembranaire, un motif NPGY pour l'endocytose, ainsi qu'un motif LI-LL pour l'adressage vers le compartiment lysosomal. Des analyses par RT-PCR ont permis de détecter 3 transcrits issus de l'épissage alternatif d'un seul ARN messager, codant respectivement pour les sous-unités appelées α (68 kDa), α' (63,8 kDa) et β (56 kDa) (Figure 9).

	1	10	20	30	40	50	60
alpha	HAPAAGACAGAPDHPATVVFVCLFLIIFCPDPASAIQVTVSDPYHVVILFQPVTLPCITY						
Prime	HAPAAGACAGAPDHPATVVFVCLFLIIFCPDPASAIQVTVSDPYHVVILFQPVTLPCITY						
beta	HAPAAGACAGAPDHPATVVFVCLFLIIFCPDPASAIQVTVSDPYHVVILFQPVTLPCITY						
Consensus	HAPAAGACAGAPDHPATVVFVCLFLIIFCPDPASAIQVTVSDPYHVVILFQPVTLPCITY						
	61	70	80	90	100	110	120
alpha	QHSNTLTVPPIVMKYKSFCDRIADAFSPASVDNQLNAQLAAGNPGYNPYVECDQSVRTV						
Prime	QHSNTLTVPPIVMKYKSFCDRIADAFSPASVDNQLNAQLAAGNPGYNPYVECDQSVRTV						
beta	QHSNTLTVPPIVMKYKSFCDRIADAFSPASVDNQLNAQLAAGNPGYNPYVECDQSVRTV						
Consensus	QHSNTLTVPPIVMKYKSFCDRIADAFSPASVDNQLNAQLAAGNPGYNPYVECDQSVRTV						
	121	130	140	150	160	170	180
alpha	RVVATKQGNNAVTLGDYYQGRKITITGNADLTFEQTANGDSGVYYCSVVSADLDGNNERY						
Prime	RVVATKQGNNAVTLGDYYQGRKITITGNADLTFEQTANGDSGVYYCSVVSADLDGNNERY						
beta	RVVATKQGNNAVTLGDYYQGRKITITGNADLTFEQTANGDSGVYYCSVVSADLDGNNERY						
Consensus	RVVATKQGNNAVTLGDYYQGRKITITGNADLTFEQTANGDSGVYYCSVVSADLDGNNERY						
	181	190	200	210	220	230	240
alpha	RELIVLGRITSEAPELLPGFRAGPLEDNLFVVVVCLASLLFLLLGTCMCQCCPHTECCCVV						
Prime	RELIVL.....dnlfvvvvclaslillflllgicmcqccphTECCCVV						
beta	RELIVL.....dnlfvvvvclaslillflllgicmcqccphTECCCVV						
Consensus	RELIVL.....dnlfvvvvclaslillflllgicmcqccphTECCCVV						
	241	250	260	270	280	290	300
alpha	RCPCCPDKCCCCPEALYAAKGKARTSGVPSIYAPSIYTHLSPAKTPPPPPAHIPAGPPYGYV						
Prime	RCPCCPDKCCCCPEALYAAKGKARTSGVPSIYAPSIYTHLSPAKTPPPPPAHIPAGPPYGYV						
beta	RCPCCPDKCCCCPEALYAAKGKARTSGVPSIYAPSIYTHLSPAKTPPPPPAHIPAGPPYGYV						
Consensus	RCPCCPDKCCCCPEALYAAKGKARTSGVPSIYAPSIYTHLSPAKTPPPPPAHIPAGPPYGYV						
	301	310	320	330	340	350	360
alpha	GDFDRHSSVGGHSSQVPLLROVDGVSSEVRSGYRIQANQQDDSHRVLYYHEKELANFDP						
Prime	GDFDRHSSVGGHSSQVPLLROVDGVSSEVRSGYRIQANQQDDSHRVLYYHEKELANFDP						
beta	GDFDRHSSVGGHSSQVPLLROVDGVSSEVRSGYRIQANQQDDSHRVLYYHEKELANFDP						
Consensus	GDFDRHSSVGGHSSQVPLLROVDGVSSEVRSGYRIQANQQDDSHRVLYYHEKELANFDP						
	361	370	380	390	400	410	420
alpha	SRPGPPNGRVERANSEVTSLEDDHRSRPSRAPALTPIRDEEENRHSPQSPRTHEQEPLQ						
Prime	SRPGPPNGRVERANSEVTSLEDDHRSRPSRAPALTPIRDEEENRHSPQSPRTHEQEPLQ						
beta	SRPGPPNGRVERANSEVTSLEDDHRSRPSRAPALTPIRDEEENRHSPQSPRTHEQEPLQ						
Consensus	SRPGPPNGRVERANSEVTSLEDDHRSRPSRAPALTPIRDEEENRHSPQSPRTHEQEPLQ						
	421	430	440	450	460	470	480
alpha	EQPRGGHGSGRPRARSVDALDDINRPGSTESGRSSPPSSGRRGRAYAPPERSRSRDDL YOP						
Prime	EQPRGGHGSGRPRARSVDALDDINRPGSTESGRSSPPSSGRRGRAYAPPERSRSRDDL YOP						
beta	EQPRGGHGSGRPRARSVDALDDINRPGSTESGRSSPPSSGRRGRAYAPPERSRSRDDL YOP						
Consensus	EQPRGGHGSGRPRARSVDALDDINRPGSTESGRSSPPSSGRRGRAYAPPERSRSRDDL YOP						
	481	490	500	510	520	530	540
alpha	DDPRLPHSRDPHYDDIRSRDPRADPRSRQSRSDPRDAGFRSDRPQYDGRLL EEL KKK						
Prime	DDPRLPHSRDPHYDDIRSRDPRADPRSRQSRSDPRDAGFRSDRPQYDGRLL EEL KKK						
beta	DDPRLPHSRDPHYDDIRSRDPRADPRSRQSRSDPRDAGFRSDRPQYDGRLL EEL KKK						
Consensus	DDPRLPHSRDPHYDDIRSRDPRADPRSRQSRSDPRDAGFRSDRPQYDGRLL EEL KKK						
	541	550	560	570	580		
alpha	GSGERRRVYREEEEEEEGQYPPAPPYSETDSQASREARRLKKNLALSRESL VV						
Prime	GSGERRRVYREEEEEEEGQYPPAPPYSETDSQASREARRLKKNLALSRESL VV						
beta	GSGERRRVYREEEEEEEGQYPPAPPYSETDSQASREARRLKKNLALSRESL VV						
Consensus	GSGERRRVYREEEEEEEGQYPPAPPYSETDSQASREARRLKKNLALSRESL VV						

Figure 9.

Séquences des sous-unités α , α' et β de LSR de rat. La séquence LSR de la sous-unité α de rat (*Rattus norvegicus*) NP_116005.1 est prise comme référence et comparée aux séquences de la sous-unité α' (EDM07692.1) et de la sous-unité β (EDM07693.1). Les résidus d'acides aminés représentés en couleur bleue indiquent le ou les exons manquants : exon 4 pour la sous-unité α' et exons 4 et 5 pour la sous-unité β . Le résidu " V " (en noir) en position 256 de la sous-unité β , à la place du résidu L, est dû à l'épissage alternatif. alpha : sous-unité α ; prime : sous-unité α' ; beta : sous-unité β .

Source : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/?term=LSR%20>.

Alors que la sous-unité α représente le produit de traduction de l'ensemble des exons (*full length*), la sous-unité α' ne contient pas le motif LI-LL (excision de l'exon 4) tandis que la sous-unité β ne contient ni ce motif ni le domaine transmembranaire (excisions des exons 4 et 5) (Figure 10).

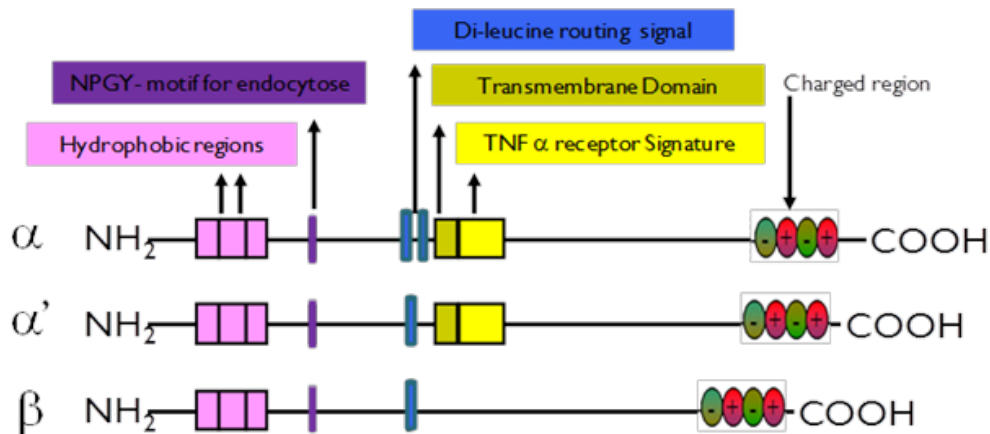


Figure 10.

Représentation schématique des différentes sous-unités du LSR. La localisation des différents domaines de la sous-unité α est indiquée ainsi que les régions excisées dans les deux autres sous-unités (Yen *et al.*, 1999). Les motifs NPGY et Di-Leu seraient impliqués dans l'endocytose, la signature TNF- α est un site d'interaction avec les cytokines, la région chargée est un site potentiel d'interaction entre le LSR et les lipoprotéines, et la région hydrophobe pourrait être un site de fixation pour les AG.

Le LSR est donc une protéine multimérique composée de plusieurs types de sous-unités (Yen *et al.* 1999 ; Herbsleb *et al.*, 2008), dont la stœchiométrie n'est pas encore clairement connue, car les sondes actuellement disponibles ne permettent pas de distinguer les sous-unités α et α' . Des études d'immuno-précipitation et de *ligand blotting* ont suggéré l'existence possible d'au moins deux types de structure quaternaire : une structure trimérique de type $\alpha_1\beta_2$ (proportion variant de 41 à 46% suivant la méthodologie utilisée) et une structure de type tétramérique de type $\alpha_1\beta_3$ (environ 31%). Les sous-unités seraient assemblées par des ponts disulfures (Yen *et al.*, 1999).

Le récepteur LSR est principalement exprimé dans le foie, mais aussi dans divers tissus tels que les testicules, les reins, les poumons, le cerveau, le muscle strié, le cœur, l'intestin grêle et en faible quantité dans le tissu adipeux (Bihain & Yen 1992 ; Herbsleb *et al.*, 2008).

4.3.3 Mécanisme d'activation du LSR

Lors d'un repas, la concentration en CM exogènes riches en TG augmente pendant la phase post-prandiale dans la circulation. Pendant cette phase, les CM sont hydrolysés par le système lipasique et libèrent les produits d'hydrolyse (AGL notamment) aux différents tissus. Les AGL sont utilisés comme substrats énergétiques par les tissus squelettiques et le muscle cardiaque ou sont stockés sous forme de TG par les adipocytes (Hofmann *et al.*, 2007). Le LSR est activé par les AGL qui induisent un changement conformationnel du complexe LSR (Figure 11; Mann *et al.*, 1995). Ce changement conformationnel, réversible, lors de la libération des AGL, a pour effet de rendre accessible les sites de fixation des apolipoprotéines du LSR (Mann *et al.*, 1995), permettant la capture des CMR et leur élimination par endocytose. Le mécanisme précis de l'activation n'est cependant pas caractérisé à l'heure actuelle

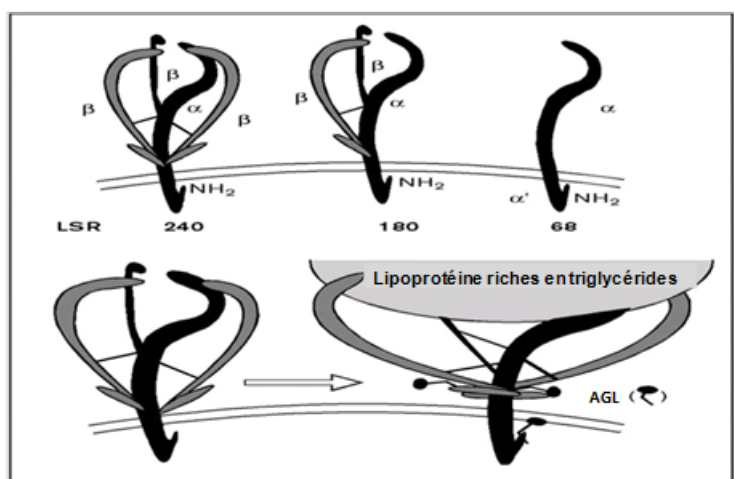


Figure 11.

Modèle hypothétique de la structure du complexe LSR sous forme inactive et sous forme activée par la présence d'acides gras libres. La fixation d'un AGL induit un changement conformationnel du complexe accompagné de l'exposition d'un site de liaison spécifique pour l'apoB ou l'apoE, protéines présentes dans les chylomicrons (Mann *et al.* 1995). Suite à leur liaison au LSR, les lipoprotéines sont internalisées et dégradées (D'après Bihain & Yen., 1998).

4.3.4 Régulation de l'expression ou de l'activité du LSR

Des concentrations physiologiques en leptine ($1-10 \text{ ng.mL}^{-1}$), un facteur de satiété, augmentent le taux de transcription du gène *lsr* et l'expression de la protéine LSR à la surface des hépatocytes (Stenger *et al.*, 2010). L'effet de la leptine est médié par la phosphorylation de la protéine ERK1/2 : la fixation de la leptine sur son récepteur physiologique ObRb entraîne une cascade de régulation, conduisant à la phosphorylation de la

protéine ERK1/2. Sous cette forme, ERK1/2 est capable de passer dans le noyau et d'activer la transcription du gène *lsr* (Figure 12A ; Stenger *et al.*, 2010). Cette augmentation de l'expression du LSR médiée par l'action de la leptine, permettrait d'augmenter l'élimination des lipides pendant la phase post-prandiale (Figure 12B), et de contribuer à la dynamique de distribution et d'utilisation des lipides par les différents tissus, complétant ainsi l'action de la leptine en tant que facteur de satiété.

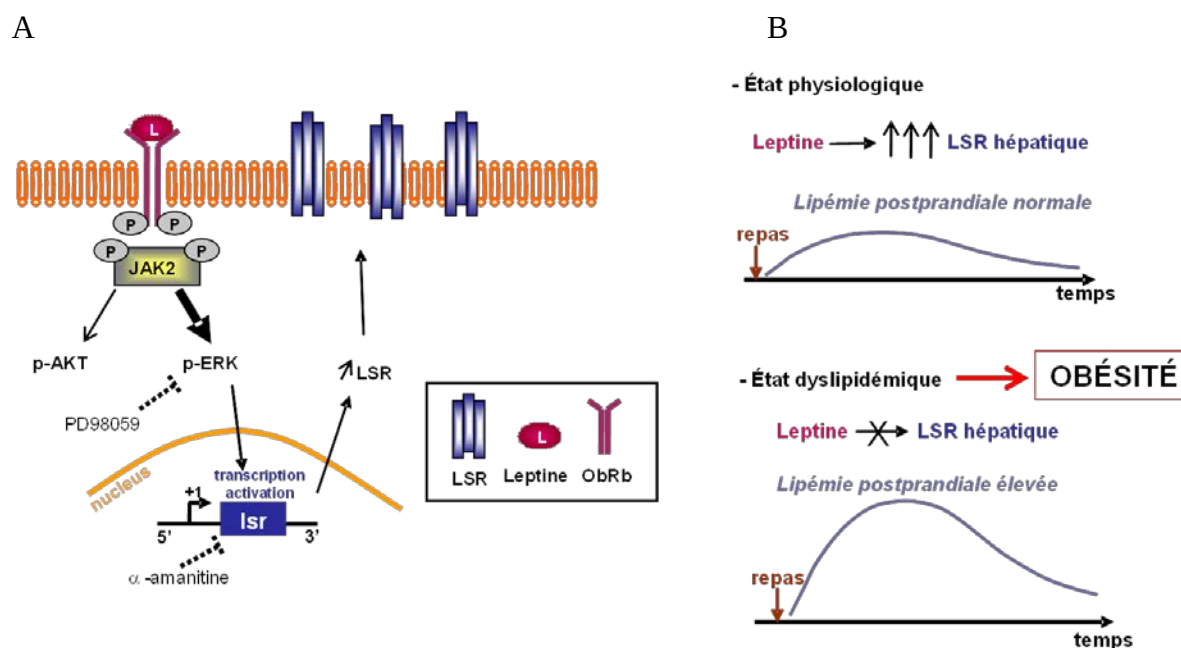


Figure 12.

Effets de la leptine sur la régulation de l'expression du LSR et de la lipémie postprandiale. *A :* Schéma illustrant l'effet de la leptine sur la régulation de l'expression LSR. L'interaction entre la leptine et son récepteur, ObRb, conduit à une cascade de signalisation canonique (phosphorylation de la protéine ERK), induisant la transcription du gène *lsr* et l'augmentation du niveau protéique de LSR à la surface cellulaire. *B :* Effet de la leptine sur la lipémie postprandiale. Dans les conditions physiologiques, l'effet de la leptine permet la clairance des lipoprotéines pendant la phase postprandiale. Quand l'interaction entre la leptine et son récepteur ne fonctionne plus (par exemple, pour les cas de résistance à la leptine observés chez les obèses), l'expression protéique du LSR à la surface cellulaire est sous-optimale, conduisant à une diminution de l'efficacité de la captation des chylomicrons, et par conséquent, à une lipémie postprandiale élevée (Stenger *et al.*, 2010).

Cependant, une signalisation défectueuse de la leptine dans le foie (cas de résistance à la leptine chez les sujets obèses par exemple ; Enriori *et al.*, 2006) peut conduire à une expression sous-optimale du LSR, engendrant une lipémie post-prandiale élevée (Figure 12B), et donc à une augmentation de la distribution des lipides à la périphérie, notamment dans les tissus adipeux, et à une augmentation de la masse grasse.

Par ailleurs, plusieurs protéines sont capables d'inhiber l'activité du LSR et peuvent ainsi engendrer des désordres lipidiques.

- La surexpression de la protéine RAP (*receptor associated protein*) résulte en une accumulation du cholestérol et des TG plasmatiques, ainsi que des particules apo-B et apo-E chez les souris (Willnow *et al.*, 1996). Il a de plus été établi que RAP (sous forme de protéine de fusion) inhibe la fixation, la capture et la dégradation des LDL par le récepteur LSR de manière dose-dépendante (Troussard *et al.*, 1995), comme l'illustre la Figure 13. Des études de *ligand-blot* (Troussard *et al.*, 1995) montrent que RAP peut se fixer sur le LSR en l'absence d'AG (forme non activée du LSR). De plus, bien que la protéine RAP entre en compétition avec la fixation de LDL sur le récepteur activé, les LDL ne peuvent déplacer la protéine RAP fixée au LSR, suggérant que le site de fixation de RAP sur le LSR est distinct du site de reconnaissance du composant apo-B des LDL.

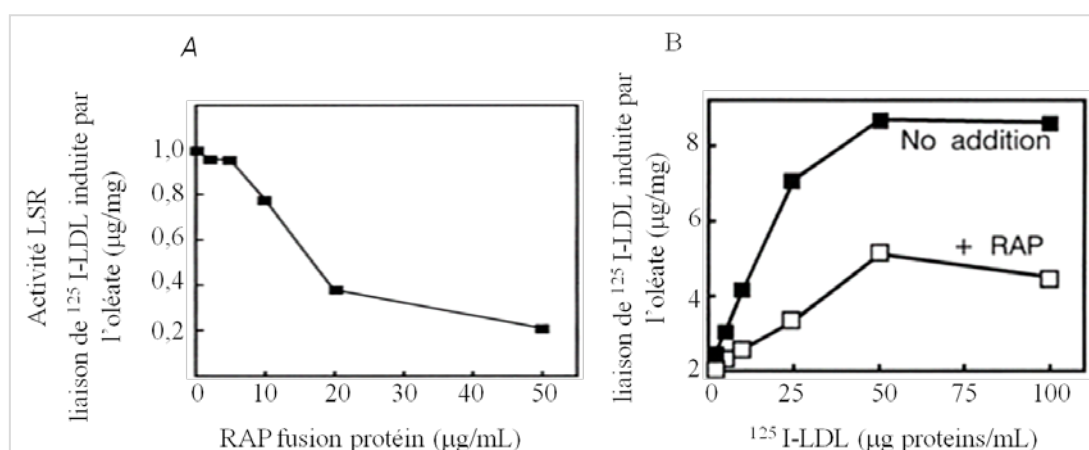


Figure 13.

Effet inhibiteur de la protéine RAP sur l'activité du LSR. *A : Effet de concentrations croissantes de protéine RAP de fusion sur l'activité LSR.* Des membranes hépatiques de rat préincubées ou non avec 800 μ M d'oléate, ont été incubées en présence de différentes concentrations de protéine RAP de fusion. L'activité LSR a été suivie par la fixation d' 125 I LDL. *B : Effet de la protéine RAP sur la fixation de particules LDL sur le récepteur LSR.* La fixation de particules LDL marquées sur des membranaires d'hépatocytes de rat a été mesurée en présence de 20 μ g/mL de protéine de fusion RAP ($\square$) et en son absence ($\blacksquare$) (d'après Troussard *et al.*, 1995).

- L'apoC-III est une apolipoprotéine associée aux particules riches en TG, déjà connue pour jouer un rôle dans la modulation des TG hépatiques (inhibiteur de lipases). La surexpression de l'apoC-III chez des souris conduit à une hypertriglycémie en retardant l'épuration des particules riches en TG (Ito *et al.*, 1990). D'autres études ont par ailleurs établi que l'apoC-III inhibait à la fois la fixation, l'internalisation et la dégradation des VLDL dans des cultures primaires d'hépatocytes de rat (Mann *et al.*,

1997 ; Figure 14), et que l'enrichissement de particules de VLDL ou de CM humains en apoC-III diminuait leur fixation au LSR d'environ 40%.

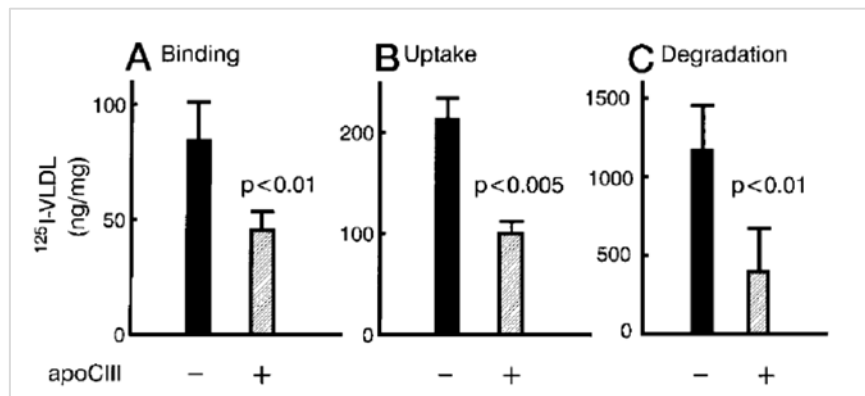


Figure 14.

Effet de l'apoC-III sur la fixation l'internalisation et la dégradation des chylomicrons, des VLDL, et des LDL. Des hépatocytes de rat (cultures primaires) ont été incubés 30 min avec 10 ng/mL de leptine, puis avec 20 $\mu\text{g/mL}$ de $^{125}\text{I-VLDL}$ seules ou enrichies en apoC-III. La fixation induite par l'oléate (A), l'internalisation (B) et la dégradation des VLDL ont été ensuite déterminées (d'après Mann *et al.*, 1997)

- L'action de la Lactoferrine (Lf) est bien moins connue. Des études ont montré que la Lf injectée par voie i.v. à des rats retardait le métabolisme des CMR dans le foie (Huettinger *et al.*, 1988), entraînant une élévation du taux de TG plasmatiques durant la phase post-prandiale. L'action de la Lf se traduit par une inhibition de la fixation des LDL sur le LSR d'hépatocytes de rat, activé par de l'oléate en présence d'oléate (Mann *et al.*, 1995 ; Figure 15). La quantité d'oléate associée à la membrane n'étant par ailleurs pas altérée en présence de Lf, ceci suggère que cette protéine n'exerce pas son action inhibitrice en se liant aux AG ou en les soustrayant de la membrane.

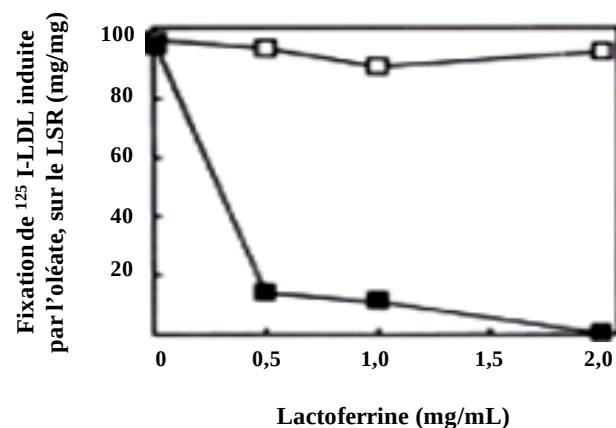


Figure 15.

Inhibition de la fixation de particules LDL sur le récepteur LSR par la lactoferrine. La fixation de particules LDL marquées sur des préparations membranaires d'hépatocytes de rat a été mesurée en présence de concentrations croissantes de lactoferrine (■) ou en présence d'un contrôle (□). La quantité de particules LDL fixée après activation du récepteur par l'oléate, est indiquée en pourcentage par rapport au contrôle sans lactoferrine (d'après Mann et al., 1995).

4.3.5 Autres rôles du LSR

Outre son rôle dans l'homéostasie lipidique, des études récentes émanant d'autres groupes de recherche ont permis d'établir d'autres rôles pour ce récepteur. En effet, l'équipe du Pr. K. Aktories à Fribourg a démontré que le récepteur LSR était le récepteur par lequel les toxines CDT (*Clostridium Difficile Transferase*), iota (*Clostridium perfringens*), et CST (*Clostridium spiroforme*) pénètrent les cellules hôtes (Papatheodorou et al., 2011 ; Papatheodorou et al., 2012). Or, des souches hypervirulentes de *Clostridium difficile* ont été identifiées dans les pays industrialisés et engendrent des maladies nosocomiales dont la prévalence est également une source croissante d'inquiétude pour la Santé Publique. Par ailleurs, les travaux de Masuda et al. (2011) ont révélé que le domaine extracellulaire du LSR était responsable du recrutement de la tricelluline, seul composant moléculaire connu des jonctions serrées. Ces jonctions serrées (TJ) constituent le point de rencontre de 3 cellules épithéliales et permettent de « sceller » l'espace cellulaire. Par l'intermédiaire de la tricelluline, ces jonctions sont responsables du fonctionnement normal de la barrière épithéliale. Cependant, les mécanismes moléculaires de formation et de maintien des jonctions serrées ne sont pas élucidés. Enfin, il a été montré que le LSR était exprimé dans des tissus tumoraux impliqués dans le cancer ovarien. Le gène *lsr* a été identifié comme l'un des 30 gènes marqueurs de tumeurs potentiels (Welsh et al., 2001). Le LSR serait aussi impliqué

dans l'invasion et les mouvements cellulaires lors de cancer de la vessie (Herbsleb *et al.*, 2008).

5. La lactoferrine

5.1 Généralités et aspects structuraux

La lactoferrine (Lf) a été identifiée pour la première fois dans le lait bovin en 1939 (Sorensen & Sorensen, 1939). Montreuil *et al.* (1960) ont identifié la Lf dans le lait humain et lui ont donné le nom de lactotransferrine. La Lf est une protéine présente dans les sécrétions externes des mammifères telles que le lait, les larmes, la salive, les sécrétions séminales et aussi dans les granules secondaires de neutrophiles. Dans le lait bovin, la Lf est à l'état de traces (de l'ordre de $0,1 \text{ mg.g}^{-1}$ selon les laits de vaches individuels; Indyk & Filonzi, 2005) alors qu'elle se trouve à des concentrations plus élevées dans le colostrum bovin ($0,8$ à 5 mg.g^{-1} ; Pakkanen & Aalto, 1997) et également dans le lait humain (1 à 2 mg.g^{-1} ; Hennart *et al.*, 1991).

La Lf est considérée comme un membre de la famille des transferrines, qui inclut également les transferrines sériques et les ovotransferrines (conalbumine). Les transferrines sont des protéines qui présentent de nombreuses homologies structurales. Ce sont des glycoprotéines formées d'une seule chaîne polypeptidique comprenant de 670 à 690 résidus d'acides aminés et dont la masse moléculaire est d'environ 80 000 Da. La séquence peptidique de la Lf des différents mammifères présente environ 60% d'homologie avec celles des transferrines sériques (Baker & Baker, 2004). La Lf est une protéine N-glycosylée (composée de 4 à 5 chaînes glycaniques), monomérique et constituée de deux domaines ou lobes (pour la Lf bovine, N-lobe : résidus 1-333 ; C-lobe : 345-689) reliés par une courte chaîne polypeptidique (région 334-344 de la Lf bovine). Chaque lobe se compose en outre de deux sous-domaines qui sont appelés N1, N2, et C1 et C2, respectivement (Figure 16). Dans la lactoferrine bovine, N1 correspond aux résidus 1-90 et 251- 233, N2 aux résidus 91-250 alors que C1 est composé des résidus 345- 431 et 593- 676, et C2 des résidus 432- 592. La protéine bovine est constituée de 689 résidus et elle possède 17 ponts disulfures (Pierce *et al.*, 1991). La Lf bovine possède au niveau de sa structure secondaire environ 41% d'hélices α et 24% de feuillets β . Les deux lobes ont une conformation similaire et leur structures primaires ont 40% d'homologie entre-elles (Baker *et al.*, 2002 ; 2005). La Lf est hautement cationique avec un

pH isoélectrique (pHi) théorique de 9,4. Cependant, les valeurs expérimentales varient entre 8,0 et 9,0 (Groves, 1960 ; Shimazaki *et al.*, 1993).

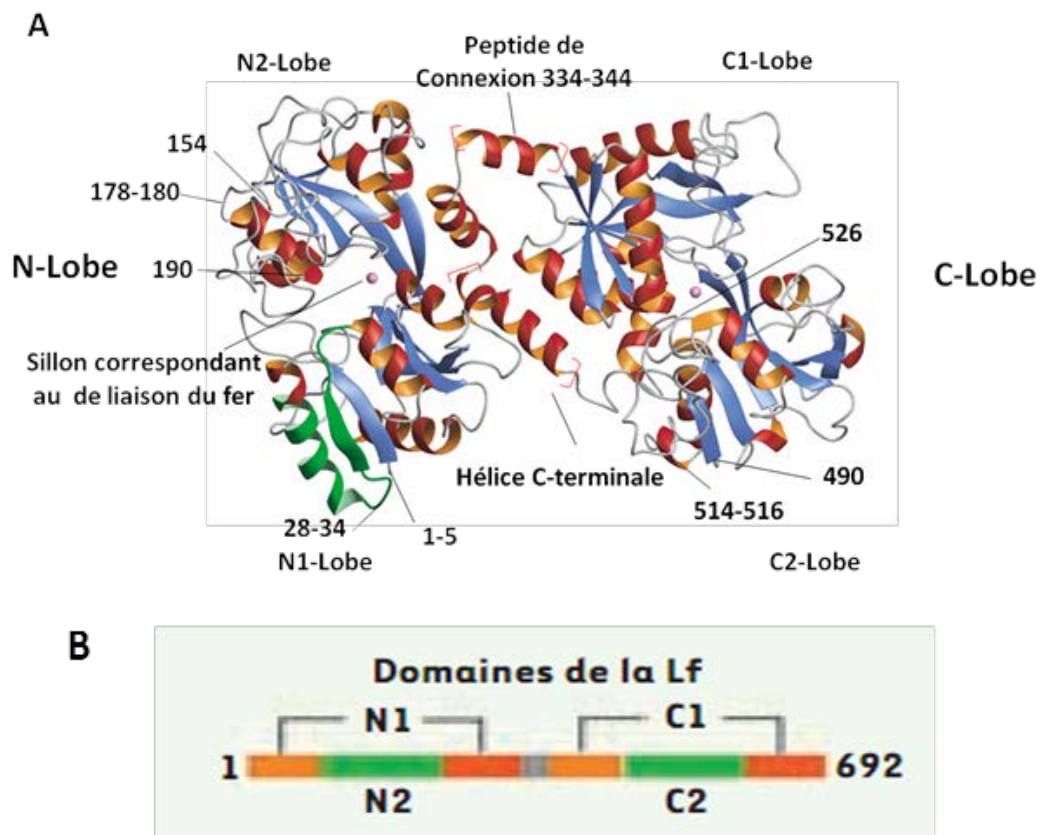


Figure 16.

Domaines structuraux de la lactoferrine. *A : Représentation schématique en mode ruban-flèche de la structure de la Lf bovine. Les flèches bleues représentent les feuillets β et les hélices sont représentées en rouge-orange, à l'exception de la partie de la Lf correspondant à la lactoferricine B qui est représentée en vert (Vogel *et al.*, 2002). B : Représentation schématique des domaines correspondant aux lobes N1, N2, C1 et C2 de la Lf bovine (Pierce *et al.*, 2009).*

5.2 Glycosylation de la Lf

La Lf bovine possède 5 sites potentiels de N-glycosylation (Pierce *et al.*, 1991) localisés au niveau des résidus Asn-233, Asn-281, Asn-368, Asn-476 et Asn-545 (Figure 17), mais selon Spik *et al.* (1994), le site Asn-281 n'est pas totalement glycosylé. Ainsi, Asn-281 ne serait glycosylée qu'à 30% dans le colostrum et qu'à 15% dans le lait mature (Wei *et al.*, 2000 ; Yoshida *et al.*, 2000). Cette glycosylation partielle permet de différencier deux variants de glycosylation, Lf-A (84 kDa) et Lf-B (80 kDa), le premier possédant 5 sites glycosylés et le second 4 sites glycosylés (Yoshida *et al.*, 2000). Coddeville *et al.* (1992) ont montré que les structures glycaniques étaient différentes selon le stade de lactation. Au début de la lactation,

les glycannes sont de type oligomannosidique, puis, dans le lait mature, les glycannes sont de type N-acétyllactosaminique. La fonction principale des chaînes glycaniques est de stabiliser la structure de la Lf afin d'éviter la protéolyse et l'autolyse (Rossi *et al.*, 2002 ; VanVeen *et al.*, 2004) mais elle module aussi la fixation et le relargage du fer (Moore *et al.*, 1997 ; Baker *et al.*, 1998).

```

1      APRKNVRWCT ISQPEWFKCR RWQWRMKKLG APSITCVRRA FALECIIRAIA EKKADAVTLD      60
61     GGMVFEAGRD PYKLRPVAAE IYGTKESPQT HYAVAVVKK GSNFQLDQLQ GRKSCHTGLG      120
121    RSAGWIIPMG ILRPYLSWTE SLEPLQGAVA KFFSASCVPC IDRQAYPNLC QLCCKEGEENQ      180
181    CACSSREPYF GYSGAFKCLQ DGAGDVAFAVK ETTVFENLPE KADRQYELL CLNNSRAPVD      240
241    AFKECHLAQV PSHAVVARSV DGKEDLIWKL LSKAQEKFGK NKSRSFQLFG SPPGQRDLLF      300
301    KDSALGFLRI PSKVDSALYL GSRYLTTLKN LRETAEEVKA RYTRVVWCAV GPPEQKKCQQ      360
361    WSQSGQNVTCATASTTDDC IVLVLKGEAD ALNLDGGYIY TAGKCGLVPV LAENRKSSKH      420
421    SSLDCVLRPT EGYLAVAVVK KANEGLTWSN LKDKKSCHTA VDRTAGWNIP MGLIVNQTGS      480
481    CAFDEFFSQS CAPGADPKSR LCALCAGDDQ GLDKCVPSNK EKYGYTGAF RCLAEDVGDV      540
541    AFVKNNDTVWE NTNGESTADW AKNLNREDFR LLCLDGTRKP VTEAQSCHLA VAPNHAVVSR      600
601    SDRAAHVKQV LLHQALFGK NGKNCDPKFC LFKSETKNLL FNDNTECLAK LGGRPTYEEY      660
161    LGTEYVTAIA NLKCKSTSPL LEACAFLTR      689

```

Figure 17.

Structure primaire de la lactoferrine bovine. Les résidus de cystéine impliqués dans les ponts disulfure sont surlignés en jaune: C9-C45, C19-C36, C115—C198, C157-C173, C170-C181, C231, C245, C348-C380, C358-C371, C405-C684, C425-C647, C457-C532, C481-C675, C491-C505, C502-C515, C573-C587, C625-C630. Les sites de N-glycosylation sont en vert et soulignés (Protein Data Bank, P24627: <http://www.uniprot.org/uniprot/P24627>)

5.3 La fixation du fer et des anions par la Lf

La Lf a la capacité de lier deux ions Fe^{3+} de façon réversible, associés à des ions carbonates (CO_3^{2-} ; Baker, 1994). Les 2 lobes N et C fixent chacun un ion ferrique (Figure 18).

L'affinité de la Lf pour le fer ferrique est très grande : sa constante de dissociation (K_D) avec le fer sous forme Fe^{3+} est d'environ $K_D \sim 10^{-20}$ M (Baker & Baker, 2004). Dans le lait mature, la Lf n'est pas totalement saturée en fer (entre 15 et 20% des molécules de Lf

contiennent du fer ; Steijns & van Hooijdonk, 2000). Le fer dans le lait est lié à d'autres protéines (environ 14% aux protéines de la membrane des globules gras, 24% aux caséines et 32% à des composés solubles de faibles masses moléculaires ; Fransson & Lonnerdal, 1983).

Il existe 3 formes de Lf selon la quantité de fer fixé : l'apoLf (absence de fer), la forme monoferrique (un ion ferrique) et l'holoLf (deux ions ferriques). Selon la présence ou non de fer, les structures tertiaires de l'apoLf et de l'holoLf sont différentes (Baker *et al.*, 1998). Au sein de chaque lobe, quatre résidus sont importants pour chélater le fer : un résidu d'acide aspartique (D60 dans le N-lobe ; D395 dans le C-lobe), un résidu d'histidine (H253 et 595, respectivement pour le N- et le C-lobe), et deux résidus de tyrosine (Y92 et Y192 dans le N-lobe et Y433 et Y526 dans le C-lobe). De plus, un ion carbonate participe à la fixation du fer dans les deux lobes (Steijns & Hooijdonk 2000 ; Baker & Baker 2004).

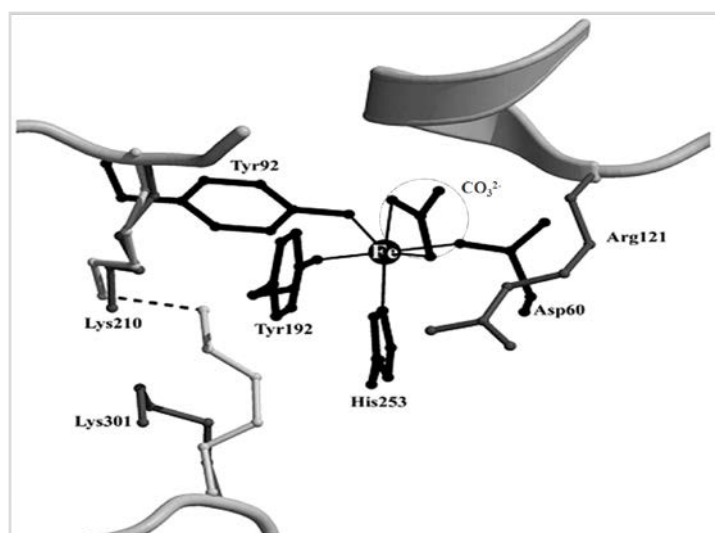


Figure 18.
Représentation des sites de liaison du fer situés dans la cavité du lobe N-terminal de la Lf bovine.
La numérotation des résidus est celle du N-lobe de la lactoferrine bovine (Baker & Baker, 2004)

La Lf peut également fixer d'autres ions métalliques tels que Al^{3+} , Ga^{3+} , Mn^{3+} , Co^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} ... mais avec des affinités beaucoup plus faibles que celle pour le fer ferrique (Baker, 1994). La région 17-41 cationique correspondant à la lactoferricine interagit électrostatiquement avec les anions tels que les lipopolysaccharides (Yamauchi *et al.*, 1993), l'ADN (Britigan *et al.*, 2001 ; Wakabayashi *et al.*, 2003) et les glycosaminoglycanes comme l'héparine et la chondroïtine (Shimazaki *et al.*, 1998 ; 2000). Le C-lobe a, en revanche, peu d'affinité pour ces anions (environ 100 fois moins ; Ellass-Rochard *et al.*, 1995).

5.4 Activités biologiques de la Lf

De nombreuses activités biologiques de la Lf ont été observées *in vitro* (activités antimicrobienne, antitumorale et immunomodulatrice ; Pierce *et al.*, 2009 ; Figure 19).

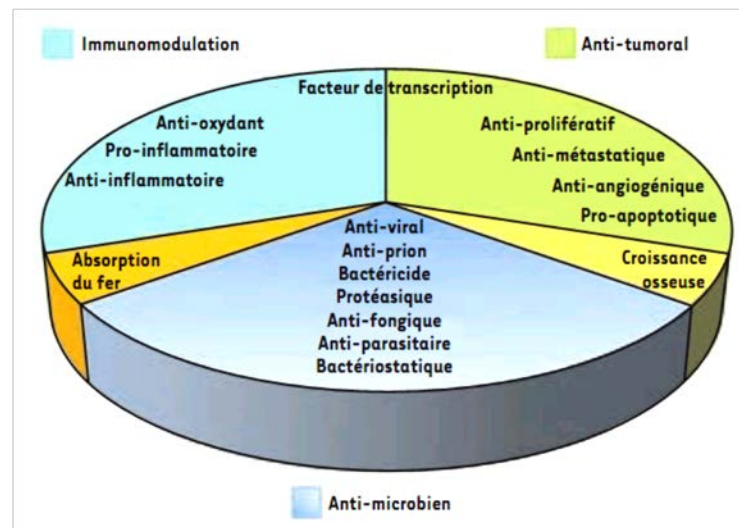


Figure 19.

Schéma représentant les rôles proposés pour la Lf. Les rôles multiples de la lactoferrine sont regroupés en secteurs : rôles anti-microbiens, immunomodulateurs, anti-tumoraux, ou autres comme l'absorption du fer et la croissance osseuse (Pierce *et al.*, 2009).

- *Activité antibactérienne* : la Lf agit selon différents modes d'action impliquant notamment (i) la séquestration du fer privant le milieu de culture de cet élément essentiel pour la croissance (*activité bactériostatique*), (ii) l'interaction de type électrostatique de son domaine N-terminal (résidus 17-41 correspondant à la lactoferricine ; Bellamy *et al.*, 1992) fortement chargé positivement avec de nombreux constituants anioniques (par exemple, le lipopolysaccharide de la surface des membranes des bactéries Gram⁻) conduisant à la lyse cellulaire (*activité bactéricide*). De plus, il a été montré que la Lf humaine possédait une activité protéolytique de type protéase à sérine capable d'hydrolyser des facteurs de colonisation des bactéries. Par exemple, la virulence de la bactérie Gram⁻ *Haemophilus influenzae* est atténuée lorsque la Lf hydrolyse les protéines d'autotransport IgA1 et Hap (Hendrixson *et al.*, 2003).

- *Activité antivirale* : la Lf interagit avec les intégrines qui permettent aux virus de pénétrer les cellules hôtes et inhibe le virus HIV-1 (*human immunodeficiency virus*), le virus de l'hépatite C et le rotavirus *in vitro* (Pierce *et al.*, 2009).

- *Activité anti-fongique* : Cette activité est liée à la propriété de la Lf de s'adsorber sur les levures, de déstabiliser la paroi et d'induire l'apoptose de ces organismes (Legrand *et al.*, 2008).
- *Activité anti-parasitaire* : La Lf endommage la membrane de *Entamoeba histolytica* et inhibe la croissance de *Toxoplasma gondii*, *Trichomonas vaginalis* et *Trypanosoma cruz* (Valenti & Antonini, 2005 ; Legrand *et al.*, 2008 ; Jenssen, 2009).
- *Activité anti-prion* : La *low-density lipoprotein receptor-related protein 1* (LRP1) est un médiateur de l'endocytose du prion (Parkyn *et al.*, 2008). Comme le LRP1 est également un récepteur de surface de la Lf (Takayama & Takezawa, 2006). La Lf inhibe l'internalisation du prion par compétition pour la fixation sur LRP (Iwamaru *et al.*, 2008).
- *Activité anti-tumorale* : La surexpression de la Lf induit l'arrêt du cycle cellulaire et l'inhibition de la prolifération. La Lf semble agir au niveau transcriptionnel en se liant sur l'ADN, suite à son endocytose par des récepteurs spécifiques (Teng *et al.*, 2004,). Ainsi, la Lf active la voie MAPK et entraîne l'arrêt du cycle cellulaire dans des cellules MDAMB-231 (Damiens *et al.*, 1999),
- *Réponse immunomodulatrice* : La Lf est considérée comme un fort agent anti-oxydant qui empêche la peroxydation lipidique des membranes cellulaires (Konishi *et al.*, 2006). Le mécanisme d'inhibition de la peroxydation est contrôlé par la Lf au niveau des sites d'inflammation. Le lipopolysaccharide et le facteur de transcription TNF- α (*tumor necrosis factor*) augmentent l'activité de phagocytose des monocytes et des macrophages. Cela a pour conséquence la production d'espèces réactives à l'oxygène et l'administration orale de Lf améliore le statut oxydatif du foie (Konishi *et al.*, 2006). Par ailleurs, la Lf bovine agit aussi comme agent pro-inflammatoire en augmentant la production des splénocytes, d'interféron IFN- γ , d'interleukine IL-12 en réponse à une infection par le virus de l'herpès, et en augmente l'efficacité du vaccin BCG (*Bacillus Calmette-Guérin*) (Hwang & Actor, 2009). La Lf améliore la phagocytose de *Staphylococcus aureus* et des moisissures. La Lf bovine aide aussi à la maturation et la différenciation des cellules T (Legrand *et al.*, 2005 ; Ward *et al.*, 2005 ; Legrand *et al.*, 2008).
- *Autres activités biologiques* : Il a également été proposé que la Lf possède des activités anti-métastatique (Teng *et al.*, 2002), anti-angiogénique (Pierce *et al.*, 2009), pro-apoptotique (de

la Rosa *et al.*, 2008), de prolifération d'ostéoblastes pour la croissance osseuse (Cornish *et al.*, 2006), et une activité de facteur de transcription (Benaissa *et al.*, 2005).

L'affinité de la Lf pour le fer, sa résistance aux protéases digestives, la présence de récepteurs spécifiques de la Lf dans les membranes plasmiques de l'intestin suggèrent que cette métalloprotéine puisse jouer un rôle important dans le transport du fer, son absorption intestinale et sa biodisponibilité. La Lf est commercialisée en tant que supplément alimentaire pour ses propriétés immunostimulantes et antioxydantes.

5.5 Récepteurs de la Lf

Les fonctions biologiques de la Lf sont dépendantes de la présence de récepteurs à la Lf (Lf-R), localisés à la surface de certaines cellules, telles que les lymphocytes, hépatocytes ou entérocytes. Si certains de ces récepteurs ne sont pas spécifiques de la Lf, il semble clair à l'heure actuelle qu'il existe au moins un récepteur spécifique à la Lf dans l'intestin grêle humain (Suzuki & Lönnnerdal, 2002).

Les principaux Lf-R de tissus de mammifères et leurs caractéristiques sont décrits ci-dessous

- **Lf-R de foie :** l'endocytose de la Lf bovine par les hépatocytes de foie est dépendante du Ca^{2+} (McAbee & Esbensen, 1991 ; McAbee *et al.*, 2000) et le récepteur impliqué a été identifié comme le récepteur ASGP (asialoglycoprotein), une protéine ayant une activité de type lectine et contribuant à éliminer le galactose de la circulation. Il a été établi qu'une Lf déglycosylée était aussi bien reconnue par différents ASGP que la Lf non déglycosylée, montrant que la fixation de la Lf sur le récepteur se fait par un mécanisme indépendant du galactose (McAbee *et al.*, 1998). Il a été montré que les cellules parenchymales de foie fixaient principalement la Lf *via* le LRP-1, qui pourrait conduire à une diminution de la capture des lipoprotéines à apo-E par le foie (Ziere *et al.*, 1992), même si ce récepteur n'est pas le récepteur principal de ce type de lipoprotéines.
- **Lf-Rs intestinaux:** la résistance de la Lf à l'action de la trypsine a fait soupçonner très tôt l'existence de structures spécifiques dans l'intestin, capables d'interagir avec la Lf

et lui permettant de « survivre » à la digestion *in vivo*. La présence d'un récepteur spécifique dans l'intestin grêle humain, fixant exclusivement la Lf et délivrant son contenu en fer à la muqueuse du duodenum a été démontrée par les études cinétiques de Hu *et al.* (1988 ; 1990). De même, des Lf-Rs ont été caractérisés sur la bordure en brosse de membrane intestinale de singe *Rhesus*, de porcelet et de lapin par des expériences de *ligand-blot* et par des expériences de compétition. Il a été également montré qu'une proportion significative de la Lf pouvait résister à la digestion chez le nourrisson et était retrouvée intacte dans leurs selles. La proportion de Lf intacte diminue avec l'âge, suggérant qu'une plus forte proportion de Lf est dégradée lorsque le système digestif est plus mature.

- **Lf-R de lymphocytes** : la H-Lf se fixe à la surface de membranes de lymphocytes humains ou de souris (Van Snyck and Masson, 1976). Un Lf-R exprimé suite à la stimulation des lymphocytes par la phytohématagglutinine a été visualisé par *ligand-blot* (Mazurier *et al.*, 1989) et les sites de reconnaissance sur la H-Lf ont été étudiés par hydrolyse trypsique et par des agents modifiant les résidus de Lysine. Le fragment trypsique 4-281 inhibe à 50% la fixation de la H-Lf entière, mais ni le fragment 91-257 ou le fragment C-terminal 282-703 ne sont reconnus, suggérant que le site de fixation du récepteur sur la Lf est localisé dans la partie N-terminale (Rochard *et al.*, 1989).
- D'autres Lf-R ont également été identifiés dans les plaquettes humaines (Leveugle *et al.*, 1993 ; Nillesse *et al.*, 1994), les cellules épithéliales de mammifères (Rochard *et al.*, 1992) et les macrophages (Van Snyke & Masson, 1976 ; Eda *et al.*, 1997) et ont fait l'objet de caractérisations biochimiques dans une moindre mesure.

6. Contexte de l'étude et objectifs du travail

Pendant la phase post-prandiale, les TG apportés par l'alimentation circulent dans le plasma sous forme de chylomicrons. Ces lipoprotéines riches en TG distribuent les acides gras aux différents tissus *via* le système lipoprotéine lipase, et sont finalement éliminés de la circulation par des récepteurs hépatiques. L'épuration hépatique des chylomicrons est une étape déterminante pour la biodisponibilité des lipides d'origine alimentaire pour les tissus périphériques, dans la mesure où une lipémie postprandiale élevée est souvent associée à l'obésité et à un risque accru de maladies cardiovasculaires.

Par ailleurs, il a été établi que la Lf, lorsqu'elle est injectée par voie i.v., augmentait la lipémie postprandiale en inhibant l'épuration des chylomicrons remnants par le foie. Bien que de nombreuses études aient été consacrées à l'identification de cibles potentielles de la Lf, les mécanismes moléculaires par lesquels elle exerce son action sur la lipémie postprandiale ne sont pas élucidés. Le laboratoire Lipidomix développe des recherches sur l'homéostasie lipidique et les conséquences d'une dérégulation du métabolisme lipidique, au niveau central comme périphérique. L'une des protéines sur lesquelles se focalisent ces études est le récepteur LSR, présenté au paragraphe 4.3. Etant donné que ce récepteur est le récepteur hépatique principal impliqué dans l'épuration des lipides alimentaires, nous avons proposé l'hypothèse que ce récepteur puisse constituer l'une des cibles de la Lf. L'objectif principal de ce travail de thèse était de comprendre si la Lf modulait l'activité du récepteur LSR, et si cet effet résultait d'une interaction avec celui-ci ou par régulation de son expression.

Ces études nécessitant des quantités relativement importantes de Lf pure, la première partie de ce travail a consisté à mettre au point une méthode chromatographique simple pour purifier la lactoferrine bovine à partir de lait cru. Une approche de protéolyse ménagée par la trypsine a également été mise au point pour isoler les deux lobes N- et C-terminaux de la Lf et tester individuellement l'interaction de ces deux domaines structuraux avec le LSR. Enfin, une hydrolyse plus complète a également été réalisée de façon à déterminer si des peptides, issus de l'hydrolyse de la Lf, conservaient les mêmes propriétés vis-à-vis du LSR que la Lf entière. Ces travaux sont présentés dans le **Chapitre 1**.

Le **Chapitre 2** de cette étude présente les premiers essais de purification du récepteur LSR à partir de cellules hépatiques de rat ainsi qu'une caractérisation biochimique préliminaire de ce récepteur (électrophorèses mono- et bidimensionnelles, étude de

modifications post-traductionnelles potentielles). Plusieurs milligrammes de récepteur pur ont pu être obtenus et ont été utilisés pour les études présentées dans le chapitre suivant.

Le **Chapitre 3** présente les études *in vivo* sur la souris, visant à vérifier que la Lf purifiée au laboratoire exerçait le même effet sur la lipémie postprandiale que celui décrit dans la littérature. Sont exposées ensuite les études par PCR quantitative qui ont permis d'évaluer l'effet de la Lf sur la transcription du LSR. Ensuite, la caractérisation de l'interaction entre la lactoferrine et le récepteur LSR a été réalisée par deux approches. Une co-localisation de la Lf et du LSR sur une lignée de cellules Hepa 1-6, a d'abord été mise en évidence, suggérant l'existence d'une interaction directe entre la Lf et le LSR. Cette interaction a ensuite été vérifiée, non seulement sur la Lf entière, mais également sur ses produits d'hydrolyse, par la technique du *ligand-blotting*. Enfin, des expériences de compétition ont été réalisées entre la Lf et des lipoprotéines riches en TG, les VLDL, afin d'établir le lien entre fixation de la Lf et inhibition de la lipémie postprandiale.

MATERIELS ET METHODES

1. Méthodes électrophorétiques et techniques attenantes

1.1 Electrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE)

La méthode en tampons discontinus de Laemmli et Favre (1973) est utilisée avec un système de migration verticale (modèle électrophorétique 2001, Amersham Pharmacia, Uppsala, Suède). Le gel est constitué d'un gel de concentration (5 % d'acrylamide) en tampon Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8 contenant 0,1% (m/v) de SDS et d'un gel de séparation (10, 12 ou 15 % d'acrylamide) en tampon Tris-HCl 0,38 M, pH 8,8 contenant 0,1% (m/v) de SDS. Le tampon d'électrodes (pH 8,3) est constitué de Tris 50 mM, glycine 384 mM et de 0,1% (m/v) SDS. Les échantillons (lyophilisats) sont solubilisés dans un tampon Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8 contenant 2% (m/v) de SDS, 5% (v/v) de 2-mercaptoéthanol, 10% (v/v) de glycérol et 0,1% (m/v) de bleu de bromophénol. Les échantillons sont chauffés à 100 °C pendant 3-5 min. Des volumes de 25 µL (15-60 µg de protéines) par échantillon sont déposés dans les puits du gel. La migration électrophorétique est effectuée sous des conditions électriques de 60 mA, 30 W, 500 V (pour un gel 16 x 18 cm de 1,5 mm d'épaisseur) pendant environ 150 min et 60 mA, 30 W, 200 V pendant environ 60 min (pour un gel 6,7 x 8,6 cm de 0,1 mm d'épaisseur) à 4 °C. Les marqueurs de masse moléculaire sont de deux types. Le premier (*Broad Range SDS-PAGE Molecular Weight Standards*, Bio-Rad, Hercules, CA, Etats-Unis) est composé d'un mélange de myosine (200,0 kDa), β-galactosidase (116,25 kDa), phosphorylase B (97,4 kDa), sérum albumine bovine (66,2 kDa), ovalbumine (45,0 kDa), anhydrase carbonique (31,0 kDa), inhibiteur trypsique (21,5 kDa), lysozyme (14,4 kDa ; cependant sa masse moléculaire apparente est de 15,5 kDa), aprotinine (6,5 kDa). Le second est un mélange de protéines recombinantes dont les masses moléculaires varient de 10 kDa à 250 kDa (*Precision Plus Protein All Blue Standards*, Bio-Rad).

1.2 Electrophorèse bidimensionnelle couplant une isoélectrofocalisation (IEF) et une SDS-PAGE

La méthode utilisée est adaptée de celle décrite par Herbert *et al.* (1998). La première dimension (IEF) consiste à faire migrer les protéines selon leur point isoélectrique dans un gradient de pH pré-établi. Les protéines (100 µg) sont solubilisées dans 200 µL d'une solution

contenant 8 M d'urée, 4% (m/v) de 3-[(3-cholamidopropyl)-diméthylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS), 2 mM de tributyl phosphine, 40 mM de Tris, 0,2% (m/v) d'ampholines 3-10 (Bio-Lytes 3-10 ; Bio-Rad) et 0,001% (m/v) de bleu de bromophénol. Les bandelettes (IPG-strip d'une longueur de 11 cm et d'une largeur de 3,3 mm) sont constituées d'un gel de polyacrylamide (T : 4% ; C : 3%), sur lesquelles des ampholines ont été fixées de manière covalente afin de réaliser un gradient linéaire de pH. Le gradient de pH utilisé est compris entre 4,0 et 7,0 (IPG ReadyStrip pH 4-7 ; Bio-Rad). Les IPG-strips sont placés dans l'appareil Protean IEF Cell (Bio-Rad) et sont réhydratés sous conditions actives (*i.e.*, voltage constant de 50 V) avec les solutions protéiques correspondantes pendant 15 h à 20 °C. La focalisation se déroule ensuite en trois étapes à 20 °C. Tout d'abord, un faible voltage (250 V pendant 15 min) est requis pour éliminer les ions salins en excès. Ensuite, une montée en gradient de 250 à 8000 V est appliquée sur 150 min avec un courant limité à 50 µA par IPG-strip. Enfin, le voltage est maintenu constant à 8000 V pendant au moins 5 h. A l'issue de la migration, les IPG-strips peuvent être conservés à -20 °C en attente de la deuxième dimension. La seconde dimension consiste à séparer les protéines selon leur masse moléculaire par SDS-PAGE. Les IPG-strips issus de la première dimension sont équilibrés pendant 15 min dans un tampon Tris-HCl 125 mM, pH 6,8 contenant 6 M d'urée, 2% (m/v) de SDS, 20% (v/v) de glycérol et 5 mM de tributyl phosphine. Les IPG-strips sont ensuite scellés au sommet d'un gel SDS-PAGE grâce à une solution de 1% (m/v) d'agarose fondu. La migration SDS-PAGE se déroule ensuite comme décrit ci-dessus. Les pHi apparents des protéines sont déterminés à l'aide d'un mélange de protéines standards (2-D SDS-PAGE Standards ; Bio-Rad, Hercules, CA, Etats-Unis). Les marqueurs de masse moléculaire sont constitués d'un mélange (*Precision Plus Protein All Blue Standards*, Bio-Rad) de protéines recombinantes de masse moléculaire variant de 10 kDa à 250 kDa. Les relations entre les pHi apparents (étalonnage du gel d'IEF avec des protéines marqueurs de points isoélectriques 2-D *SDS-PAGE Standards*, Bio-Rad) et les migrations relatives (R_f) lors de la première dimension sont linéaires avec l'IPG Ready Strip pH 4-7 de 11 cm (R_f mesurée à partir du côté le plus acide du gel correspondant à pH 4,0).

L'équation utilisée est :

$$\text{pH} = 3,34 R_f + 3,90, r = 0,98 \text{ (Girardet et al., 2006)}$$

1.3 Electrotransfert de protéines

1.3.1 Transfert semi-sec

L'électrotransfert de LSR de rat a été réalisé par la méthode habituellement utilisée dans notre laboratoire (Matéos, 2008). Des feuilles de papier buvard, préalablement découpées à la taille du gel, sont trempées dans le tampon de transfert CAPS (acide 3-[cyclohexylamino]-1-propanesulfonique) à 10 mM contenant 10% (v/v) de méthanol et 2 M de NaOH, pH 11, afin qu'elles en soient totalement imbibées (6 feuilles par gel). L'électrotransfert est réalisé grâce à un appareil de transfert semi-sec (système TE 77 Power, 21 x 26 cm, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, Etats-Unis). Trois feuilles de buvard imbibées de tampon de transfert sont placées sur l'électrode inférieure (anode) en évitant les bulles d'air. Ensuite, la membrane de nitrocellulose ou de fluorure de polyvinylidène (PVDF), le gel de polyacrylamide et les feuilles de papier buvard restantes sont empilés les unes sur les autres. Le couvercle de l'appareil contenant la cathode est refermé. Le courant à appliquer est fonction de la surface des gels à transférer ($0,8 \text{ mA.cm}^{-2}$) : le courant appliqué est de 38 mA pour un gel de 48 cm^2 et de 146 mA pour un gel de 182 cm^2 (durée du transfert : 6 h).

1.3.2 Transfert en cuve

Le traitement de la membrane de nitrocellulose ou de PVDF et du gel de polyacrylamide est similaire à ce qui est décrit ci-dessus. Des feuilles de papier buvard, préalablement découpées à la taille du gel, sont trempées dans le tampon de transfert afin qu'elles en soient totalement imbibées (10 feuilles par gel). L'électrotransfert est réalisé grâce à un appareil de transfert en cuve (système PowerPac 100, Bio-Rad). Cinq feuilles de buvards imbibées de tampon de transfert sont placées sur l'électrode inférieure (anode) en évitant les bulles d'air. Ensuite, la membrane de nitrocellulose ou de PVDF (côté cathode), le gel de polyacrylamide (côté anode) et les feuilles de papier buvard restantes sont empilées les unes sur les autres. Le couvercle de l'appareil contenant la cathode est refermé. Le courant appliqué est de 350 mA (durée du transfert : 45 min).

1.4 Révélation des protéines

1.4.1 Révélation des protéines au bleu de Coomassie R-250

Après la migration électrophorétique, les protéines sont fixées dans le gel par une solution d'acide trichloroacétique à 12% (m/v) pendant 20 min (SDS-PAGE). Ensuite, les protéines sont révélées pendant 2 h ou une nuit dans un mélange constitué de 0,1% (m/v) de bleu de Coomassie R-250, de 2% (m/v) d'acide trichloroacétique et de 50% (v/v) d'éthanol. La décoloration s'effectue par des lavages successifs dans des bains constitués d'un mélange de 30% (v/v) d'éthanol et de 7,5% (v/v) d'acide acétique. Les gels sont ensuite séchés entre 2 feuilles de Cellophane dans un four à chaleur tournante (Gel Air Dryer, BioRad) et conservés.

1.4.2 Révélation des protéines au nitrate d'argent

Il s'agit d'une coloration très sensible et sans bruit de fond, adaptée de Morrissey (1981). Le gel de polyacrylamide est d'abord immergé durant 3 h dans une solution de fixation composée de méthanol (30% v/v) et d'acide acétique (10% v/v). Il est ensuite lavé 3 x 2 min dans l'eau ultra-pure. Afin d'améliorer le contraste et la sensibilité, le gel subit un prétraitement d'une minute au thiosulfate de sodium hydraté ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ à 2 g.L^{-1}) avant d'être rincé à l'eau ultra-pure pendant 3 x 20 s. Il subit alors une étape d'imprégnation au nitrate d'argent (AgNO_3 à 1 g.L^{-1}) pendant 30 min. Après avoir rincé le gel à l'eau ultra-pure 3 x 20 s, la solution de révélation (carbonate de sodium Na_2CO_3 à 12 g.L^{-1} , formaldéhyde et thiosulfate de sodium hydraté à 2 g.L^{-1}) est appliquée sur le gel et remplacée dès que la solution brunit. Le gel est ensuite rincé à l'eau ultra-pure 3 x 30 s avant d'arrêter la réaction par lavage à l'aide de la solution composée d'acide acétique (1% v/v), pendant 10 min. Le gel est finalement trempé dans un mélange de 30% (v/v) éthanol et de 7,5% (v/v) acide acétique pendant 10 min avant d'être séché dans le four à chaleur tournante.

1.4.3 Révélation des protéines sur la membrane de PVDF

Après électrotransfert, la membrane est révélée une nuit dans un mélange contenant 0,1% (m/v) de bleu de Coomassie G-250, 1% (v/v) d'acide acétique et 40% (v/v) de méthanol. Elle est ensuite décolorée dans un mélange constitué de 50% (v/v) de méthanol dans l'eau.

1.4.4 Révélation des protéines sur la membrane de nitrocellulose

Après électrotransfert, la membrane est révélée par une solution de Rouge Ponceau S (solution aqueuse de Rouge Ponceau S à 0,2% (m/v), acide acétique 0,1% (v/v), filtrée à 0.2 μ m) pendant 5 min, puis décolorée à l'eau électrodésionisée (résistivité de 15 M Ω .cm). A ce stade, on peut laisser la membrane dans du PBS et la conserver au réfrigérateur pour une expérience ultérieure (Western-blot par exemple).

1.4.4. Révélation des glycoprotéines sur la membrane de PVDF

Les glycoprotéines sont révélées par le réactif de Schiff après oxydation par l'acide periodique à 1% (m/v) selon la méthode de Kapitany et Zebrowski (1973) adaptée à une membrane de PVDF par Egito *et al.* (2001). La membrane est tout d'abord lavée pendant 5 min dans 12% (m/v) d'acide trichloroacétique, puis incubée pendant 15 min dans 1% (m/v) d'acide periodique. La membrane est ensuite lavée 3 fois 5 min dans 15% (v/v) d'acide acétique et révélée pendant 30 min dans 50 mL de réactif de Schiff. Elle est finalement lavée par des bains successifs dans 7,5% d'acide acétique pendant 2 h et séchée à l'air libre. Toutes les étapes se déroulent à 4 °C et à l'obscurité.

2. Hydrolyses enzymatiques

2.1 Hydrolyse ménagée de la lactoferrine par la trypsine (génération des lobes N-et C-terminaux)

La lactoferrine (Lf) est solubilisée dans un tampon d'hydrolyse constitué de 100 mM de Tris-HCl, pH 8,2 et de 25 mM CaCl₂. La trypsine (E.C. 3.4.21.4) pancréatique bovine (51 unités enzymatiques par mg d'enzyme ; une unité enzymatique coagule 10 mL de lait bovin par min à 30°C ; Sigma Chemical Co., Saint Louis, MO, Etats-Unis) est ajoutée (rapport massique enzyme:substrat 1:385, 1:200 ou 1:50) à la solution protéique et le volume réactionnel est incubé à 37 °C pendant des temps variant de 45 min à 10 h. La réaction est stoppée par l'ajout de HCl 1,0 M jusqu'à ce que le pH chute à une valeur de 3, ou directement par l'ajout de 3 volumes de tampon Tris-HCl 125 mM, pH 8,2 contenant 2% (m/v) de SDS, 5% (v/v) de 2-mercaptoéthanol, 50% (v/v) de glycérol et 0,01% (m/v) de bleu de bromophénol, puis chauffés à 100 °C pendant 3 min avant d'être analysés par SDS-PAGE.

2.2 Hydrolyse trypsique/chymotrypsique (génération des peptides)

Un hydrolysats de Lf est obtenu par action de la trypsine avec un rapport massique enzyme:substrat 1:200 pendant 15 h à 37 °C dans un tampon d'hydrolyse constitué de 100 mM de Tris-HCl, pH 8,2 et de 25 mM CaCl₂. Cet hydrolysats est ensuite soumis à l'action de l' α -chymotrypsine pancréatique bovine (E.C. 3.8.7.1, 51 unités enzymatiques par mg de poudre ; Sigma Chemical Co., Saint Louis, MO, Etats-Unis). L' α -chymotrypsine est ajoutée (enzyme:substrat 1:200) à la solution protéique et le volume réactionnel est incubé à 37 °C pendant 15 h. La réaction est stoppée comme indiqué dans le paragraphe précédent et les échantillons sont analysés par SDS-PAGE afin de vérifier le degré d'hydrolyse. Les peptides sont séparés des gros fragments de taille plus importante sur filtre Amicon de seuil de coupure 10 kDa, puis 3 kDa (*Amicon Ultra Centrifugal Filter 10K et Microcon Centrifugal Filter 3K*, Millipore) à 4000 g pendant 10 min. Ensuite, les peptides de masse moléculaire inférieure au seuil de coupure sont dessalés par extraction en phase solide (SPE) sur Sep-Pak C18 (Waters France, Guyancourt, France) par 5 % d'ACN en présence de 0,1 % de TFA. Puis, les peptides sont élués par 30 % d'ACN, toujours en présence de TFA, et lyophilisés. Les glycopeptides sont éliminés de l'hydrolysats par floculation dans l'alcool selon la méthode décrite par Montreuil *et al.* (1986). Les 2 mg de peptides solubilisés dans 1 mL de PBS ont été agités au vortex dans 9 mL d'éthanol glacé et laissés à température ambiante pendant 30 min. L'échantillon est centrifugé (4000 g, 5 min, 20 °C) et l'éthanol est évaporé par centrifugation sous vide (Speed Vac Concentrator Plus ; Eppendorf, North Westbury; N.Y. Etats-Unis). Les peptides sont alors dessalés par SPE sur Sep-Pak C18 et lyophilisés.

3. Préparation des échantillons protéiques avant chromatographie

3.1 Préparation de protéines lactosériques bovines

Le lait utilisé est un lait cru de vache (*Bos taurus*) provenant de la ferme expérimentale de la Bouzule (Champenoux, France). Le lait est additionné de 0,05% (v/v) de toluène dès sa collecte à la ferme puis écrémé au laboratoire par centrifugation (4000 g, 30 min, 32 °C). Les caséines et les protéines de lactosérum sont séparées à partir de ce lait écrémé selon la méthode décrite par Egito *et al.* (2002). Les caséines sont précipitées à pH 4,2 par addition de HCl 2,0 M. Après centrifugation à 4000 g, 20 min et 20 °C, le surnageant est filtré sur coton de verre puis dialysé contre de l'eau électrodésionisée en présence de thymol (0,02%) pendant

72 h à 4 °C et les protéines lactosériques sont lyophilisées. Le lyophilisat est conservé à -20 °C en vue de son utilisation ultérieure pour la purification de Lf bovine.

3.2 Préparation de protéines de membranes hépatiques enrichies en LSR

Des rats, âgés de 9 à 12 semaines, ont été utilisés pour la préparation d'un extrait enrichi en LSR suivant le protocole développé par Mann *et al.* (1995). Treize rats (rats Sprague-Dawley, poids moyen 350 g,) sont anesthésiés par injection de 0,5 à 0,8 ml de pentobarbital de sodium (57-33-0, Sigma-Aldrich). Les cavités de l'abdomen sont ouvertes et les foies sont perfusés par la veine porte avec un tampon HEPES (5 mM, pH 7,4) glacé, contenant 0,15 M NaCl et 2 mM d'EDTA (tampon de perfusion). Le débit est de 0,5 ml/min, ce qui est proche de la vitesse d'écoulement du sang *in vivo* (0,35 ml/min/g de foie). Les foies sont incisés et rincés 2 fois dans le tampon de perfusion, puis essuyés et passés deux fois à l'homogénéisateur dans un tampon contenant 0,25 M de saccharose, 5 mM de Tris-HCl and 1 mM de MgCl₂, pH 7,4 (STM 0,25 M) à 500 g pendant 5 min à température ambiante (Yamato, homogénéisateur LSC). Un cocktail d'inhibiteurs de protéases (dilution au 1/100^{ème}, *complete cocktail inhibitor tablets* ; Roche Molecular Biochemicals, ref : 11836145001, préparé selon les indications du fournisseur) et du PMSF (dilution au 1/100^{ème}) sont ajoutés le jour de la préparation au tampon STM 0,25 M. L'homogénat est centrifugé (280 g, 4 °C, 10 min) pour éliminer les débris cellulaires et les noyaux des cellules. Le surnageant est transféré dans un tube conique de 50 mL et centrifugé à nouveau (1500 g, 4 °C, 15 min). La couche lipidique blanche est retirée délicatement de la surface et le culot est remis dans le tampon STM 0,25 M pour atteindre un volume final de 10 mL, et homogénéisé deux fois à 500 g. Un volume de 21,7 mL de STM 2 M (même composition que le tampon STM 0,25 M excepté que la concentration de saccharose est de 2 M) est ajouté dans chaque tube et l'on vérifie que la densité est de 1,18 g/mL. Le volume est ajusté à 34 mL dans chaque tube avec du tampon STM 1,42 M. Ce mélange est transféré dans un tube SW28 Ultra-Clear et 3 mL de tampon STM 0,25 M sont ajoutés délicatement sur le dessus des tubes. Les tubes sont centrifugés dans un rotor SW28 Beckman (82000 g, 60 min, 4 °C). La membrane plasmique à l'interface est recueillie. Elle est reprise dans un tampon Tris-HCl 20 mM, 2 mM EDTA, pH 7,4 (tampon de lavage), puis centrifugée (1500 g, 15 min, 15 °C). Le culot est à nouveau repris dans un tampon de lavage contenant le cocktail d'inhibiteurs (dilution au 1/100^{ème}) et traité par ultrasons (puissance 2,5, cycle 25%, 30 s ; Vibra Cell). La concentration des protéines est

mesurée par la méthode de Bradford (Bradford, 1976). Des aliquotes de membranes plasmiques (40 mg de protéines) sont réparties dans des tubes et centrifugées dans le rotor Beckman Ti75 (120000 *g*, 20 min, 4 °C). Le surnageant est éliminé et le culot est remis en suspension dans 5 mL de tampon CHAPS (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 13 mM CHAPS, et le cocktail d'inhibiteurs de protéases (dilution au 1/100^{ème} = 10 mL.L⁻¹) pH 8,0. Les fractions aliquotes sont traitées par les ultrasons (puissance 2,5, cycle 25%, 30 s) et incubées à 4 °C pendant 30 min, puis centrifugées (200000 *g*, 4 °C, 2 h). Le surnageant contenant les protéines est filtré par un filtre de 0,22 µm et utilisé pour la purification du récepteur LSR.

4. Chromatographie liquide

4.1 Purification de la lactoferrine sur CM-Sephadex C-50

La Lf est purifiée à partir des protéines sériques de lait bovin en utilisant la procédure décrite précédemment par Sharma *et al.* (1999). Les protéines sériques (2 g) sont diluées avec un tampon Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0 contenant 0,02% (m/v) d'azoture de sodium. La résine CM-Sephadex C-50 est ajoutée à celui-ci (7 g.L⁻¹) et la suspension est agitée lentement avec un agitateur magnétique pendant une heure. La résine est alors coulée dans une colonne (60 x 5 cm), rincée par un tampon Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0, puis par le même tampon contenant 0,1 M de NaCl pour faciliter l'élimination des impuretés. La Lf est ensuite éluée avec le même tampon contenant 0,25 M de NaCl, puis dialysée contre un excès d'eau électrodésionisée (au minimum 10 fois le volume de l'échantillon). La Lf est de nouveau déposée sur une colonne CM-Sephadex C-50 colonne (20 x 2,5 cm) pré-équilibrée avec un tampon Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0 contenant 0,02% (m/v) d'azoture de sodium et éluée avec un tampon Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0 contenant 0,3 M de NaCl (50 mL). Après analyse SDS-PAGE, les fractions d'intérêt (*i.e.*, enrichies en Lf) ont été regroupées, concentrées par évaporation sous-vide et déposées sur une colonne d'exclusion stérique Sephadex G-100 (60 x 5 cm) en utilisant le tampon Tris-HCl 0.05 M, pH 8,0. La pureté de la Lf est vérifiée par électrophorèse SDS-PAGE. La fraction de Lf est conservée à -20 °C.

4.2 Purification de la lactoferrine sur colonne Hitrap-CM-FF

La Lf est purifiée à partir des protéines lactosériques par chromatographie d'échange de cations sur une colonne Hitrap CM-FF 5/5 (1,5 x 2,5 cm ; taille des particules 45 à 165 μm ; Interchim, Montluçon, France) connectée à un système FPLC (ÄKTA-FPLC, GE Healthcare France, Velizy-Villacoublay, France). Les protéines de lactosérum sont solubilisées (10 mg.mL^{-1}) dans un tampon Tris-HCl à 50 mM, pH 8,0. Un volume de 10 mL est injecté sur la colonne préalablement équilibrée avec ce même tampon. Un gradient linéaire croissant de 0–1 M de NaCl dans le tampon Tris-HCl de 50 mM, pH 8,0 est appliqué pendant 50 min. Le débit est de 1 mL.min^{-1} et l'absorbance est mesurée à 280 nm. Les fractions collectées sont dialysées contre de l'eau électrodésionisée en présence de thymol comme antibactérien pendant 48 h, puis lyophilisées. Les lyophilisats sont conservés à -20°C et analysés par SDS-PAGE.

4.3 Purification du N-lobe de la lactoferrine sur colonne TSK SP-5PW

Le N-lobe de la Lf est purifié en utilisant un protocole adapté de Takayama *et al.* (2002). La purification est réalisée par chromatographie d'échange de cations avec une colonne TSK SP-5PW (8 mm x 7,5 mm ; Beckman Coulter France, Roissy-Charles de Gaulle, France) connecté au système ÄKTA-FPLC. La Lf est remise en solution et hydrolysée par la trypsine comme indiqué dans le paragraphe 2.1. Un volume de 2 mL contenant 8 mg d'hydrolysate protéique est injecté sur la colonne préalablement équilibrée avec le tampon de 50 mM phosphate de sodium pH 7,0. Un gradient linéaire croissant de 0 à 0,5 M de NaCl et de 0 à 250 mM de NH_4OH dans le même tampon est appliqué pendant 34 min. Le débit appliqué est de 1 mL.min^{-1} et l'absorbance est mesurée à 280 nm. Les fractions collectées sont dialysées contre de l'eau électrodésionisée en présence de thymol pendant 48 h puis lyophilisées. Les lyophilisats sont conservés à -20°C et analysés par SDS-PAGE.

4.4 Purification du C-lobe de la lactoferrine sur colonne C4

Le C-lobe de la Lf est purifié en utilisant une colonne analytique Nucleosil C4 (150 x 2 mm ; taille de particules 5 μm ; Cluzeau, Sainte-Foy-la-Grande, France) reliée au système HPLC Alliance 2690. Les échantillons (fractions peptidiques à 1 mg.mL^{-1}) sont solubilisés

dans une solution à 5% (v/v) ACN dans l'eau contenant 0,1% (v/v) TFA. Le débit est de 250 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ et le volume d'échantillon injecté sur la colonne est de 500 μL . Un gradient linéaire de 5 % d'ACN en présence de 0,1% (v/v) de TFA est appliqué pendant 5 min, suivi d'une étape isocratique de 50 min à 18,6% (v/v) d'ACN en présence de 0,1% (v/v) de TFA. Les fractions collectées sont directement lyophilisées et conservées à -20 °C avant leur analyse.

5. Séquençage des protéines et des peptides

5.1 Microséquençage protéique N-terminal par dégradation d'Edman

Le microséquençage N-terminal a été réalisé par Franck Saulnier au Service Commun de Séquences de Protéines de l'Université de Lorraine (Microséquenceur modèle 476A, Applied Biosystems, Foster City, CA, Etats-Unis), sur des spots découpés dans la membrane de PVDF.

Le principe de la méthode d'Edman est le suivant : le phénylisothiocyanate (PITC, réactif d'Edman) réagit avec les groupes amino-terminaux des protéines en milieu légèrement alcalin pour former leur adduit phénylthiocarbamyl (PTC). Ce produit est traité par un acide fort anhydre comme l'acide trifluoroacétique, qui libère le résidu N-terminal sous sa forme dérivée thiazolinone mais sans hydrolyser les autres liaisons peptidiques. La dégradation d'Edman libère donc le résidu acide aminé N-terminal mais laisse le reste de la chaîne polypeptidique intact. Le dérivé thiazolinone de l'acide aminé est extrait sélectivement par un solvant organique et transformé en dérivé phénylthiohydantoïne (PTH) beaucoup plus stable par traitement avec un acide dilué.

Chaque PTH-acide aminé formé est alors analysé par HPLC en phase inversée sur une colonne Microbore C18 (diamètre interne de 2,1 mm), ce qui permet son identification. Chaque cycle dure environ 30-35 min avec le microséquenceur 476A. L'échantillon est repris par du TFA 0,1% dans de l'eau ultra-pure puis est fixé sur une membrane de PVDF (système ProSorb ; Life Technologies Invitrogen France, Saint-Aubin, France). La membrane est désolidarisée du ProSorb puis l'échantillon est déposé (5 μL) dans la cartouche de dépôt du microséquenceur. L'analyse de séquence est ensuite réalisée à l'aide du moteur de recherche automatique MASCOT v2.2 (Perkins *et al.*, 1999).

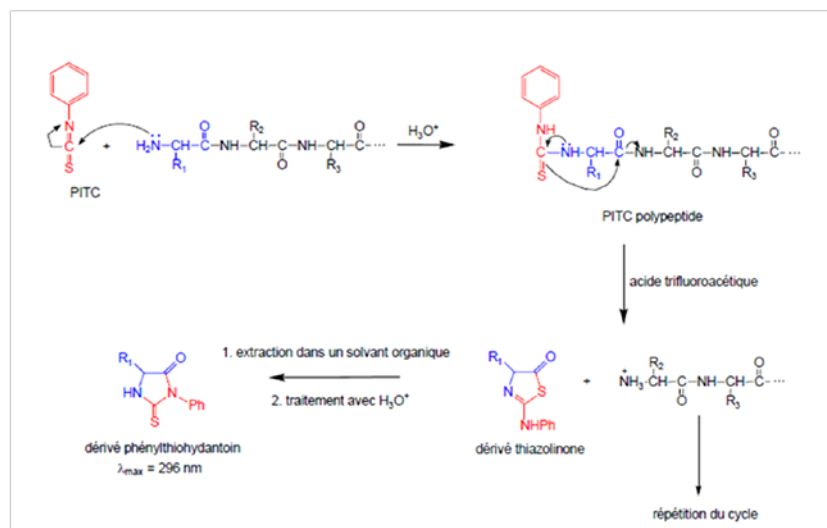


Figure 20.

Etapes du microséquençage N-terminal par la méthode d'Edman (Niall, 1973).

5.2 Identification des N- et C-Lobes par spectrométrie de masse

Les analyses par spectrométrie de masse des fragments obtenus par hydrolyse ménagée et correspondant aux N- et C-lobes de la Lf ont été réalisées par Mme Iman Haddad au Laboratoire de Spectrométrie de Masse Biologique et Protéomique de l'ESPCI Paris-Tech. Les fragments protéolytiques issus de l'hydrolyse ménagée par la trypsine ont été déposés sur un gel SDS-PAGE à 12% d'acrylamide, et révélés au bleu de Coomassie R-250. Les bandes ont été découpées et conservées dans de l'acide acétique 1% (v/v).

Les séparations ont été réalisées sur une chaîne de nanoHPLC U3000 (Dionex France, Courtaboeuf, France). L'échantillon brut (8 µL) a été dessalé et concentré en ligne avec une précolonne (PepMap 100 Å, diamètre des particules 3 µm, diamètre interne 300 µm, longueur 5 mm, Dionex) avant d'être élué et séparé sur une colonne analytique à polarité de phase inversée (PepMap100 Å, diamètre des particules 3 µm, diamètre interne 75 µm, longueur 15 cm, Dionex) avec un débit de 220 nL.min⁻¹. Le profil du gradient linéaire était : 99% de solution A (98% d'eau, 2% d'ACN et 0,1% d'acide formique) et 1% de solution B (10% d'eau, 90% d'acétonitrile et 0,1% d'acide formique) pendant 5 min pour le dessalage à 15 µL.min⁻¹, puis 5% de solution B pendant 3 min à 300 nL.min⁻¹, 5% à 25% de solution B en 32 min, montée à 90% de solution B en 1 min et un palier à 90% de solution B pendant 10 min.

Les données ont été acquises sur un spectromètre hybride de type FT-ICR (LTQ-FT, ThermoFisher Scientific France, Courtaboeuf, France). Les acquisitions se font en mode automatique : une acquisition en mode MS et MS/MS (fragmentation), un "MS survey scan" en FTMS (m/z 400-2000 Th), suivi de 3 "SIM scan" en FTMS (détermination de la masse exacte de l'état de charge des 3 peptides les plus intenses) en parallèle de 3 scan MS/MS dans le LTQ.

Les recherches ont été réalisées dans la banque Swissprot et dans un fichier comportant uniquement la séquence de la Lf avec le logiciel myProms (Poullet *et al.*, 2007). Les recherches ont été réalisées en intégrant 2 modifications possibles (carbamidométhylation ou oxydation des méthionines) Le nombre de « mauvaises coupures » (*miscleavage*) possible est de 2. La tolérance de masse en MS est de 5 ppm et la tolérance de masse en MS/MS est de 1 Da.

5.3 Analyse des peptides en spectrométrie de masse

La réduction des ponts disulfures a été réalisée par l'ajout de dithiothreitol ou DTT (excès de 100 fois/contenu en résidus de cystéine) à l'hydrolysate suivi d'une incubation à 37 °C pendant 1 h. L'alkylation a été réalisée par l'ajout d'iodoacétamide (excès de 2,5 fois par rapport au DTT) suivi d'une incubation de 45 min à température ambiante. Une analyse LC-MS a été réalisée sur les peptides issus de la double digestion trypsine/chymotrypsine sur un appareillage ThermoFischer Scientific équipé d'une trappe ionique linéaire (LTQ : Linear Trap Quadripole). La séparation chromatographique a été réalisée à 25 °C sur une colonne de phase inversée Alltima C18 (150 x 2.1mm, porosité 5 μ m, Grace/Alltech, Darmstadt, Allemagne) équipée d'une précolonne (7.5 x 2.1mm, porosité 5 μ m, Grace/Alltech). Les phases mobiles étaient constituées d'eau additionnée de 0.1% d'acide trifluoroacétique (solution A) et d'acétonitrile additionné de 0,1% d'acide trifluoroacétique (solution B). Les peptides ont été élués par un gradient croissant de solvant B (5 à 60% en 60 min, débit : 0,2 mL/min). En plus de la détection MS, une détection UV-visible a été réalisée tout au long de l'analyse par un détecteur à barrettes de diodes.

Les conditions de spectrométrie de masse étaient les suivantes : mode d'ionisation positif ESI (*ElectroSpray Ionisation*). Les valeurs de gaz-source (azote) ont été fixées en valeur arbitraire.min⁻¹ à 20 pour le gaz de nébulisation, 5 pour le gaz auxiliaire (focalisation) et 5 pour le gaz rideau. La température du capillaire. Les ions ont été focalisés par l'intermédiaire de lentilles dont la tension a été fixée à 90 V, -42 V et -5.75 V, respectivement

(tube, split et front). Les paramètres de focalisation ont été optimisés par la perfusion à 5 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ d'une solution standard du dipeptide VW à 0.1 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ dans le débit de la phase mobile (A/B: 50/50). Un balayage MS a été réalisé pour des valeurs de m/z comprises entre 100 et 2000, pendant toute la durée de l'analyse et des spectres MS2 ont été réalisés afin d'obtenir des informations structurales.

Une première analyse LC-MS a été réalisée sur l'hydrolysats sans réduction/alkylation pour la caractérisation des peptides ne renfermant pas de ponts disulfures. Les peptides ont été recherchés sur la base des pics majoritaires à 215 nm et également observés sous leur forme monoprotonée $[\text{M}+\text{H}]^+$ sur le spectre MS. Au cours d'une deuxième étape, la LC-MS s'est focalisée sur les peptides réduits et alkylés. Les peptides alkylés ont été recherchés par comparaison du chromatogramme à 215 nm avec celui obtenu pour les peptides non traités. Les peptides ont aussi été identifiés sur le spectre MS sous leur forme protonée $[\text{M}+57+\text{H}]^+$, la masse additionnelle de 57 uma (unité de masse atomique) correspondant au groupe acétamide fixé sur l'atome de soufre du résidu de cystéine.

6. Dosage des protéines

La concentration protéique des échantillons est déterminée par dosage colorimétrique selon la méthode de Bradford (1976). La méthode de Bradford est un dosage colorimétrique, basé sur le changement de longueur d'onde d'absorbance suite au changement de couleur d'un colorant, le bleu de Coomassie R-250, après liaison aux résidus arginine et aux résidus hydrophobes présents dans la ou les protéines. La concentration de protéines des échantillons est calculée par rapport à une droite d'étalonnage réalisée à partir d'une solution de sérum albumine bovine (BSA) dont la concentration est connue. Un volume de 100 μL de solution protéique (25 à 100 μg de protéines par mL) est mis dans 1 mL de réactif de Bradford (*Bio-Rad Protein Assay*, Bio-Rad) pendant 5 min, puis l'absorbance du réactif est mesurée à 595 nm contre un blanc constitué de 1 mL de réactif de Bradford additionné de 100 μL d'eau. On détermine alors la quantité de protéines en se référant à la courbe de calibration réalisée à partir d'une solution étalon (1 à 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de sérum albumine bovine (Sigma).

7. Immunodétection du LSR par Western blot

Après migration sur SDS-PAGE, les protéines sont transférées sur une membrane de PVDF ou de nitrocellulose. La membrane de PVDF est immergée dans du méthanol à 100%

pendant 2 secondes puis pendant 2 min dans de l'eau ultrapure avant d'être équilibrée dans du tampon de transfert CAPS (acide 3-(cyclohexylamino)-1-propanesulfonique) à 10 mM contenant 10% de méthanol et 2 M de NaOH, pH 11. Trois feuilles de papier-filtre (Whatman 3MM) de la même taille que le gel et la membrane sont utilisés pour réaliser le sandwich de transfert. Après transfert, la quantité de protéine déposée est systématiquement vérifiée à l'aide d'une coloration au Rouge Ponceau (voir 1.4.4). Puis, la membrane est incubée pendant 45 min dans un tampon PBS contenant 3% de BSA pour bloquer les sites de fixation non spécifique. Après quatre lavages de 15 min dans le tampon TBST, la membrane est incubée une nuit avec le premier anticorps (premier anticorps anti-LSR, HPA007270 Sigma, dilution: 1/1000) sous agitation constante. Les anticorps non liés sont éliminés par quatre lavages successifs de 15 min avec le tampon TBST. Les bandes sont révélées par chemiluminescence (GE Healthcare) en utilisant un anticorps secondaire (anti-rabbit IgG, HRP-linked antibody #7074, Cell Signaling Technology 7074, dilution de 1/2000) conjugué à la peroxydase et le kit de chemiluminescence de la société GE Healthcare.

8. Effet du traitement de la lactoferrine sur TG postprandiale chez les souris

Pour étudier l'effet de la Lf sur le taux de TG plasmatique de souris, une solution de lactoferrine à 20 mg.mL⁻¹ dans un tampon phosphate (PBS) a été préparée. La solution a été filtrée (0,22 µm) avant injection aux animaux. Huit souris *wild-type* mâles (C57BL6/Rj, Janvier Elevage, Le Genest Saint Ile, France) ont eu accès *ad libitum* à de l'eau et à un régime standard (régime 2018, Harlan, Gannat, France). A l'âge de 14 semaines, les souris ont été divisées en deux groupes de quatre. Un volume de 100 µL de PBS contenant 2 mg de Lf a été injecté à un groupe de souris par voie intraveineuse (i.v., veine de la queue) et le même volume de PBS a été injecté à l'autre groupe de souris comme contrôle. Immédiatement après l'injection de la Lf, les souris ont été gavées avec 300 µL d'huile d'olive et des prélèvements de 100 µL environ de sang ont été recueillis à t = 0, 1, 2 et 3 h. Les échantillons de sang ont été collectés chaque heure dans des microtubes (Eppendorf) et centrifugés (10000 g, 5 min à 4 °C) immédiatement après le prélèvement pour séparer le plasma sérique des cellules sanguines. Les microtubes utilisés pour le sang ont été prétraités à la paraoxone afin d'inhiber l'activité lipasique (Zambon *et al.*, 1993) Les échantillons de plasma ont été stockés dans des tubes à -80 °C.

9. Dosage enzymatique des TG plasmatiques de souris

Principe : La méthode utilisée pour le dosage des TG plasmatiques est basée sur une série de réactions enzymatiques couplées à l'issue desquelles la réaction entre le peroxyde d'hydrogène réagit avec la 4-aminoantipyrine en présence de parachlorophénol et d'une peroxidase pour former la quinonéimine qui absorbe à 505 nm. Le détail de ces réactions est présenté ci-dessous :

La solution du travail est préparée en mélangeant le réactif 1 (Tris-HCl 100 mM, pH 7,6 contenant 2.7 mM de magnésium and 4 mM de parachlorophénol) et le réactif 2 (amino-antipyrine 0.4 mM, lipase ≥ 1000 U/L, glycérokinase ≥ 200 U/L, glycérol-3-phosphate oxydase ≥ 2000 U/L, ATP 0.8 mM, peroxidase ≥ 200 U/L). Un étalonnage est effectué dans la microplaque (Greiner Bio-One 96 puits) à chaque série de dosage en utilisant le calibreteur multiparamétrique Calimat (BioMérieux, Lyon, France, ref: 62321). Puis, 2 μ L de chaque échantillon de sérum plasmique sont ajoutés dans chaque puits avec 200 μ L de solution de travail. La microplaque est incubée sur un agitateur de microplaque Titramax 100 (Heidolph Instruments, Schwabach, Allemagne) pendant 10 min à 20-25 °C. Les valeurs de densité optique sont déterminées par le lecteur de microplaques ((Benchmark Plus, Bio-Rad). Un contrôle de qualité est effectué à chaque série de dosage avec un sérum de contrôle (sérum de contrôle multi-paramétrique titré, BioMérieux, ref 62453) de façon à s'assurer de la validité de chaque série.

10. Couplage de la sonde de fluorescence Alexa Fluor-488 à la lactoferrine

La Lf bovine a été marquée avec la sonde de fluorescence Alexa Fluor-488 (Life Technologies Invitrogen France) selon les instructions données par le fournisseur. Pour réaliser le marquage, 8 mg de Lf ont été remis en solution dans 2 mL de tampon phosphate de sodium à 5 mM (pH 7,5) et un volume 200 μ L de tampon bicarbonate de sodium 1,0 M (pH 8,34) a été ajouté pour maintenir le pH à 8,0. La solution d'Alexa Fluor-488 (10 mg/mL dans du DMSO) a été préparée immédiatement avant utilisation. Un volume 25 μ L de la solution de fluorophore a été ajouté à la Lf et le mélange réactionnel mis à incuber pendant une heure à 37 °C, puis laissé toute la nuit à 4 °C. La Lf marquée a été purifiée par dialyse contre du tampon PBS (élimination de la sonde en excès) pendant 48 h, puis centrifugée deux fois (12000 g, 10 min à 4 °C) jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de fluorescence libre détectable dans le surnageant restant. La Lf marquée par la sonde Alexa Fluor-488 a été concentrée par

centrifugation en utilisant un Microcon de seuil de coupure 50 kDa (Millipore). Le degré de marquage a été calculé en utilisant les formules suivantes :

$$\text{Concentration de protéine (M)} = \frac{[(A_{280 \text{ nm}} - (A_{496 \text{ nm}} \times 0,12))] \times \text{dilution factor}}{\epsilon}$$

$$\text{Fluorescéine 488/molecule de protéine} = \frac{[(A_{280 \text{ nm}} - (A_{496 \text{ nm}} \times 0,12))] \times \text{dilution factor}}{70000 \times \text{concentration de protéine (M)}}$$

0,12 = Facteur de correction, ϵ = coefficient d'extinction moléculaire de l'Alexa Fluor-488

11. Mise en évidence de la colocalisation du LSR et de la lactoferrine sur des hépatocytes

Une lignée de cellules de souris Hepa1-6 a été cultivée dans un milieu DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Life Technologies Invitrogen, France) contenant 10% de sérum de veau fœtal, 100 mM de glutamine et 100 mM de pénicilline/streptomycine (DMEM complet, Stenger *et al.*, 2010). Elles ont étéensemencées à 1×10^5 cellules/puits (plaque de 12 puits). Après 48 h, les cellules à environ 80-90% de confluence ont été lavées avec 0,5 mL de PBS et incubées à 37 °C dans 0,5 mL de DMEM complet contenant 10 ng.mL⁻¹ de leptine pendant 1 h afin d'optimiser l'expression du LSR. Les cellules ont été lavées dans du PBS et ensuite incubées à 37 °C pendant 20 min avec DMEM contenant 0,2% (m/v) BSA et la Lf-Alexa Fluor-488 (2 mg.mL⁻¹) en absence ou en présence d'oléate. L'oléate a été ajouté sous forme acide gras libre dans une solution d'isopropanol. Le volume d'isopropanol n'excédait pas 1%. La lactoferrine a été ajouté 5 min après l'oléate. Les cellules ont été lavées avec du PBS contenant 0,1% de BSA, puis deux fois par du PBS froid. Tous les lavages ont été effectués à 4 °C. Les cellules ont été fixées par du paraformaldéhyde 4% (v/v) à température ambiante pendant 15 min, puis rincées avec du PBS et laissées dans le PBS une nuit à 4°C. Le lendemain, les cellules ont été perméabilisées avec du PBS contenant 0,1% (m/v) de BSA et 0,1% (v/v) de Triton X-100 pendant 20 min, puis incubées avec des anticorps anti-LSR (1/100 de dilution dans du PBS + 0,1% de BSA, 250 µL par puits) pendant 2 h, et à nouveau lavées dans du PBS contenant BSA 0,1% à température ambiante sur un agitateur. Les cellules ont été incubées avec l'anticorps secondaire (anti-rabbit IgG antibody-linked Alexa Fluor-555, dilués au 1/2000 dans du PBS renfermant 0,1% de BSA), puis rincées dans du PBS contenant 0,1% BSA. Les cellules sont incubées avec 1/500 de dilution de DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) pendant 15 min et rincées au PBS et à

l'eau distillée. Les cellules sont lavées à l'eau et montées sur des lames en utilisant du fluormount (Sigma-Aldrich). La microscopie confocale a été réalisée sur un appareil Fluoview (FV10i, Olympus).

12. Mise en évidence de l'interaction entre la lactoferrine (ou ses fragments) et le LSR par la technique du *Ligand blot*

Une quantité de 20 µg LSR purifié est déposée sur un gel de SDS-PAGE à 10% d'acrylamide, en conditions non réductrices et transférée après migration sur membrane de nitrocellulose. La quantité de protéine déposée est systématiquement vérifiée à l'aide d'une coloration au Rouge Ponceau (cf 1.4.4). Les bandelettes de nitrocellulose sont placées pendant 45 min dans un tampon PBS contenant 3% de BSA pour bloquer les sites de fixation non spécifiques. Après quatre lavages de 15 min dans le tampon PBS, les bandelettes sont incubées 15 min dans un tampon PBS additionné de 200 mM NaCl (concentration finale en NaCl: 350 mM) et 2 mM d'EDTA, pH 8, puis 5 min en présence et en absence de 0,8 mM d'oléate dans le même tampon. Les bandelettes sont ensuite incubées pendant 1 h à 37 °C avec 2 mg/mL de Lf ou de ses fragments. Après quatre lavages de 15 min dans le tampon PBS contenant 0,5 % de Triton X-100, les bandelettes sont incubées avec de l'anticorps anti-Lf (PA1-40280 ; dilution au 1/500 ; Thermo Scientific, USA) pendant 2 h à 37 °C. Après quatre lavages de 15 min dans le tampon PBS, la lactoferrine liée au LSR sur la membrane nitrocellulose est détectée par incubation avec un anticorps secondaire conjugué à la HRP (1/2000 dans du tampon TBST) et les bandes de protéines sont révélées par chemiluminescence (Kit GE Healthcare). Des expériences de compétition entre la Lf et des VLDL ($d < 1,006 \text{ g. mL}^{-1}$) issues de sang humain ont également été réalisées dans lesquelles les bandelettes, après traitement à la BSA et lavages, sont incubées en présence de 0,8 mM d'oléate pendant 30 min, puis avec des concentrations variables de Lf (0 ; 0,5 ; 1 ; 3 ; 5 mg.mL⁻¹) pendant 30 min et avec des VLDL (20 µg. mL⁻¹) pendant une heure à 37 °C. Après lavage dans du PBS renfermant 0,5 % de Triton 100, une incubation est réalisée avec un anticorps anti-apoB (1/1000) (Santa Cruz Biotechnology, SC-25542). Après quatre lavages de 15 min dans le tampon TBST, les VLDL fixées sur la membrane de nitrocellulose sont détectées par l'ajout d'un anticorps secondaire conjugué à la HRP (1/2000). La révélation a été effectuée comme précédemment.

13. Effet de la lactoferrine sur l'expression du LSR au niveau cellulaire

Les cellules Hepa1-6 de souris sont cultivées 48 heures dans le milieu DMEM complet sur des plaques à 12 puits. Les cellules sont lavées avec du PBS 1X à température ambiante. Du milieu DMEM complet est ajouté à chaque puits (500 μ L/puits). Les cellules sont incubées avec la lactoferrine bovine (2 mg.mL⁻¹) en absence et en présence de 0,4 mM ou 0,8 mM d'oléate (concentration finale) L'oléate est ajouté 5 min avant l'incubation de la lactoferrine pour activer le LSR. Les cellules ont été incubées à 37 °C, pendant 3h. Pour arrêter le métabolisme cellulaire, 500 μ L de PBS froid contenant 0,1% de BSA sont ajoutés aux cellules placées sur un bac de glace. Le milieu est ensuite remplacé par le tampon RIPA froid (Radio Immuno Precipitation Assay buffer, composition : 20 mM de Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM de NaCl, 1 mM de Na₂EDTA, 1 mM de EGTA, NP-40 1%, désoxycholate de sodium 1%, 2.5 mM de pyrophosphate de sodium, 1 mM de β -glycérophosphate, 1 mM de Na₃VO₄, 1 μ g.mL⁻¹ de leupeptine ; 100 μ L/puits) afin de lyser les cellules. Les cellules sont récupérées dans le RIPA, et laissées sur la glace pendant 30 min. Après 30 min, les lysats sont centrifugés à 12000 *g* pendant 30 min à 4 °C. Les surnageants sont récupérés et leur concentration protéique est déterminée par la méthode de Bradford en utilisant la BSA comme standard. Une quantité de 25 μ g a été déposée sur SDS-PAGE. Après migration, les protéines sont transférées sur nitrocellulose et un immunoblot est réalisé avec un anticorps anti-LSR à 1/1000 de dilution dans un tampon de TBST, puis avec un anticorps secondaire conjugué à la HRP. L'actine est utilisée comme « loading control » afin de vérifier que la même quantité de protéines est déposée par puits. L'analyse densitométrique des autoradiographies est réalisée à l'aide du logiciel ImageJ, un freeware de *National Institute of Health* disponible sur le site suivant : <http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>.

14. Détermination de l'expression de l'ARNm du LSR par PCR en temps réel

Les cellules Hepa1-6 de souris sont incubées avec la lactoferrine et en absence ou en présence de 0,4 et 0,8 mM d'oléate, comme décrit dans le paragraphe 13. Après lavage dans du PBS, les cellules sont récupérées dans du PBS en utilisant un « cell scraper ». Les culots des cellules sont ensuite stockés à -20°C jusqu'au moment de préparer de l'ARNm. Les cellules sont homogénéisées dans le réactif de lyse QIAzol (QIAGEN, Courtaboeuf, France). Un volume de 200 μ L de CH₃Cl est ajouté et centrifugé à 12000 *g* pendant 15 min à 4 °C.

L'ARN total a été extrait en utilisant le minikit RNeasy tissus lipidique (QIAgen), suivant les instructions du kit. L'ARN a été purifié en utilisant la colonne RNeasy fournie avec le kit et lavée avec du tampon de lavage RW1 (tampon du kit, composition complète non communiquée) contenant du thiocyanate de guanidine ; QIAgen). L'éthanol retenu est éliminé avec tampon PRE (thiocyanate de guanidine 2,5–10% ; éthanol 2,5-10% ; QIAgen). Un volume de 60 µL de RNase (0,05 M de Tris-HCl pH 8, contenant 0,001 M de EDTA et 0,01% de RNase) est ajouté à l'ARN et les échantillons sont conservés à -20 °C pour la nuit. La concentration d'ARN a été déterminée (système QIAxcel) en mesurant l'absorbance à 260 nm. Les primers suivants ont été utilisés

Tableau 5. Primers spécifiques pour le LSR et chacune des sous-unités

Gene	Primer	Séquence (5'-3')	Localisation	Taille Amplicon (bp)
Lsr	Forward	CAGGAGAATCACCATCACAGGAA	Exon 2	77
	Reverse	AGTAATACACTCCACTGTCTCCCCAG	Exon 3	
Lsr α	Forward	AAGATCTGGATGGGAACAACGAG	Exon 3	63
	Reverse	CTTCTGAGGTCCTGCCAAGG	Exon 4	
Lsr α'	Forward	AAGATCTGGATGGGAACAACGAG	Exon 3	60
	Reverse	CAAAGAGCCAATCAAGGACAATG	Exon 5	
Lsr β	Forward	AAGATCTGGATGGGAACAACGAG	Exon 3	61
	Reverse	CCAGCAGCATAAACAAGGACAAT	Exon 6	
Hprt	Forward	TCAGACTGAAGAGCTACTGTAATGATCA	Exon 3	76
	Reverse	AAAGTTGAGAGATCATCTCCACCAA	Exon 4	

Hprt : hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase

Les réactions de polymérisation en chaîne sont réalisées sur 1 µg d'ARN en utilisant le SYBR Green PCR Master Mix sur le système de StepOnePlus PCR en temps réel (Applied Biosystems). Le gène de l'Hypoxanthine guanine PhosphoRibosylTransferase (HPRT) est utilisé comme gène de référence (« House-keeping gene »). Les calculs d'expression relative et les analyses statistiques sont effectués en utilisant l'outil « Relative Expression Software Tool » (REST, 2009).

RESULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE 1

Purification, hydrolyse et caractérisation de la lactoferrine et de ses fragments

1. Optimisation d'une méthode de purification de la lactoferrine bovine

L'objet du travail de ce premier chapitre était de purifier la lactoferrine en grande quantité avec une méthode efficace de façon à disposer de Lf avec un bon degré de pureté par une méthode impliquant un nombre minimal d'étapes. Nous avons purifié cette Lf à partir des protéines lactosériques obtenues après précipitation de la fraction caséinique de lait cru (collecté à la ferme expérimentale de La Bouzule, Champenoux). Cette solution a été préférée à l'achat de Lf commerciale dont le degré de pureté n'est pas très élevé et qui est susceptible d'avoir subi des traitements technologiques pouvant conduire à la dénaturation de la protéine. La Lf que nous avons préparée a ensuite été utilisée pour les études de recherche d'interaction avec le LSR, ainsi que pour les études *in vivo*.

1.1 Purification de la lactoferrine selon des méthodes existantes

Dans un premier temps, nous avons appliqué le protocole de séparation en 2 étapes proposé par Sharma *et al.* (1999). La première étape consiste en la purification par chromatographie d'échange de cations sur résine CM-Sephadex C-50 en batch et la seconde étape consiste en une filtration sur gel sur Sepharose G100. Les essais que nous avons réalisés montrent que la β -LG et l' α -LA, ne sont pas retenues sur la phase stationnaire CM-Sephadex et sont éluées par le tampon Tris-HCl 50 mM pH 8,0 contenant 0,1 M de NaCl. La plupart des protéines fixées sont éluées par 0,25 M NaCl, tandis que la Lf, plus fortement retenue sur l'échangeur de cations, est élue à 0,3 M NaCl. Les fractions renfermant la Lf ont ensuite été déposées sur une résine Sepharose G100. Le profil électrophorétique de la fraction contenant la Lf montre qu'elle contient encore des impuretés (Figure 21). Du point de vue mobilité électrophorétique, la bande obtenue après purification pourrait, en théorie, correspondre à la lactoperoxydase (78 kDa), ou à la Lf (80 kDa). Cependant, il est connu que la lactoperoxydase est élue à des concentrations en NaCl plus faibles (80% de la lactoperoxydase sont élués à 0,1 M NaCl ; Plate *et al.*, 2006). De plus, la solution présente une coloration rose-rouge qui est caractéristique de la Lf chélatant le fer. Ainsi, la protéine attendue dans la fraction la plus fortement retenue sur la résine échangeuse de cations est bien la Lf.

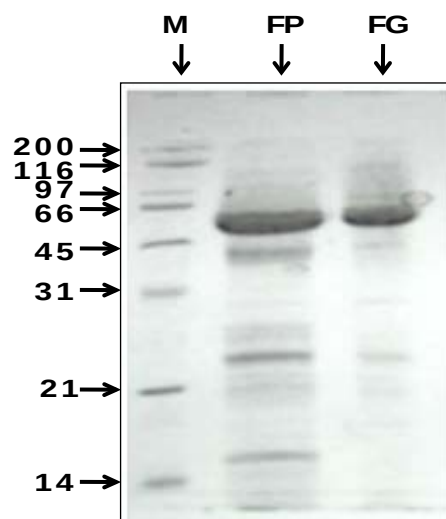


Figure 21.

Caractérisation électrophorétique (SDS-PAGE 15%) de la lactoferrine purifiée selon la méthode de Sharma *et al.* (1999). *M* : marqueurs de masse moléculaire, *FP* : fraction collectée après séparation sur CM-Sephadex C-50, *FG* : fraction collectée après séparation sur Sepharose G100 (la quantité de protéine par puits est de 15 µg, coloration au bleu de Coomassie R250).

1.2 Mise au point d'une nouvelle méthode de purification de la lactoferrine

La méthode précédente n'étant pas totalement satisfaisante, nous avons mis au point une méthode plus efficace, en une seule étape, par chromatographie d'échange de cations sur une colonne Hitrap CM-FF 5/5 (1,5 x 2,5 cm ; taille des particules 45 à 165 µm ; Interchim, Montluçon, France) connectée à un système FPLC (ÄKTA-FPLC, Amersham Pharmacia). Les protéines de lactosérum ont été solubilisées (10 mg.mL⁻¹) dans un tampon Tris-HCl à 50 mM, pH 8,0 et injectées sur la colonne préalablement équilibrée avec ce même tampon. La lactoferrine a été éluée avec un gradient linéaire croissant de 0–1,0 M de NaCl dans le tampon Tris-HCl de 50 mM, pH 8,0 (débit est de 1 mL.min⁻¹). Par cette méthode automatisée, trois fractions ont été obtenues : F1, F2 et F3 (Figure 22). Après dialyse et lyophilisation, seule la fraction F3 présentait la coloration rose-rouge caractéristique de la Lf, qui est éluée à 1,0 M NaCl. Les fractions ont été analysées par SDS-PAGE (Figure 23). Cette méthode chromatographique permet d'obtenir de la Lf avec une pureté supérieure à 95% en quantité importante : 254 mg de Lf pure ont été ainsi préparés à partir de 5 L de lait frais.

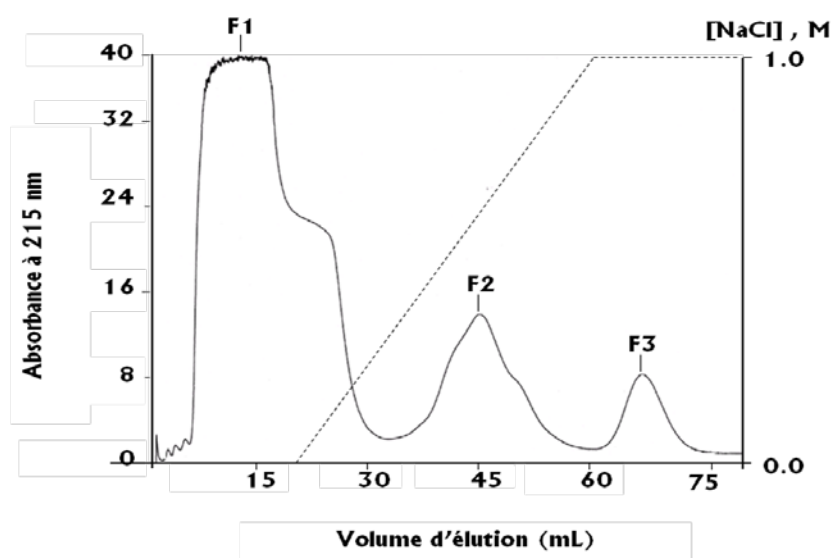


Figure 22.

Profil chromatographique des protéines lactosériques obtenu par ÄKTA-FPLC d'échange de cations sur colonne HiTrap CM. La phase mobile est constituée de 50 mM de tampon Tris-HCl pH 8,0 et un gradient linéaire de 0 à 1.0 M de NaCl est appliqué pendant 48 min à un débit de 1 mL/min. β -LG : β -lactoglobuline ; α -LA : α -lactalbumine ; BSA: sérumalbumine bovine.

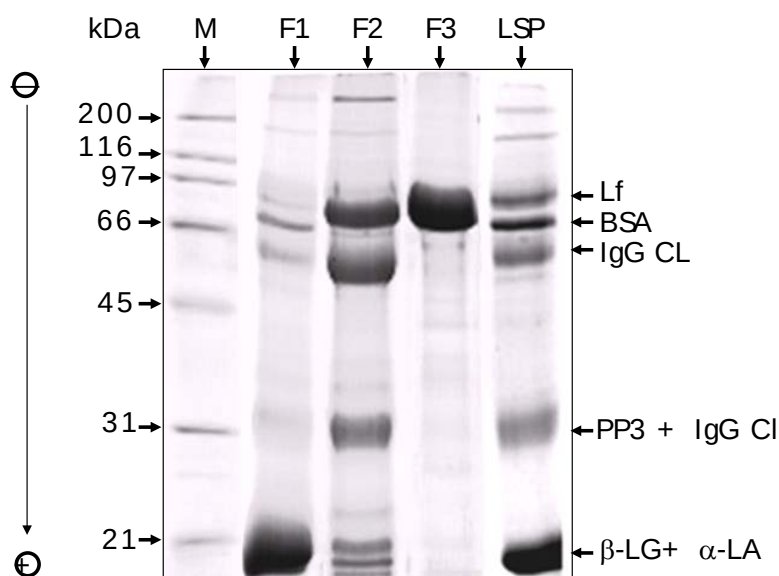


Figure 23.

Caractérisation électrophorétique (SDS-PAGE 15%) des fractions F1-F3 collectées lors du fractionnement ÄKTA-FPLC des protéines lactosériques. Des quantités de 25 μ g de protéines ont été chargées dans le gel. Les protéines ont été révélées par le bleu de Coomassie R250. M : marqueurs de masse moléculaire ; IgG : immunoglobulines ; CL : chaîne lourde ; Cl : chaîne légère ; β -LG : β -lactoglobuline ; α -LA : α -lactalbumine ; BSA : sérumalbumine bovine ; LSP : protéines de lactosérum avant purification.

2. Hydrolyses enzymatiques de la lactoferrine en conditions ménagées

2.1 Hydrolyse de la lactoferrine par la trypsine pour la génération de ses deux lobes

Les résultats présentés dans le chapitre 3 montrent que la Lf entière est reconnue par le récepteur LSR. Dans le but de déterminer si l'interaction potentielle entre le récepteur LSR et la Lf impliquait ou non un domaine structural (N-terminal ou C-terminal) de la Lf, nous avons réalisé une hydrolyse ménagée de la Lf, de façon à obtenir les deux domaines structuraux sous forme isolée. En effet, Mason *et al.* (1987) ont montré qu'il était possible par hydrolyse ménagée de la Lf par la trypsine, de générer les deux lobes tout en conservant leur structure tridimensionnelle (le repliement des deux lobes peut jouer un rôle important dans la reconnaissance). Dans notre étude, afin de libérer les deux lobes N- et C-terminaux de la Lf bovine sans les dénaturer, nous avons réalisé un travail préalable d'optimisation de l'hydrolyse tryptique ménagée de la protéine. Les conditions d'hydrolyse recherchées devaient permettre de produire de grands polypeptides avec un minimum de petits fragments. Nous avons ainsi utilisé 3 conditions de rapport enzyme/substrat (E/S) avec des temps d'incubation compris entre 0 et 10 h et analysé les profils électrophorétiques obtenus (Figure 24).

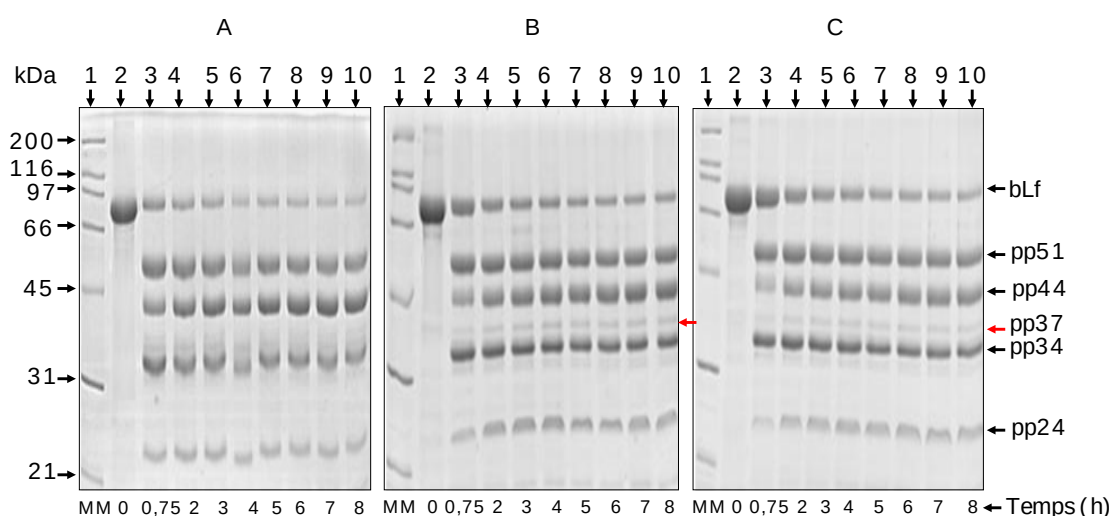


Figure 24.

Analyse électrophorétique (SDS-PAGE 15%) des hydrolysats tryptiques ménagés de la lactoferrine bovine (bLf). La Lf (1 mg.mL^{-1}) a été incubée avec la trypsine à 37°C selon différents rapports massiques enzyme/substrat (puits 2-10). A : E/S = 1:50 ; B : E/S = 1:200 ; C : E/S = 1:384. Des volumes réactionnels de $25 \mu\text{L}$ ont été prélevés à différents temps d'incubation et mélangés volume à volume avec du tampon d'échantillon pour SDS-PAGE et chauffé pendant 3 min à 100°C avant analyse électrophorétique. Des marqueurs de masses moléculaires ont été déposés dans les premiers puits de chaque gel. Le fragment de 37 kDa (pp37 ; flèche rouge) est généré pour des rapports E/S de 1/200 et 1/384, mais n'est pas mis en évidence avec E/S = 1/50. La coloration a été réalisée au bleu de Coomassie R250.

Les profils d'hydrolyse montrent qu'à un rapport E/S de 1:50, la Lf est clivée en trois principaux polypeptides (pp) de masse moléculaire apparente de 51, 44 et 34 kDa et en un fragment mineur de 24 kDa (Figure 24A). Ces fragments sont respectivement désignés pp51, pp44, pp34, pp24. Avec un rapport E/S de 1:50, ces fragments résistent à l'action de la trypsine pendant 10 h d'incubation. Lorsque le rapport E/S est de 1:200, nous observons la génération d'un autre fragment de masse moléculaire apparente de 37 kDa en plus des quatre autres fragments déjà cités. Par ailleurs, le fragment pp24 est obtenu en plus grande quantité à ce rapport qu'avec le rapport E/S précédent (Figure 24B). Dans le cas d'un rapport E/S de 1:384, les profils d'hydrolyse sont similaires à ceux obtenus avec E/S = 1:200 (Figure 24C).

Ainsi, afin d'obtenir une production maximale de grands fragments tout en limitant leur hydrolyse subséquente, nous avons retenu des conditions de rapport E/S = 1:50 et de durée de réaction de 4 h à 37°C pour générer les parties N-lobe et C-lobe de la Lf comme l'avaient montré Mason *et al.* (1987). Le degré de saturation en fer de la lactoferrine est également un facteur important pouvant interférer avec le processus d'hydrolyse : le degré d'hydrolyse diminue en effet lorsque la saturation en fer augmente (Brines & Brock, 1983). La Lf que nous avons utilisée dans nos expériences renfermait des teneurs en fer de 19% (valeur calculée à partir du rapport A_{465}/A_{280}). La Figure 25 montre la génération des fragments principaux qui ont été séparés par SDS-PAGE, électrotransférés sur membrane de PVDF puis identifiés par microséquençage d'Edman et par spectrométrie de masse.

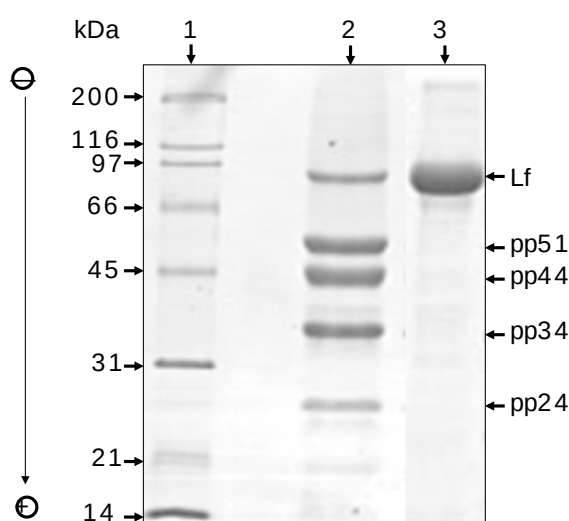


Figure 25.

Profil électrophorétique (SDS-PAGE 15%) des fragments produits par hydrolyse trypsique ménagée de la Lf bovine. La Lf (1 mg.mL^{-1}) a été incubée avec la trypsine à 37°C selon un rapport massique E/S de 1:50. Un volume réactionnel de $25 \mu\text{L}$ a été prélevé après 4 h et déposé sur SDS-PAGE (puits 2). Des marqueurs de masses moléculaires ont été déposés dans le premier puits et la Lf non hydrolysée dans le puits 3. La coloration a été réalisée au bleu de Coomassier R250.

3. Séquençage des fragments générés

3.1 Séquençage chimique selon la méthode d'Edman

Les résultats du microséquençage chimique des quatre grands fragments de Lf générés par hydrolyse trypsique ménagée sont présentés dans le Tableau 6. La détermination de la région N-terminale de pp51 débute au résidu 285 de la Lf, la séquence **SFQLFGXPP-** déterminée correspondant à la région Ser²⁸⁵-Pro²⁹³ de la Lf mature. Ainsi, le peptide pp51 pourrait être le fragment C-terminal Ser²⁸⁵-Arg⁶⁸⁹. Baker *et al.* (1987) ont isolé un fragment de 51 kDa et déterminé que ce fragment contenait la totalité du C-lobe ainsi que 15% de l'extrémité C-terminale du N-lobe et le peptide connecteur des deux lobes formant une hélice α . Le peptide pp44 correspond aussi à la région C-lobe de la Lf, mais sans le peptide de connexion, la séquence identifiée **VVWCAVGPEE-** correspondant à la région Val³⁴⁵-Glu³⁵⁴. Le peptide pp44 pourrait ainsi correspondre à la région C-terminale Val³⁴⁵-Arg⁶⁸⁹. Ceci est en accord avec les travaux de Baker *et al.* (1987) qui ont montré qu'un peptide de masse moléculaire 44 kDa correspondait au C-lobe dépourvu du peptide connecteur des deux lobes. Quant aux deux autres grands fragments, pp34 et pp24, ils correspondent au N-lobe de la Lf. La séquence N-terminale de pp34 **APRKNV-** montre que ce fragment est un peptide N-terminal de la Lf. Il pourrait correspondre de façon hypothétique à la région Ala¹-Arg²⁸⁴ dans la mesure où cette région correspond à une masse moléculaire de 34 kDa. Le fragment pp24 correspond à un peptide débutant au résidu 122 de la Lf bovine, sa séquence N-terminale étant **SAGXIIPMG-**, soit Ser¹²²-Gly¹³⁰. Il pourrait correspondre à la région Ser¹²²-Arg²⁸⁴ de la Lf mature.

Tableau 6. Identification des fragments pp51, pp44, pp34 et pp24 de la lactoferrine obtenus par hydrolyse trypsique ménagée.

Fragment	N-terminale Sequence (Edman Sequencing)	Region (MS/MS)	Lobe
pp51	SFQLFGXPP-	Ser ²⁸⁵ -Arg ⁶⁸⁹	C-lobe
pp44	VVWCAVGPEE-	Val ³⁴⁵ -Arg ⁶⁸⁹	C-lobe
pp34	APRKNV-	Ala ¹ -Lys ^{280/282} /Arg ²⁸⁴	N-lobe
pp24	SAGXIIPMG-	Ser ¹²² -Lys ^{280/282} /Arg ²⁸⁴	N-lobe

3.2 Identification par spectrométrie de masse

Les peptides pp51 et pp44 correspondant au C-lobe de la Lf ont été hydrolysés par la trypsine puis leur séquence a été déterminée par fragmentation MS/MS de leurs peptides tryptiques. Le taux de recouvrement des séquences respectives de pp51 et pp44 a été déterminé par identification des fragments au moyen du logiciel myProms. Ainsi, 19 peptides issus de pp51 ont été détectés et identifiés par MS/MS (Annexe 1) et permettent de confirmer que pp51 correspond bien à la région C-lobe Ser²⁸⁵-Arg⁶⁸⁹. De même, 15 peptides de pp44 ont été détectés et ont permis de déterminer que pp44 correspond bien à la région C-lobe Val³⁴⁵-Arg⁶⁸⁹ (Annexe 2). La différence entre les deux peptides pp51 et pp44 est que pp44 ne contient pas ni peptide de connexion ni aucun résidu du N-lobe, contrairement à pp51 (Tableau 6) (Baker *et al.*, 1987).

Les peptides du N-lobe pp34 et pp24 ont été plus difficiles à identifier dans la mesure où de nombreux résidus Arg et Lys, sites spécifiquement reconnus par la trypsine, sont présents dans la zone correspond à la région C-terminale du N-lobe (sites potentiels d'hydrolyse par la trypsine soulignés dans les annexes 3 et 4). L'utilisation de la trypsine aurait généré des peptides trop petits, et donc indétectables par spectrométrie de masse dont la limite de détection est de 400 Da environ. La chymotrypsine a donc été choisie pour hydrolyser ces deux peptides avant analyse MS/MS des fragments chymotryptiques. Ainsi, 15 peptides ont été détectés dans le cas de pp34 et 6 peptides dans le cas de pp24 (Annexe 3 et 4). En combinant l'analyse par microséquençage chimique des quatre fragments et l'analyse par spectrométrie de masse, et en tenant compte des spécificités de coupure de la trypsine et de la chymotrypsine, il a été possible de déterminer l'extrémité C-terminale de pp34 comme celle de pp24 à plus ou moins 4 résidus près. En effet, le peptide chymotryptique *KLLSKAQEKF* identifié pour les deux fragments tryptiques pp34 et pp24 correspond à la région 269-278 de la Lf. Au-delà du résidu Phe-278 et avant le résidu Ser-285 (résidu N-terminal de pp51 correspondant au C-lobe) se trouvent donc 3 sites possibles qui auraient pu être la cible de la trypsine lors de la génération de pp34 ou pp24 : Lys-280, Lys-282 et Arg-284. Il existe ainsi 3 possibilités pour pp34 : Ala¹-Lys²⁸⁰, Ala¹-Lys²⁸² et Ala¹-Arg²⁸⁴ et 3 possibilités pour pp24 : Ser¹²²-Lys²⁸⁰, Ser¹²²-Lys²⁸² et Ser¹²²-Arg²⁸⁴ (Tableau 6 et Figure 26).

Dans la littérature, deux peptides correspondant au N-lobe de masses moléculaires apparentes similaires de 34 kDa ont été supposés correspondre soit à la séquence 1-284 de la Lf (Sitaram & Mcabee, 1997) soit à la séquence 1-280 (Superti *et al.*, 2001), confirmant que

l'identification précise de l'extrémité C-terminale des fragments correspondant au N-lobe reste difficile.

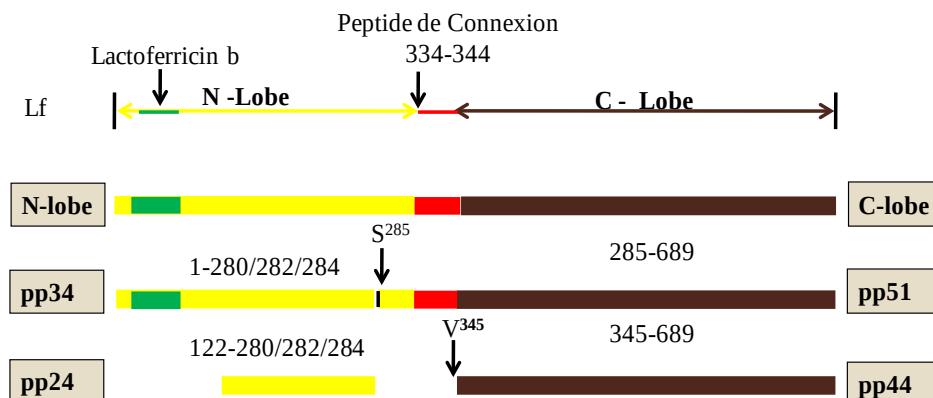


Figure 26.

Représentation schématique de l'hydrolyse ménagée de la lactoferrine bovine par la trypsine, générant les peptides pp24, pp34, pp44 et pp51. Les segments correspondant aux N-lobe et C-lobe ont été déterminés par microséquençage chimique d'Edman et par spectrométrie de masse MS/MS. Le N-lobe et C-lobe sont en jaune et bleu, respectivement. Le segment rouge représente le peptide connectant les deux lobes. Le segment vert représente la région correspondant à la lactoferricine b (adapté de Bellamy et al., 1992b).

4. Purification des fragments de la lactoferrine

4.1. Purification des fragments du N-lobe

Nous avons purifié les fragments du N-lobe de la Lf par ÄKTA-FPLC sur la colonne analytique échangeuse de cations TSK SP-5PW (Figure 27) et analysé les 3 fractions obtenues en SDS-PAGE (Figure 28).

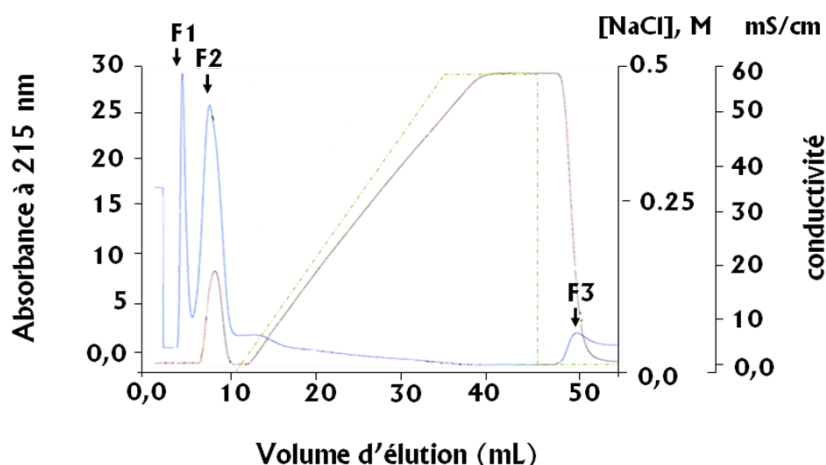


Figure 27.

Profil chromatographique ÄKTA-FPLC d'échange de cations sur colonne TSK SP-5PW de l'hydrolysate trypsique ménagé de lactoferrine. Une quantité de 8 mg de peptides (2 mL) a été chargée sur la colonne équilibrée avec 0.05 M de phosphate de sodium, pH 7,0. Un double gradient linéaire de 0 à 0,5 M de NaCl et de 0 à 250 mM de NH_4OH a été appliqué pendant 25 min à un débit de 1 mL/min. La courbe continue de couleur marron indique le gradient réel de force ionique déterminé par mesure de la conductivité de la phase mobile en sortie de colonne et la courbe verte en pointillés indique le gradient linéaire théorique de NaCl.

L'analyse électrophorétique (SDS-PAGE) des fractions collectées indique que les deux fragments correspondant au N-lobe, pp34 et pp24, sont principalement élués dans la fraction F1, c'est-à-dire dans le volume mort de la colonne (Figure 28). Etant donné que l'hydrolyse enzymatique (réalisée à pH 8,2) est stoppée par abaissement du pH à 3, la présence de sels augmente significativement la force ionique de l'échantillon et donc de la phase mobile après l'injection de l'échantillon sur la colonne (pic de force ionique en Figure 27). De ce fait, les protéines interagissant faiblement avec la phase stationnaire ne sont pas retenues sur la colonne ; c'est le cas des fragments pp34 et pp24. La fraction F2, non retenue également sur la colonne, contient des reliquats de pp34 et pp24 ainsi que le fragment pp44 du C-lobe. Cette observation est peut être liée au fait qu'il existe une interaction entre le fragment pp34 (et probablement pp24) et le fragment pp44 du C-lobe (Legrand *et al.*, 1986), ce qui expliquerait pourquoi les polypeptides du N-lobe sont retrouvés dans deux fractions distinctes. Le fragment pp51 ainsi que de la Lf résiduelle ne sont retrouvés qu'en très petite quantité dans F3, c'est-à-dire dans le lavage de la colonne par 0,5 M de NaCl (Figure 28). Une concentration de 0,5 M de NaCl se révèle donc insuffisante pour éluer la Lf et pp51, tous deux interagissant fortement avec la phase stationnaire.

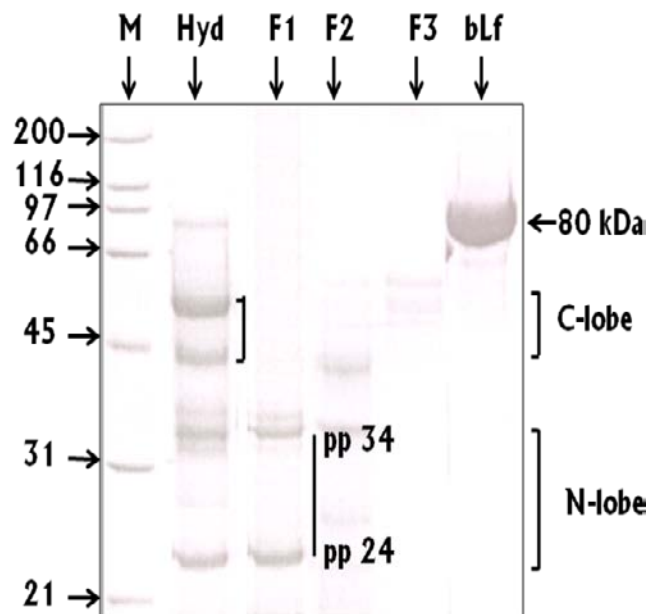


Figure 28.

Caractérisation électrophorétique (SDS-PAGE à 15% d'acrylamide) des fractions collectées après séparation chromatographique de l'hydrolysate trypsinique ménagé de lactoferrine. *M* : marqueurs de masses moléculaires ; *Hyd* : hydrolysate trypsinique obtenu après 10 h de réaction à 37°C et avec $E/S = 1/385$ (dépôt : 15 µg) ; *F2*: dépôt de 12 µg ; *F3*: dépôt de 9 µg ; *F4*: dépôt de 5 µg ; *bLf* : lactoferrine bovine (dépôt : 15 µg). Les protéines sont révélées par coloration au nitrate d'argent. .

Afin de retenir le N-lobe sur la colonne et d'éluer pp51 en fin de gradient, l'hydrolysate trypsinique a été dialysé et la concentration finale en NaCl dans la phase mobile a été augmentée (1,0 M au lieu de 0,5 M). Cependant, comme précédemment, les fractions *F1* et *F2* ont été éluées avant l'application du gradient de NaCl et on observe encore un pic de force ionique au moment de l'élution de *F2* malgré la dialyse effectuée (Figure 29). Par rapport à l'expérience précédente, le fragment pp34 est mieux retenu sur la colonne et une partie significative est élue dans la dernière fraction de lavage (*F4*). Néanmoins, le fragment pp34 co-élue avec pp51 et la Lf résiduelle (Figure 30). Il n'est donc jamais obtenu pur.

Nous avons donc choisi de garder les conditions expérimentales précédentes (c'est-à-dire sans dialyser l'hydrolysate), car les fragments correspondant au N-lobe sont co-élus dans la même fraction avec une très bonne pureté.

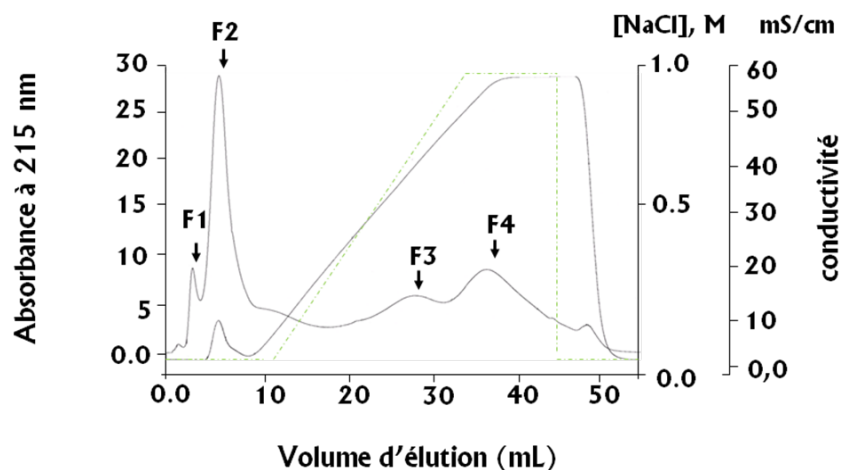


Figure 29.

Profil chromatographique ÄKTA-FPLC d'échange de cations sur colonne TSK SP-5PW de l'hydrolysats tryptique ménagé de lactoferrine traité par dialyse. Une quantité de 6 mg de peptides (2 mL) est chargée sur la colonne équilibrée avec 0.05 M de phosphate de sodium, pH 7,0. Un double gradient linéaire de 0 à 1,0 M de NaCl et de 0 à 250 mM de NH_4OH est appliqué pendant 25 min à un débit de 1 mL/min. La courbe continue de couleur marron indique le gradient réel de force ionique déterminé par mesure de la conductivité de la phase mobile en sortie de colonne et la courbe verte en pointillés indique le gradient linéaire théorique de NaCl.

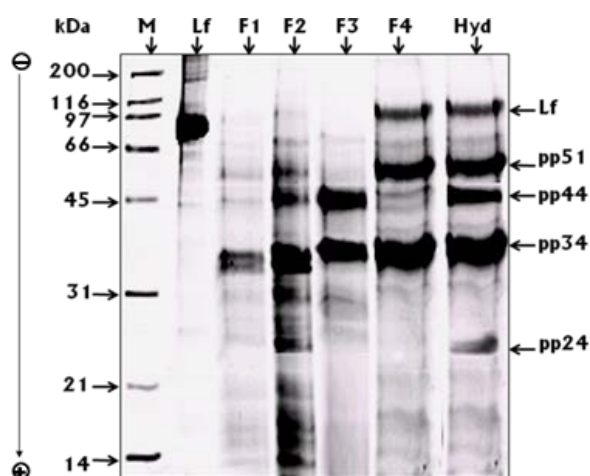


Figure 30.

Caractérisation électrophorétique (SDS-PAGE 15 %) des fractions collectées après séparation chromatographique de l'hydrolysats tryptique ménagé de lactoferrine et dialyse. M : marqueurs de masses moléculaires ; Hyd : hydrolysats tryptique obtenu après 10 h de réaction à 37°C et avec E/S = 1/385 (dépôt : 15 μg) ; F2: dépôt de 12 μg ; F3: dépôt de 9 μg ; F4: dépôt de 5 μg ; bLf : lactoferrine bovine (dépôt : 15 μg). Les protéines sont révélées au bleu de Coomassie R250.

4.2. Purification du C-lobe de la lactoferrine sur colonne C4

Comme le montre le paragraphe précédent, la partie C-lobe est difficile à purifier à partir de l'hydrolysats de Lf par échange de cations. Aussi, nous avons opté pour une séparation HPLC en phase inversée (RP-HPLC) sur colonne C18, même si ce type de

chromatographie présente l'inconvénient d'un risque de dénaturation des protéines (emploi de solvant tel que l'acétonitrile, de conditions de pH acide et de pression 10 fois plus élevée). Par RP-HPLC, après optimisation du gradient d'acétonitrile, le fragment pp51 est élué dans l'épaulement d'un pic (Figure 31), la fraction collectée (F3) montre néanmoins une excellente pureté (Figure 32).

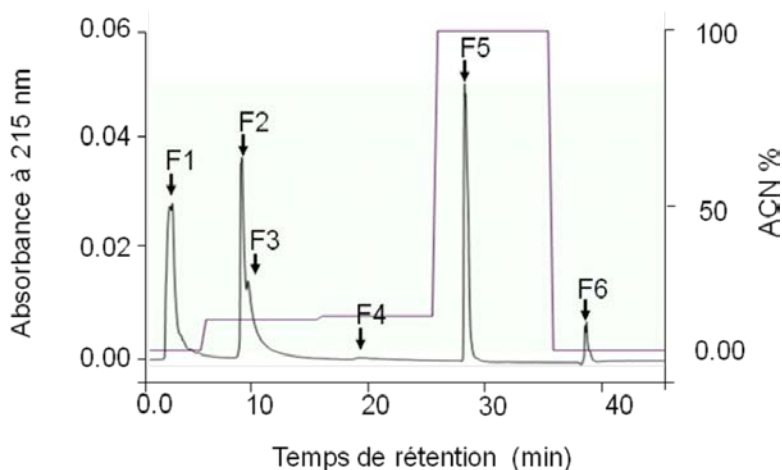


Figure 31.

Chromatographie HPLC en phase inversée de l'hydrolysate tryptique en conditions ménagées de la Lf. Une quantité de 4 mg d'échantillon est chargée sur la colonne Nucleosil C4. Un gradient non linéaire d'acétonitrile (ACN) est appliqué en présence de 0,1% d'acide trifluoroacétique (TFA) à un débit de 0,25 mL/min. Les fractions F1 à F6 ont été collectées.

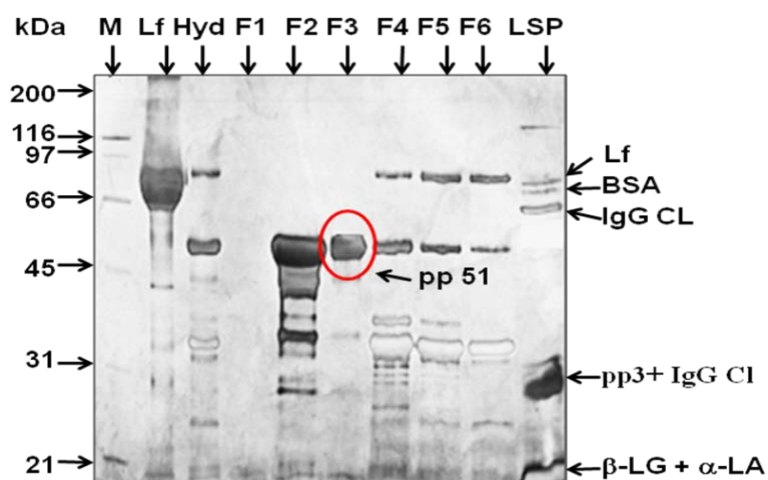


Figure 32.

Profil électrophorétique (SDS-PAGE à 15% d'acrylamide) des fractions F1-F6 collectées lors du fractionnement RP-HPLC de l'hydrolysate tryptique de lactoferrine (Lf). Des quantités de 20 µg de protéines sont chargées dans le gel (volumes de 25 µL). Les protéines sont révélées par le nitrate d'argent. M : marqueurs de masses moléculaires ; IgG : Immunoglobulines G ; CL : chaîne lourde ; Cl : chaîne légère ; β-LG : β-lactoglobuline ; α-LA : α-lactalbumine ; BSA : sérumalbumine bovine ; PP3 : composant-3 des protéoses-peptones ou lactophorine ; LSP : protéines de lactosérum ; Hyd : hydrolysate tryptique ménagé de Lf.

5. Hydrolyse trypsique/chymotrypsique pour la génération de petits peptides de Lf

Dans un deuxième volet de notre travail, nous avons été amenés à rechercher si des fragments peptidiques plus courts de la Lf étaient eux-aussi capables d'interagir avec le LSR. Il a donc été nécessaire d'hydrolyser la Lf de manière beaucoup plus poussée afin de générer un hydrolysats ne contenant que des petits peptides et exempt de protéine ou de N- et C-lobes résiduels pouvant interférer dans les tests d'interaction avec le LSR.

Un hydrolysats trypsique de Lf a tout d'abord obtenu après réaction à 37°C pendant 4 h et avec un rapport E/S de 1:50. Un temps de réaction plus long était inutile, car la Lf est très résistante à l'attaque trypsique, tout comme ses parties N-lobe et C-lobe (Figure 33). L'hydrolysats trypsique obtenu a été, à son tour, soumis à une seconde hydrolyse enzymatique. La seconde enzyme choisie est la chymotrypsine que nous avons fait agir sur l'hydrolysats trypsique pendant 15 h, avec un rapport E/S de 1:200.

L'analyse électrophorétique montre que dans ces conditions, les peptides pp51 et pp24 sont complètement hydrolysés tandis que pp34 n'est clivé qu'en partie et que pp44 reste en quantité significative dans le volume réactionnel (Figure 33). A côté de ces grands fragments résistants à l'attaque enzymatique, de petits peptides sont toutefois générés (Figure 33).

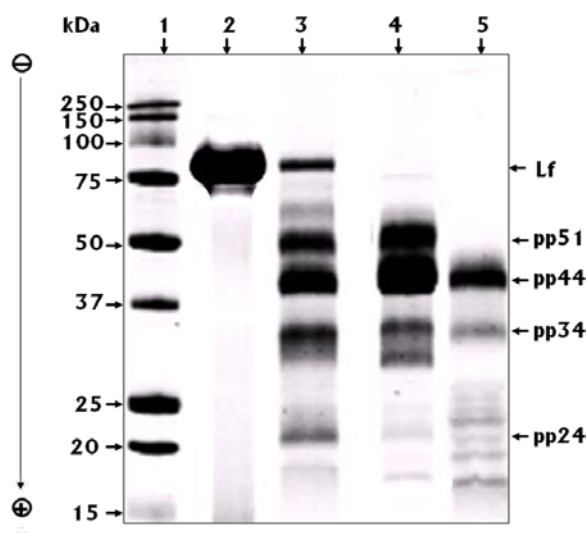


Figure 33.

Profil électrophorétique (SDS-PAGE 15%) des différents types d'hydrolysats (Hyd) de la lactoferrine (Lf). Les pistes 3 et 4 caractérisent l'hydrolyse de la Lf après 4 h et 15 h d'incubation avec la trypsine (E/S = 1:50). La piste 5 caractérise l'hydrolyse chymotrypsique réalisée à partir de l'hydrolysats trypsique de Lf à un rapport massique chymotrypsine/peptides de 1:200 après 15 h de réaction. Un marqueur de masse moléculaire a été déposé dans le premier puits et la Lf utilisée pour l'hydrolyse double dans le second puits. M : marqueur de masses moléculaires. La coloration a été réalisée au bleu de Coomassie R250.

Les plus grands fragments sont alors séparés des petits peptides par ultrafiltration/centrifugation dans des cellules Amicon de seuil de coupure 10 kDa et 3 kDa. L'analyse des peptides retrouvés dans le filtrat a été réalisée par spectrométrie de masse (ESI-MS et MS2). La liste de ces peptides est présentée en Annexe 5.

Il était également important de prendre en compte le fait que la Lf et ses produits d'hydrolyse sont glycosylés (Annexe 6). En effet, la Lf bovine possède 5 sites de N-glycosylation et les chaînes N-glycanniques sont de type oligomannosidique ou encore de type complexe N-acétyllactosaminique (Pierce *et al.*, 1991). Les sites Asn-233 et Asn-545 sont liés à des glycannes de type oligomannosidiques uniquement tandis que les sites Asn-368 et Asn-476 sont liés à des glycannes des deux types (Hutchens *et al.*, 1994). Plus récemment, un cinquième site de la Lf bovine a été identifié comme étant glycosylé ; il s'agit du site Asn-281 (Wei *et al.*, 2000). Ces chaînes glycanniques pouvant jouer un rôle dans l'interaction avec le récepteur LSR, nous avons préparé une fraction dépourvue de glycopeptides de ce double hydrolysate, afin d'évaluer si les structures glycanniques étaient déterminantes pour l'interaction. L'élimination des glycopeptides a été réalisée par précipitation à l'éthanol froid.

6. Discussion

Les technologies de séparation sur membrane (ultrafiltration ; Maynard *et al.*, 1989) et de chromatographies d'échange d'ions (Fee *et al.*, 2006), d'interactions hydrophobes (Yoshida, 1989) et d'immunoaffinité (Tu *et al.*, 2001) sont les technologies les plus utilisées pour préparer la Lf à grande échelle. Dans un premier temps, nous avons utilisé la méthode de Sharma *et al.* (1999) qui combine la chromatographie d'échange de cations (résine CM Sephadex C-50) et la filtration sur gel (résine Sepharose G-200) et nous avons obtenu une Lf pure à 90%, un taux de pureté inférieur au taux requis pour la suite de l'étude.

Dans un second temps, nous avons utilisé la technologie semi-automatique ÄKTA-FPLC. Le fait que le pH isoélectrique de la Lf soit basique (environ 9,0) a été mis à profit pour purifier la Lf par chromatographie d'échange de cations sur colonne HiTrap CM. Nous avons ainsi pu préparer rapidement de la Lf bovine pure à plus de 95% de pureté en une seule étape, pour un rendement d'environ 50 mg de Lf par litre de lait. Après purification, l'objectif a été d'hydrolyser la Lf pour séparer la partie N-lobe de la partie C-lobe afin de déterminer quel domaine structural est impliqué dans l'interaction entre la Lf et le LSR. Une hydrolyse

ménagée a été optimisée pour libérer autant que possible les domaines N- et C-terminaux. Ces deux domaines sont reliés entre-eux par un peptide connecteur formant une hélice α (Baker & Baker, 2004). L'hydrolyse par la trypsine résulte en la séparation des deux domaines (Mason & Brown 1987). L'hydrolyse tryptique de la Lf produit des fragments résistants à l'attaque de la trypsine *in vitro* (Brock *et al.*, 1976) comme *in vivo* après ingestion (Kuwata *et al.*, 2001). Dans nos conditions expérimentales, nous avons observé également que les fragments correspondant aux domaines N-lobe et C-lobe (essentiellement pp34 et pp44) sont résistants à l'attaque tryptique et que la Lf bovine est également très résistante à l'hydrolyse dans la mesure où la trypsine n'hydrolyse pas complètement la Lf après 10 h d'incubation pour des rapports E/S variables de 1:50, 1:200 et 1:384. Cette résistance à l'hydrolyse nous n'a permis d'hydrolyser les grands fragments complètement et donc les grands fragments sont séparés des plus petits par simple centrifugation en utilisant des filtres de seuil de coupure égal à 10 kDa. Plusieurs études ont rapporté que la Lf et ses fragments de masse moléculaire supérieure à 20 kDa sont stables dans le tractus gastro-intestinal vis-à-vis de la dégradation protéolytique (Harada *et al.*, 1999 ; Kuwata *et al.*, 2001). Par ailleurs, nous avons observé que pp44 (C-lobe) est un peu plus résistant que pp34 (N-lobe) envers la trypsine. Cette différence pourrait être attribuée à la présence de ponts disulfures plus nombreux pour pp44 que pour pp34 ainsi qu'à la présence de chaînes N-glycanniques (Legrand *et al.*, 1988). La révélation PAS a montré que les 4 fragments pp51, pp44, pp34 et pp24 sont glycosylés.

La séparation des deux lobes a été réalisée par chromatographie ÄKTA-FPLC d'échange de cations, technique non dénaturante qui permet ainsi de conserver les propriétés structurales natives du N-lobe, notamment (le C-lobe n'a pu être isolé par cette technique). Cependant, il n'a pas été possible de séparer pp34 et pp24, ces fragments provenant tous deux du N-lobe ayant la propriété de s'associer entre-eux (Legrand *et al.*, 1986). Le fragment pp51 correspondant au domaine C-lobe a été, quant à lui, purifié par HPLC en phase inversée. Néanmoins, un faible pourcentage d'acétonitrile (13,6%) est utilisé pour son élution, ce qui peut permettre sa purification dans des conditions faiblement dénaturantes.

CHAPITRE 2

Purification et caractérisation physico-chimique du récepteur LSR

Jusqu'à ce jour, toutes les études concernant le LSR ont été réalisées *in vivo* ou *in vitro* sur des formes non purifiées de LSR : cellules, membranes ou membranes enrichies en LSR. Par exemple, la plupart des études concernant l'interaction LSR / lipoprotéines (CM, VLDL, LDL) ou la protéine RAP ont été réalisées sur des cellules de fibroblastes (Yen *et al.*, 1994) alors que les études de ligand blot ont été réalisées sur des extraits membranaires de cellules hépatiques enrichies en LSR (Mann *et al.*, 1995; Troussard *et al.*, 1995). Pour une meilleure compréhension des mécanismes fonctionnels de ce récepteur, il était nécessaire d'isoler ce récepteur sous forme purifiée, de façon à développer des approches de type structure/fonction.

1. Purification du LSR à partir de membrane plasmique de foie de rat

Nous avons développé une méthode chromatographique afin de purifier en une seule étape le LSR à partir de préparations membranaires enrichies en LSR. Les protéines membranaires enrichies en LSR ont été préparées à partir de foies perfusés de rats âgés de 9 à 12 semaines, suivant le protocole développé par Mann *et al.* (1995), puis elles ont été fractionnées par chromatographie d'échange d'anions avec la technologie ÄKTA-FPLC (Figure 34).

Les différentes fractions collectées ont été analysées par électrophorèse SDS-PAGE. En particulier, les profils des fractions F3 et F4 montrent 3 bandes protéiques de masses moléculaires apparentes de 68, 64 et 58 kDa (Figure 35). Ces masses apparentes sont similaires à celles rapportées dans la littérature pour les 3 sous-unités du LSR, respectivement α , α' et β (Yen *et al.*, 1999 ; Mesli *et al.*, 2004). Un très bon degré de pureté est obtenu dans la fraction F4. Cependant, une bande est détectée par le bleu de Coomassie au niveau du dépôt et pourrait correspondre à du LSR agrégé, ce dernier étant difficilement dissocié par l'action combinée du SDS et du β -mercaptoéthanol.

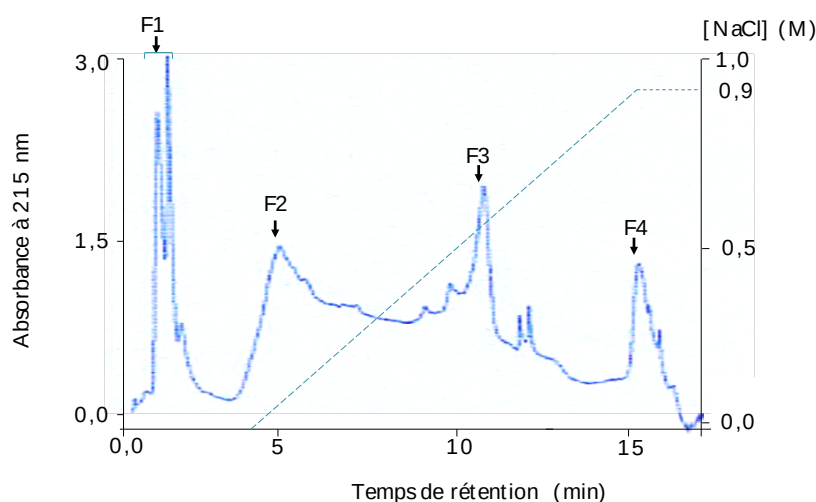


Figure 34.

Profil chromatographique obtenu lors de la purification du LSR à partir de membrane hépatique par échange d'anions sur colonne Mono Q HR5/5 connectée à un système ÄKTA-FPLC. La colonne est équilibrée avec du tampon Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, contenant 13 mM de CHAPS, 2 mM d'EDTA et 150 mM de NaCl (tampon A). Une quantité de protéines totales de 3,17 mg a été chargée sur la colonne. Un gradient linéaire de 150 à 900 mM de NaCl dans le tampon A est appliqué pendant 14 min. Le débit est $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ et l'absorbance est mesurée à 280 nm.

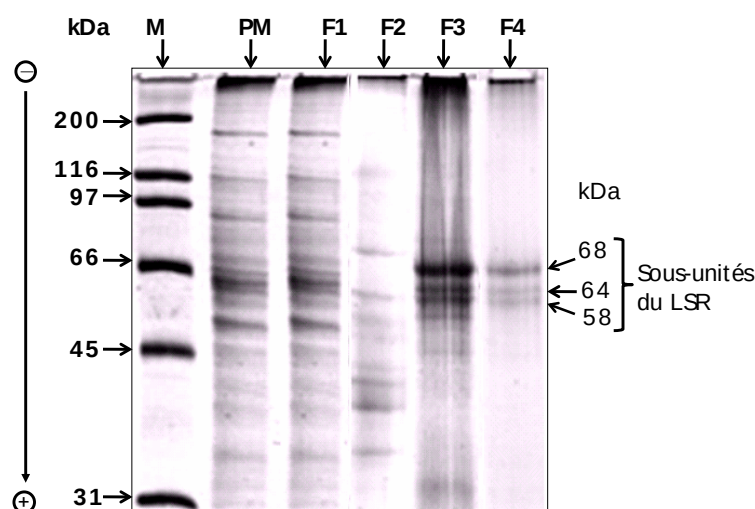


Figure 35.

Profil électrophorétique (SDS-PAGE à 12% d'acrylamide) des fractions chromatographiques F1 à F4 collectées lors de la séparation des protéines de membranes hépatiques par ÄKTA-FPLC. Des quantités de $20 \mu\text{g}$ de protéines ont été chargées dans le gel. Les protéines sont détectées par le bleu de Coomassie. PM : protéines de membrane hépatique ; M : marqueur de masses moléculaires.

2. Immunodétection du LSR par Western blot

Les protéines de la fraction F4 présumées être les sous-unités du LSR ont été identifiées par la technique *Western blot* avec des anticorps polyclonaux de lapin, et ce après électrophorèse en conditions réductrices ou non réductrices. En conditions non réductrices, le

profil de SDS-PAGE présente après révélation une bande de masse moléculaire apparente de 240 kDa environ, compatible avec la masse moléculaire présumée du LSR, et reconnue par les anticorps. En conditions réductrices, l'analyse montre que 2 bandes de masses moléculaires apparentes de 58 et 68 kDa sont immunoprécipitées, ce qui permet de les identifier comme étant bien les sous-unités du LSR (Figure 36A). La réaction est plus intense avec la sous-unité 68 kDa comparativement aux sous-unités de masses moléculaires inférieures. Le contrôle de pureté réalisé par révélation au nitrate d'argent ne montre pas de contamination par d'autres protéines (Figure 36B). Finalement, en utilisant notre méthode chromatographique, une quantité de 0,11 mg de LSR d'un bon degré de pureté a pu être obtenue par foie de rat.

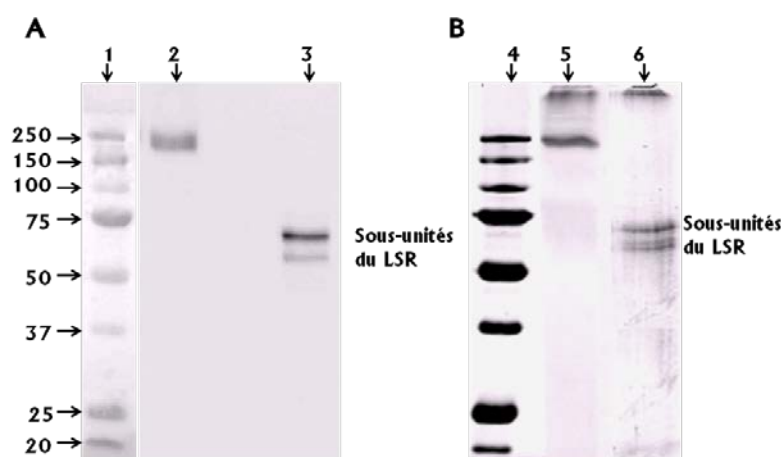


Figure 36.

Immunodétection du LSR purifié. (A) Identification des sous-unités du LSR par Western blot (puits 2 et 3) et (B) contrôle électrophorétique de pureté de F4 par révélation au nitrate d'argent (puits 5 et 6). L'électrophorèse SDS-PAGE est réalisée avec un gel à 10% d'acrylamide en présence de SDS et de β -mercaptoéthanol (puits 3,6) et en absence de β -mercaptoéthanol (puits 2 et 5). Une quantité de 20 μ g protéine a été déposée sur le gel. Après électrotransfert sur membrane en PVDF, la membrane a été traitée par un agent bloquant (3% de sérumalbumine bovine) puis incubée avec les anticorps anti-LSR de lapin. Finalement, les protéines immunoprécipitées ont été révélées par des anticorps anti-IgG conjugués à une peroxydase. Puits 1 et 4 : marqueurs de masses moléculaires.

3. Caractérisation du LSR par électrophorèse bidimensionnelle 2D-PAGE

Afin de rechercher la présence d'éventuelles isoformes, une électrophorèse bidimensionnelle a été réalisée. Elle combine une isoélectrofocalisation (IEF) dans un gradient de pH de 3 à 10 et une SDS-PAGE à 10% d'acrylamide. Le profil bidimensionnel de la fraction F4 contenant les sous-unités du LSR montre 4 spots majeurs de protéines, les deux premiers présentant une masse moléculaire apparente de 68 kDa et les deux suivants des masses moléculaires apparentes respectives de 64 et 58 kDa (Figure 37).

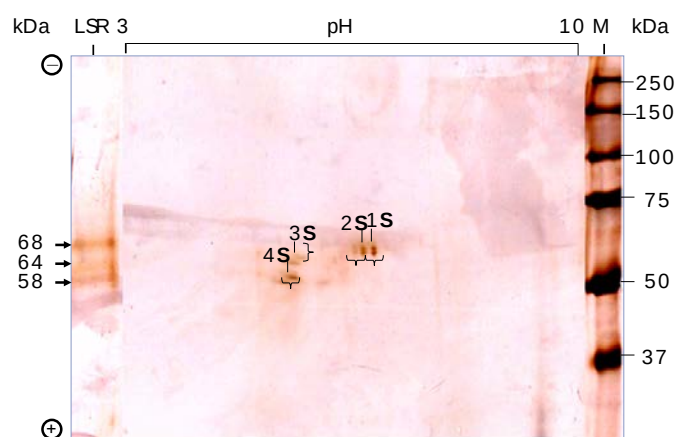


Figure 37.

Electrophorèse bidimensionnelle (première dimension : IEF ; deuxième dimension: SDS-PAGE à 10% d'acrylamide) des sous-unités du LSR présentes dans la fraction chromatographique F4. Une quantité de 100 μ g (200 μ L) de protéines a été chargée dans le gel de première dimension. M : marqueurs de masses moléculaires ; 1S-4S : spots majeurs révélés au nitrate d'argent.

Les deux premiers spots, correspondant à la masse moléculaire apparente de la sous-unité α , ont des points isoélectriques (pHi) de 6,75 et 6,92. Le troisième spot (sous-unité α') a un pHi de 5,72 et le quatrième spot (sous-unité β) un pHi de 5,92 (Tableau 7). La variabilité isoélectrique observée peut résulter en partie d'une phosphorylation variable, visible notamment en ce qui concerne la sous-unité α . La différence de pHi entre les deux isoformes majeures (Δ pHi = 0,17) est du même ordre de grandeur que les différences observées entre les pHi des variants de phosphorylation de la caséine β équine par Girardet *et al.* (2006). En effet, le degré de phosphorylation de cette caséine varie de 2 à 7 groupes phosphates et, à chaque ajout d'un groupe phosphate, le pHi apparent diminue de $0,14 \pm 0,01$ unité (Girardet *et al.*, 2006).

Tableau 7. Caractérisation des masses moléculaires apparentes et des pHi expérimentaux des sous-unités du LSR de rat (numéro d'accession dans Swiss-Prot : Q9WU74)

Spots	Sous-unité du LSR	pHi expérimental ^a	pHi théorique ^b	Masse moléculaire apparente ^a (kDa)	Masse moléculaire théorique ^b (kDa)
1	α	6,92	5,97	68	62,33
2		6,75			
3	α'	5,72	6,08	64	60,35
4	β	5,69	6,16	58	54,87

^aDétermination par 2D-PAGE.

^bPoints isoélectriques et masses moléculaires moyennes des sous-unités protéiques (calculées sans le peptide signal) déterminés avec le logiciel Protparam disponible à l'adresse : http://web.expasy.org/cgi-bin/compute_pi/pi_tool

Ce résultat est en accord avec les études de Moser & White (2006), qui ont caractérisé par spectrométrie de masse plusieurs phosphopeptides isolés après hydrolyse de protéines de foie de souris. Parmi ceux-ci, nous avons identifié grâce au logiciel FindPept (<http://web.expasy.org/findpept/>) le phosphopeptide de séquence pSVDALDDINRPGSTESGR comme étant un fragment de la sous-unité α du LSR, le fragment 436-461 (Figure 38). Nous en déduisons donc que le résidu Ser-436 est bien phosphorylé. Villén *et al.* (2007) ont recherché les peptides phosphorylés présents dans un extrait de foie de souris de 21 jours. Parmi les peptides identifiés, ces auteurs ont retrouvé 6 peptides issus du LSR (Figure 38 ; *Séquences en orange*). L'analyse de séquence de ces 6 peptides révèle 11 sites potentiels de phosphorylation (Figure 38). Toutefois, les sites effectivement phosphorylés n'ont pas été identifiés dans cette étude.

```

1                                     60
MAPAAGACAG APDSHPATVV FVCLFLIIFC PDPASAIQVT VSDPYHVIVL FQPVTLPCTY
61                                     120
QMSNTLTVPI VIWKYKSFRC DRIADAFSPA SVDNQLNAQL AAGNPGYNPY VECQDSVRTV
121                                     180
RVVATKQGNA VTLGDYYQGR RITITGNADL TFEQTAWGDS GVYYCSVVSA QDL DGNNEAY
181                                     240
AELIVLGRTS EAPELLPGFR AGPLEDWLFV VVCLASLLL FLLLGICWCQ CCPHTCCCKV
241                                     300
RCPCCPKCC CPEALYAAGK AATSGVPSIY APSIYTHLSP AKTPPPPPAM IPMGPPYGYP
301                                     360
GDFDRHSSVG GHSSQVPLLR DVDGVSSEV RSGYRIQANQ QDDSMRVLYY MEKELANFDP
361                                     420
SRGPPNGRV ERAMSEVTSL HEDDWRSRPS RAPALTPIRD EEWNRHSPQS PRTWEQEPLQ
421                                     480
EQPRGGWGS RPRARSVDAL DDINRPGSTE SGRSSPPSSG RRGRAYAPPR SRSRDDLYDP
481                                     540
DDPRDLPHSR DPHYYDDIRS RDPRADPRSR QRSRDPDAG FRSRDPQYDG RLLEEALKKK
541                                     593
GSGERRRVYR EEEEEEGQY PPAPPYSET DSQASRERRL KKNLALSRES LVV

```

Figure 38.

Modifications post-traductionnelles potentielles de la sous-unité α du LSR de rat (numéro d'accès dans Genbank NP_116005 et dans Swiss-Prot Q9WU74). Les sites potentiels de phosphorylation sont en orange et soulignés et ceux de O-glycosylation en bleu et soulignés. En gris: site effectivement phosphorylé (cette étude). Séquences en orange : phosphopeptides identifiés expérimentalement pour le LSR de souris par Villén *et al.* (2007). Les sites potentiels de O-glycosylation ont été déterminés par nos soins avec le logiciel NetOGlyc (disponible sur le site www.expasy.org) et les sites potentiels de phosphorylation ont été déterminés avec le logiciel phosphosite (www.phosphosite.org) par Villén *et al.* (2007). En italique : peptide signal, en vert et souligné : possibilité d'un pont disulfure entre Cys-113 et Cys-165 (d'après www.uniprot.org/uniprot/Q9WU74).

4. Recherche de glycosylations éventuelles du LSR

Lorsque les protéines sont glycosylées, la partie glucidique participe parfois à la fonction physiologique. Les glycannes sont par exemple impliqués dans l'interaction protéine-protéine, la reconnaissance entre l'hôte et le pathogène, l'interaction entre un récepteur et une toxine ou encore dans la transduction d'un signal (Hashimoto *et al.*, 2010). Ainsi, il était essentiel de déterminer si le récepteur LSR pouvait être glycosylé ou non afin d'évaluer le cas échéant, le rôle de ces glycosylations sur la fonction biologique du LSR ou la régulation de son activité. Le LSR ne possédant pas dans sa structure primaire de séquence consensus de N-glycosylation du résidu Asn (séquences Asn-Xxx-Ser ou Asn-Xxx-Thr, Xxx étant un résidu quelconque sauf Pro), il ne renferme vraisemblablement pas de N-glycosylation. Concernant la O-glycosylation de résidus Ser ou Thr, les prédictions théoriques calculées avec le logiciel NetOGlyc (disponible sur le site expasy.org) montrent que seulement 2 sites, Thr-276 et Thr-283, pourraient être glycosylés (Figure 39).

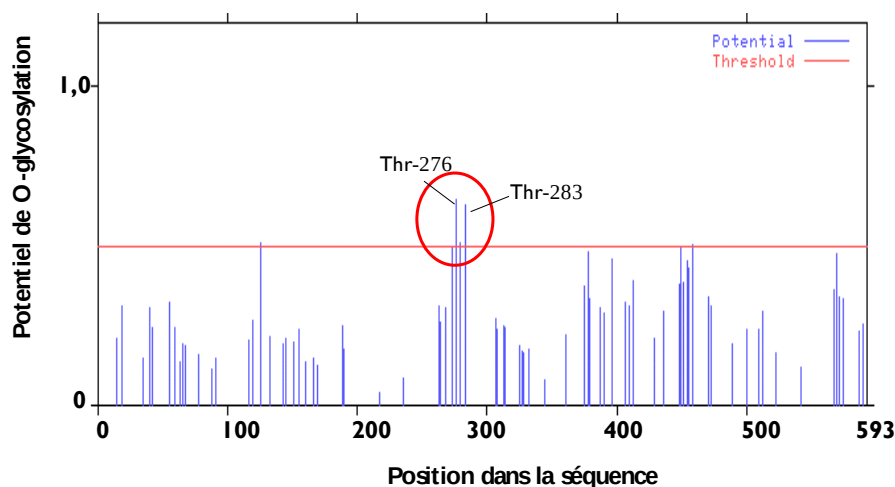


Figure 39.

Prédiction d'O-glycosylations en fonction de la séquence du LSR de rat (probabilité calculée avec le logiciel Net OGlyc sur le site expasy.org). La droite rouge présente le seuil au-dessus duquel un résidu donné peut constituer un site d'O-glycosylation.

Afin d'explorer cette possibilité, la fraction F4 contenant le LSR a été séparée par électrophorèse SDS-PAGE en conditions non réductrices puis électrotransférée sur membrane de PVDF et la présence éventuelle de glycoprotéines a été révélée spécifiquement par le réactif de Schiff après oxydation à l'acide periodique 1% (révélation PAS : *periodic acid Schiff*) selon la méthode de Egito *et al.* (2001). Cette méthode PAS appliquée sur membrane

de PVDF présente l'avantage d'être beaucoup plus sensible que la traditionnelle méthode de Kapitany et Zebrowski (1973) directement appliquée au gel de polyacrylamide. La Lf et ses fragments d'hydrolyse ont été utilisés comme témoins positifs de la réaction de coloration (Figure 40). Le LSR, dont la masse moléculaire apparente est de 240 kDa en conditions non réductrices, n'est pas détecté par la révélation PAS et ne serait donc pas glycosylé, dans la limite de détection de la révélation PAS.

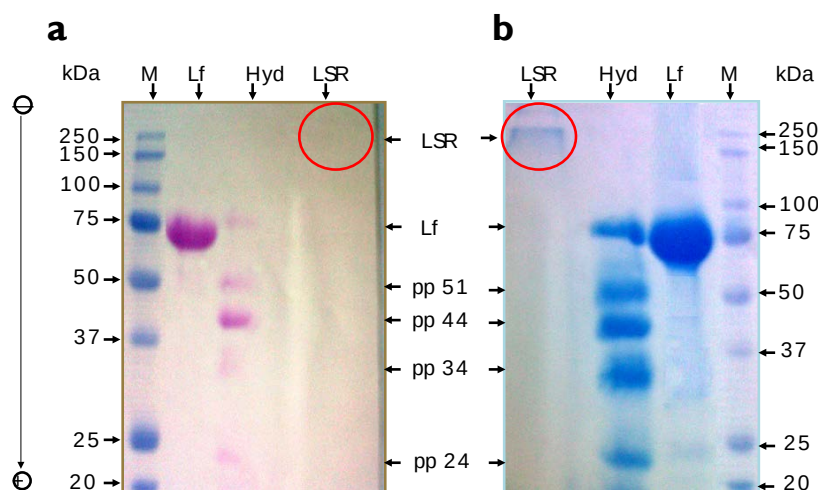


Figure 40.

Révélation spécifique des glycoprotéines électroéluées sur membrane PVDF après migration par SDS-PAGE en conditions non réductrices. Des quantités de 30, 60 et 30 μ g de Lf, des produits d'hydrolyse ménagée (Hyd) de la Lf, et de LSR ont été déposées dans les puits, respectivement. a) Révélation de la membrane au bleu de Coomassie G250. b) Révélation PAS de la membrane (PAS : Periodic Acid Schiff), M : marqueurs de masses moléculaires.

5. Discussion

Le récepteur LSR, principalement exprimé dans le foie, a été jusque-là partiellement purifié à partir de membranes d'hépatocytes isolées par ultracentrifugation en gradient de saccharose (Yen *et al.*, 1994; Mann *et al.*, 1995). Dans ce travail, nous avons développé une méthode en une étape de purification du LSR par chromatographie d'échange d'anions en utilisant la technologie ÄKTA-FPLC. Cette étape s'est révélée être cruciale pour la caractérisation des propriétés structurales du LSR qui a suivi. Cependant, la répétitivité des injections sur la colonne Mono Q augmente rapidement la contre-pression dans la colonne et cela reste un inconvénient majeur, compte-tenu du coût élevé de ce type de colonne. Bien que l'expression du LSR puisse être augmentée dans les membranes par injection préalable de leptine (Kovanen *et al.*, 1979, Stenger *et al.*, 2011), nous n'avons pas traité les 75 rats à la leptine, car le protocole est difficile à mettre en place pour autant d'animaux. Le rendement

obtenu après purification indique cependant que la méthode de préparation du LSR est efficace pour obtenir le récepteur en relativement grande quantité (115 µg/foie) avec une grande pureté (contrôlée par SDS-PAGE en conditions réductrices ou non réductrices, 2D-PAGE, révélation aux anticorps anti-LSR et au nitrate d'argent).

L'analyse SDS-PAGE a mis en évidence que les sous-unités du LSR sont reliées entre-elles par des ponts disulfures intercaténaux, ce qu'avaient déjà observé Yen *et al.* (2008). Outre les ponts intercaténaux, il existe vraisemblablement des ponts intracaténaux, comme celui prédit entre les résidus Cys-113 et Cys-165 (selon les données disponibles sur le site www.uniprot.org/uniprot/Q9WU74). La masse moléculaire apparente du LSR a été déterminée par électrophorèse en absence de β-mercaptoéthanol (conditions non réductrices) à 240 kDa, tandis que les sous-unités α, α' et β présentent des masses moléculaires apparentes respectives de 68, 64 et 58 kDa (déterminées en présence de β-mercaptoéthanol), ce qui correspond aux masses moléculaires rapportées dans la littérature à partir de la séquence protéique déduite de la séquence d'ADN (Yen *et al.*, 1999 ; Mesli *et al.*, 2004). Cependant, des études d'immuno-précipitation et de *ligand blot* avaient suggéré l'existence possible de deux types de structure quaternaire : une structure trimérique de type α₁β₂ et une structure de type tétramérique de type α₁β₃ (Yen *et al.*, 1999), α désignant au sens large soit α ou α' car les deux types de sous-unités n'ont pas pu être distinguées par les techniques utilisées. L'analyse électrophorétique que nous avons réalisée sur le LSR purifié nous amène à une autre proposition. En effet, les 3 types de sous-unités sont visibles et donc bien présentes, excluant un assemblage de type α₁β₂ ou type α₁β₃. En conséquence, la structure quaternaire du récepteur correspond plus vraisemblablement à une structure de type αα'β₂ pour une masse moléculaire apparente du complexe de 248 kDa (masse théorique 246,2), sous réserve que d'éventuelles modifications post-traductionnelles ne perturbent pas le comportement électrophorétique.

La caractérisation physico-chimique du LSR passe, entre autres, par la recherche de modifications post-traductionnelles, les plus courantes étant la phosphorylation et les N- et O-glycosylations (en plus du peptide signal correspondant aux 35 premiers résidus et à l'existence de ponts disulfures déjà évoquée). L'analyse par électrophorèse bidimensionnelle (2D-PAGE) a permis de déterminer le pHi apparent des sous-unités. Dans le cas des sous-unités α' et β, les pHi expérimentaux sont plus acides que les pHi théoriques calculés à partir de la séquence en acides aminés, ce qui va dans le sens de la présence éventuelle de résidus phosphorylés (les groupements phosphates abaissent sensiblement les valeurs des pHi par

rapport à celles des formes non phosphorylées). Dans le cas de la sous-unité α , les valeurs de pHi expérimentales des deux formes isoélectriques sont en revanche supérieures à la valeur théorique calculée pour la forme non phosphorylée et l'on ne peut donc pas conclure quant à la présence éventuelle de groupements chargés (phosphates ou acides sialiques dans le cas d'une glycosylation). Cependant, la différence observée entre les deux isoformes (environ 0,15 unité pH) correspond bien à une différence d'un groupement phosphate (Girardet *et al.*, 2006). En effet, la présence d'un groupement carboxylique supplémentaire aurait abaissé le pHi de 0,3 unité pH. C'est ce qui est observé lors d'une désamidation spontanée d'un résidu Asn en résidu Asp ou isoAsp (Girardet *et al.*, 2004). Par ailleurs, une sialylation variable entre les deux isoformes de la sous-unité α du LSR (*i.e.*, une différence d'un résidu d'acide N-acétylneuraminique) ne semble pas être possible au regard de la différence des pHi. La révélation PAS spécifique des glycoprotéines n'a pas montré la présence de glycannes sur le LSR, alors que la Lf et ses fragments N- et C-lobes utilisés comme témoins positifs réagissent bien au réactif de Schiff. La recherche de sites potentiels de glycosylation sur la structure primaire du LSR montre en effet qu'il est peu probable que ce récepteur soit glycosylé. Cependant, si le LSR n'est pas N-glycosylé, on ne peut exclure totalement qu'il ne soit pas O-glycosylé, les sites Thr-276 et Thr-283 étant les sites les plus probables. Concernant la phosphorylation, différents auteurs ont isolé des phosphopeptides du LSR (Kim *et al.*, 2005 ; Moser & White, 2006 ; Villen *et al.*, 2007). Six phosphopeptides issus du LSR ont été identifiés et renferment au total de 11 phosphorylations (sur 15 sites potentiels prédits par le calcul) (Villen *et al.*, 2007). Bien que la position exacte de ces phosphorylations par rapport à la séquence ne soit pas encore identifiée exactement, tous ces phosphopeptides sont localisés dans la partie C-terminale 228-593. En utilisant les résultats d'une autre étude portant sur la caractérisation de phosphopeptides issus d'un hydrolysât de protéines d'hépatocytes de rat (Moser & White, 2006), nous avons identifié le résidu Ser-436 du LSR comme étant réellement phosphorylé.

CHAPTER 3

***Effet de la lactoferrine sur la lipémie postprandiale et évidence
d'une interaction directe entre la lactoferrine et le recepteur LSR***

1. La lipémie postprandiale chez des souris traitées par la lactoferrine

L'objectif global de notre étude était de comprendre par quel(s) mécanisme(s) la Lf exerçait son effet sur la lipémie post-prandiale et de rechercher si le LSR pouvait constituer une cible pour la Lf. Dans la mesure où les analyses par SDS-PAGE ont révélé que la Lf commerciale renfermait bon nombre d'impuretés (Figure 41), et que nos études d'interaction exigeaient des quantités relativement importantes de Lf, nous avons été amenés à purifier de la Lf à partir de lait cru, comme décrit dans le chapitre 1 de ce manuscrit. Les études antérieures ayant montré que la Lf inhibait la lipémie post-prandiale, lorsqu'elle est injectée par voie i.v. (Huettinger *et al.*, 1988 ; Huettinger *et al.*, 1992 ; Ziere *et al.*, 1993 ; Crawford & Borensztajn, 1999), nous avons d'abord vérifié que la Lf purifiée par nos soins exerçait le même effet.

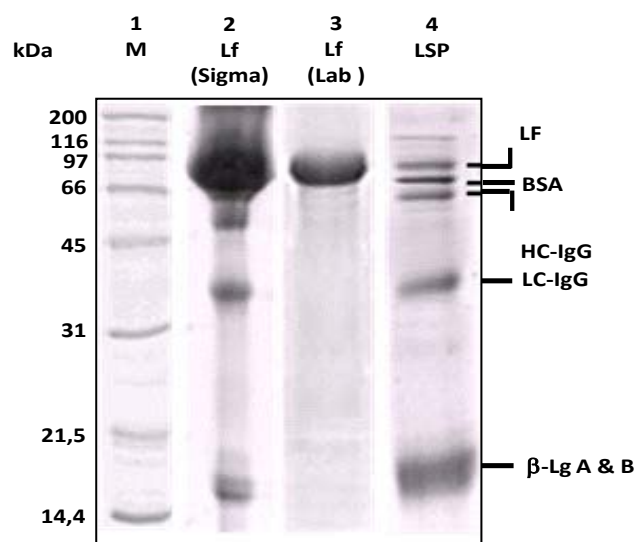


Figure 41.

SDS-PAGE 12% montrant le profil électrophorétique des Lfs utilisées dans cette étude. 1. Marqueurs de masses moléculaires (M). 2. Lf bovine commerciale (Sigma). 3. Lf bovine purifiée au laboratoire à partir des protéines lactosériques (lab). 4. Protéines lactosériques obtenues après précipitation des caséines (LSP). BSA : sérumalbumine bovine ; LC-IgG : Immunoglobulines G chaînes légères ; HC-IgG : Immunoglobulines G chaînes lourdes ; β -Lg : β -lactoglobuline. La coloration a été réalisée au bleu de Coomassie R250.

Pour ce faire, des souris mâles (C57BL/6J) ont été maintenues sous régime standard au laboratoire jusqu'à l'âge de 14 semaines. Ces souris ont ensuite reçu une injection de lactoferrine pure (2mg/souris) en solution dans 100 μ L de tampon PBS (ou le même volume de tampon PBS pour le lot témoin) par voie veineuse (veine caudale). Immédiatement après l'injection de Lf, les souris ont été gavées avec 300 μ L d'huile d'olive comme source de

lipides, pour induire la lipémie post-prandiale. L'évolution de la lipémie postprandiale a été suivie par dosage des TG plasmatiques, immédiatement après le gavage, puis toutes les heures pendant 3 h. Afin de valider les résultats obtenus, nous avons également vérifié que la Lf n'avait aucun effet sur les taux de glycérol libre. L'augmentation de glycérol libre mesurée 1 h après gavage est de $16 \pm 4.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ pour le groupe contrôle et de $18.8 \pm 2.3 \mu\text{g.mL}^{-1}$ pour le groupe traité à la Lf.

L'effet de la Lf se traduit par une augmentation marquée de la lipémie post-prandiale dans les deux premières heures qui suivent l'injection (Figure 42). Par rapport aux souris témoins, le taux de TG plasmatiques est 4,3 fois plus élevé ($p = 0,049$) au bout d'une heure pour les animaux traités par la Lf (Figure 43), suggérant que l'épuration des triglycérides plasmatiques provenant des lipides alimentaires est ralentie chez ces dernières. Au bout de 2 h, la différence entre les deux lots de souris est moins marquée et elle disparaît après 3 h, temps au bout duquel on retrouve un taux de TG quasiment égal au taux de base.

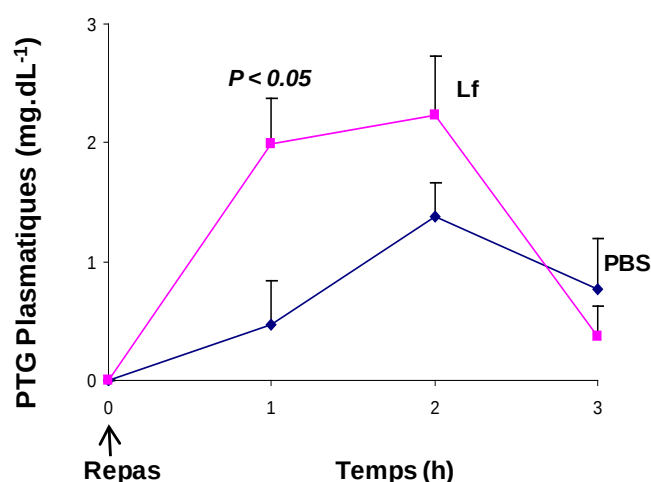


Figure 42.

Effet de la Lf sur le taux de triglycérides plasmatiques de souris en phase postprandiale. Des souris mâles âgées de 7 semaines ont été maintenues sous régime standard pendant 7 semaines. Les souris ont ensuite reçu une injection de Lf bovine (2 mg/souris) (■) ou de PBS (témoins) (◆), puis ont été gavées avec 300 μL d'huile d'olive comme source de lipides, pour induire la lipémie post-prandiale. Le taux de TG plasmatiques en phase postprandiale a été déterminé pour chaque lot de souris, selon le protocole décrit en matériel et méthodes. Le graphe présente la valeur moyenne $\pm$ l'écart à la moyenne (SEM) pour chaque groupe ($n=4$). Le T-test de Student a été utilisé.

La même expérience conduite en parallèle avec de la Lf commerciale Sigma montre aussi une augmentation du taux de triglycérides plasmatiques une heure après injection, mais cet effet est moins marqué qu'avec la Lf purifiée au laboratoire (Figure 43), la différence

entre les deux pouvant s'expliquer par la présence de certaines des impuretés présentes dans la Lf commerciale. Néanmoins, ces résultats indiquent que les effets observés sur la lipémie post-prandiale proviennent uniquement de la Lf, et non d'éventuels contaminants.

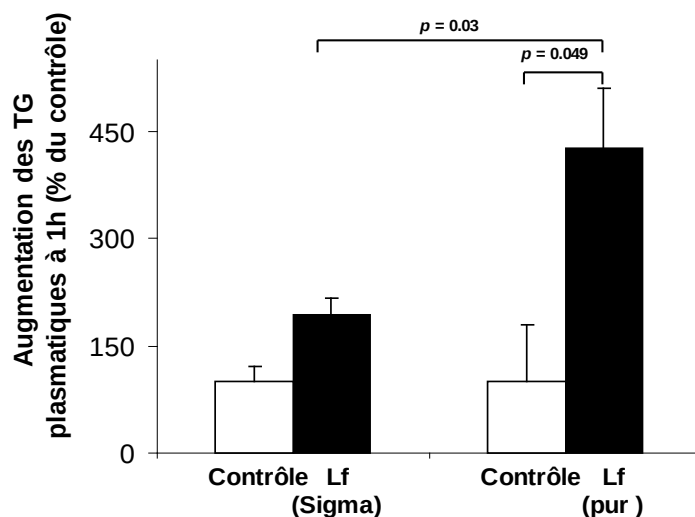


Figure 43.

Augmentation du taux de TG plasmatiques 1 h après injection de Lf purifiée ou commerciale. Les conditions expérimentales sont celles de la Figure 43. Le graphe présente la valeur moyenne $\pm$ l'écart à la moyenne (SEM) pour chaque groupe (n=4). Le test non paramétrique de Mann-Whitney a été utilisé.

Ces résultats sont cohérents avec ceux de la littérature (Huettinger *et al.*, 1988), qui décrivent que l'administration intraveineuse de Lf conduit à une augmentation de la lipémie post-prandiale. Ces études proposent que l'effet observé résulte d'une inhibition de l'épuration des chylomicrons (CM) sous l'action de la Lf. Dans la mesure où le LSR est impliqué dans l'épuration des CM lors de la phase post-prandiale, ce récepteur pourrait constituer la cible d'action de la Lf.

Des études ayant montré que la Lf était capable de pénétrer dans le noyau de cellules érythroleucémiques humaines (lignée K562 ; Garré *et al.*, 1992) et de réguler l'expression génique en agissant comme facteur de transcription d'un certain nombre de gènes (He & Furmanski, 1995), nous avons, dans un premier temps, recherché si l'expression du LSR était affectée par la Lf. Ces travaux sont développés dans le paragraphe suivant.

2. Effet de la Lf sur la transcription du gène *lsr* dans des cellules Hepa1-6

L'effet de la Lf sur la transcription du gène *lsr* a été testé par PCR quantitative. Pour déterminer si la transcription du gène *lsr* était affectée par la Lf bovine, des cellules Hepa 1-6 ont été préincubées 5 min avec 0.4 et 0.8 mM d'oléate, puis 3 h avec de la Lf (2 mg.mL⁻¹) à 37 °C. En parallèle, des expériences de contrôle ont été réalisées, sans incubation avec l'oléate, ou sans Lf. Les résultats de PCR quantitative montrent qu'en présence de 0.8 mM d'oléate, la quantité relative d'ARNm (rapport de la quantité d'ARNm correspondant au LSR/ quantité d'ARNm obtenu à partir du gène HRPT pris comme référence) est significativement diminuée lorsque les cellules ont été incubées avec la Lf (Figure 44), alors que tous les autres cas ne présentent pas de différences significatives.

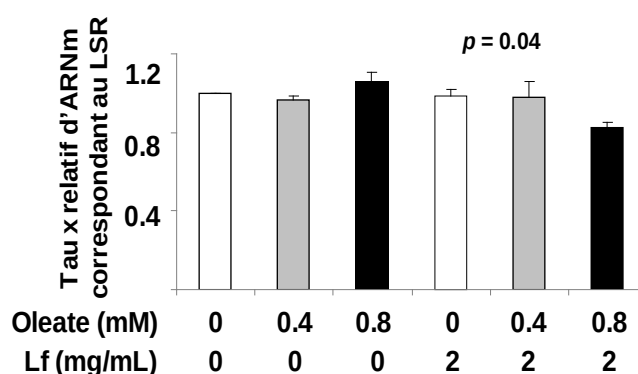


Figure 44.

Influence de la lactoferrine sur la transcription du gène *lsr* dans des cellules Hepa1-6. Les cellules Hepa 1-6 ont été incubées avec 0,4 mM ou 0,8 mM d'oléate pendant 5 minutes, puis avec 2 mg/mL de Lf bovine pendant 3 h à 37 °C. Les résultats présentés sont la moyenne de 3 expériences $\pm$ SD de la quantité d'ARNm relative obtenue pour le LSR (rapport de la quantité d'ARNm pour le LSR / quantité d'ARNm obtenue pour HRPT, pris comme référence ; valeur moyenne et écart-type). La valeur de *p* indique les différences significatives.

La Lf semblant moduler la transcription du gène codant pour le LSR, nous avons recherché si la Lf affectait aussi le processus de maturation et d'épissage conduisant aux 3 sous-unités α , α' and β . Nous avons reconduit les expériences de PCR quantitative pour les 3 sous-unités individuelles en utilisant des *primers* spécifiques et les résultats obtenus (Figure 45) montrent les mêmes tendances. En présence de Lf, la quantité relative d'ARNm codant correspondant aux 3 sous-unités individuelles (rapport entre le taux d'ARNm correspondant aux sous-unités individuelles du LSR et le taux d'ARN obtenu à partir du gène référence) est

significativement diminué dans les cellules traitées par de la Lf en présence de 0.8 mM d'oléate, par rapport à l'incubation avec l'oléate seul. La sous-unité β se distingue des deux autres sous-unités en ce sens que l'addition de Lf en l'absence d'oléate se traduit, pour la sous-unité β , par une augmentation de la transcription, alors que pour les deux autres, nous n'observons de différence dans les mêmes conditions.

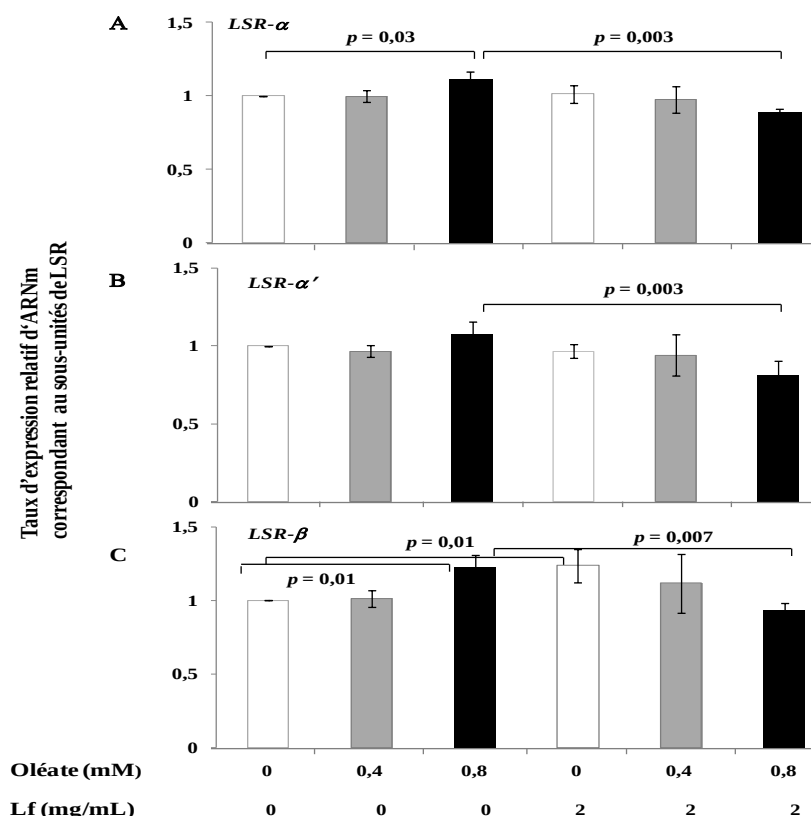


Figure 45.

Influence de la Lf sur la quantité relative d'ARNm correspondant aux 3 sous-unités du LSR. Les cellules Hepa 1-6 ont été incubées avec 0,4 mM ou 0,8 mM d'oléate pendant 5 min, puis avec 2 mg/ml de Lf bovine pendant 3 h à 37 °C. Les résultats présentés sont la moyenne de 3 expériences $\pm$ SD de la quantité d'ARNm relative obtenue pour chacune des sous-unités du LSR (quantité d'ARNm pour une sous-unité donnée / quantité d'ARNm obtenue pour HRPT, pris comme référence). La valeur de p indique les différences significatives.

Ces résultats montrent qu'en présence d'oléate, la Lf semble réduire d'environ 20 % à la fois la quantité d'ARNm (*full length*) et d'ARNm matures, correspondant aux différentes sous-unités, ce qui est comparable à la diminution de 20% du taux d'ARNm du facteur de stimulation des colonies de macrophages observée suite à un traitement de la lignée cellulaire 5637 de fibroblastes embryonnaires par la Lf (Penco *et al.*, 1995). Par ailleurs, le fait que la

diminution du taux d'ARNm correspondant aux sous-unités individuelles soit du même ordre de grandeur que celle de l'ARNm non mature suggère que l'action de la Lf s'exerce avant l'évènement d'épissage alternatif. Ces observations semblent donc cohérentes avec le fait que la Lf puisse jouer le rôle de régulateur transcriptionnel du gène *lsr*.

3. Influence de la Lf sur le taux d'expression protéique du récepteur LSR dans des cellules Hepa 1-6

Nous avons poursuivi cette étude dans le but de rechercher si l'effet observé au niveau transcriptionnel avait une répercussion sur le taux d'expression protéique du LSR exprimé dans les cellules Hepa 1-6.

Les cellules Hepa 1-6 ont été traitées dans les mêmes conditions que ci-dessus et des western-blots ont été réalisés, en utilisant l'actine comme « *loading control* » (Figure 46A). Ces immunoblots révèlent seulement une légère tendance à la diminution de l'expression du LSR en présence de Lf, qui est cependant non significative (Figure 46B).

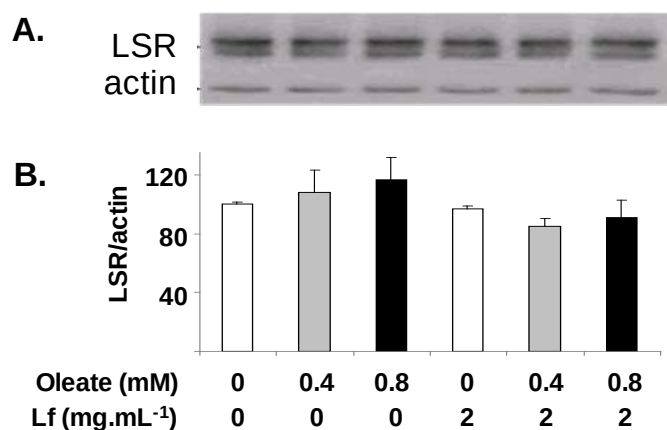


Figure 46.

Effet de la Lf sur l'expression protéique du LSR dans des cellules Hepa 1-6. A) Western-blots. Les cellules Hepa 1-6 ont été traitées par 0,4 ou 0,8 mM d'oléate pendant 5 min, puis incubées en présence de Lf (2 mg/ml) pendant 3 h. Les cellules ont été lysées, les extraits cellulaires déposés sur SDS-PAGE et des western-blots ont été réalisés avec un anticorps anti-LSR. La révélation a été effectuée avec un anticorps secondaire couplé à la HRP. **B) Analyse densitométrique de l'expression protéique normalisée par rapport au niveau d'expression de l'actine.** Chaque histogramme représente la moyenne de 3 expériences individuelles. La différence entre les valeurs est considérée comme significative pour une valeur de $p < 0,05$ à l'issue du T-test.

Des études antérieures avaient montré que la Lf exogène pouvait être internalisée et transloquée dans le noyau de cellules de carcinomes humains (lignée H1299 ; Fleet, 1995; Son *et al.*, 2006). Ces études montrèrent que la Lf peut affecter la transcription du gène *lsr* comme elle affecte la transcription d'autres gènes (Son *et al.*, 2002). Toutefois, aucun effet significatif de la Lf n'est observé sur le taux d'expression protéique du LSR, suggérant que le ralentissement de l'épuration des TG alimentaires observé *in vivo* n'est pas lié à une diminution de la quantité de complexe LSR.

4. Interaction LSR-Lactoferrine

4.1 Colocalisation de la lactoferrine et du LSR à la surface de cellules Hepa 1-6

Cette étude a été réalisée dans le but de rechercher une possible interaction entre la Lf et le LSR exprimé à la surface de cellules Hepa 1-6, tout d'abord par la mise en évidence d'une colocalisation de ces deux protéines, suite à l'incubation de ces cellules en présence de Lf.

Dans ce but, la Lf a d'abord été marquée par une sonde de fluorescence (Alexa Fluor-488). Des études antérieures avaient montré que les résidus d'acides aminés basiques et chargés positivement étaient probablement à l'origine de la reconnaissance et de l'internalisation de la Lf par d'autres récepteurs de lignées cellulaires (Huettinger *et al.*, 1988) telles que des cellules épithéliales (Suzuki *et al.*, 2001), HeLa, U87MG et 5637 (Penco *et al.*, 2001), ou des cellules Caco-2 (Ashida *et al.*, 2004). Dans l'hypothèse où la reconnaissance de la Lf par le LSR pourrait, elle aussi, impliquer ces acides aminés basiques, nous avons choisi d'utiliser une sonde ne modifiant pas ces acides aminés, de façon à ne pas risquer de perturber l'interaction. Nous avons ainsi retenu l'Alexa Fluor-488, sonde connue pour se fixer sur les groupements aldéhydiques des protéines par peroxydation douce des groupements osidiques (monoholosides/saccharides) sans toucher les acides aminés basiques. Les conditions de marquage que nous avons utilisées (voir Matériels et Méthodes, paragraphe 10) ont permis d'obtenir une Lf marquée à raison de 3,7 moles de sonde par mole de Lf.

Différents essais de colocalisation ont alors été menés, en jouant sur les concentrations de Lf marquée et le temps d'incubation, de façon à optimiser les signaux obtenus. L'expression du LSR à la surface des cellules Hepa 1-6 a également été optimisée par l'incubation des cellules en présence de 10 ng.mL⁻¹ de leptine (Stenger *et al.*, 2010). Enfin, les

cellules ont été incubées en présence de Lf marquée par l'Alexa Fluor 488 pendant 10 min à 37 °C. Après perméabilisation, le LSR a été détecté par un anticorps anti-LSR de lapin, puis les cellules ont été incubées avec un anticorps secondaire anti-IgG de lapin marqué par une sonde Alexa Fluor 555. Les cellules ont été observées au microscope confocal : sur ces images (Figure 47), la Lf marquée par l'Alexa-fluor est visualisée en vert (Figure 47A), le LSR marqué par l'Alexa fluor est visualisé en rouge (Figure 47B). La superposition des deux images A et B (*merge*) conduit à une coloration orange dans les zones de colocalisation.

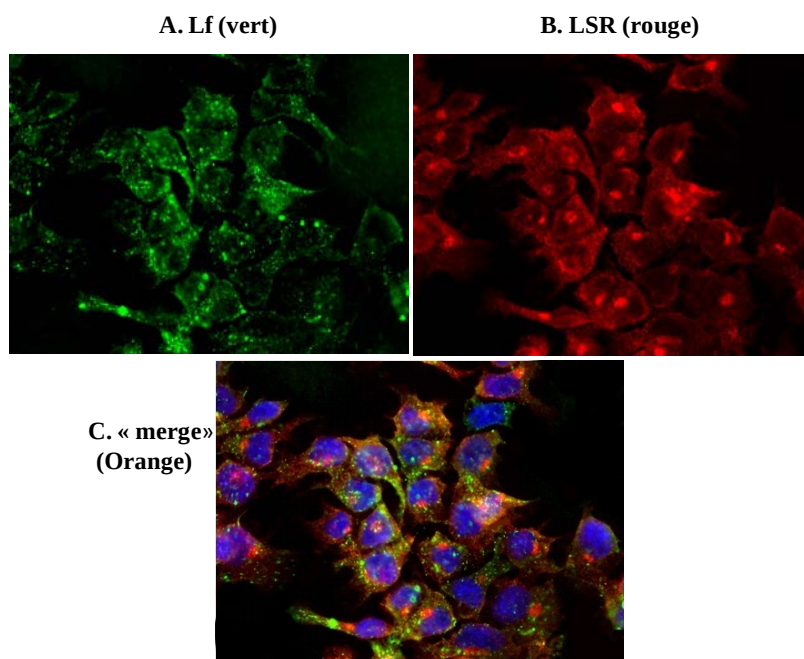


Figure 47.

Images de microscopie confocale illustrant la colocalisation du LSR et de la Lf à la surface de cellules Hepa 1-6. Les cellules ont été incubées avec de la leptine (10 ng.mL^{-1}) pendant 1 h à 37 °C de façon à optimiser l'expression du LSR, puis avec 0.8 mM oléate et enfin avec la Lf marquée par l'Alexa Fluor 488 (2 mg.mL^{-1}) en présence d'oléate pendant 10 min à 37 °C. La présence de LSR est détectée par un anticorps anti-LSR (Sigma, HPA007270, 1/100 dilution, 2 h, température ambiante) suivie d'une incubation avec un anticorps secondaire conjugué à de l'Alexa Fluor 555 (dilution 1/2000) pendant 1 h à température ambiante. Le noyau des cellules est détecté par incubation avec du DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, dilution 1/500, 15 min à température ambiante). La figure A montre la Lf marquée (fluorescence verte), le LSR est visualisé (en rouge) sur la figure B. La figure C montre la colocalisation du LSR et de la Lf (zones orange).

Les premiers résultats obtenus semblant indiquer une colocalisation du LSR et de Lf, différents essais ont alors été menés, en jouant sur les concentrations de Lf marquée et le temps d'incubation, de façon à optimiser les signaux obtenus. De plus, les expériences ont été conduites en absence et en présence d'oléate (0,8 mM), composé connu pour activer le LSR

via un changement conformationnel (Mann *et al.*, 1995), afin d'évaluer si l'activation du LSR était importante ou non pour une éventuelle interaction avec la Lf.

Les résultats de ces expériences montrent que l'allongement de la durée d'incubation avec la Lf à 20 min en présence d'oléate (Figures 48B et 48D) comme en l'absence d'oléate (Figures 48A et 48C) donne des profils peu différents de ceux obtenus précédemment. En revanche, nous observons qu'en absence d'oléate, les images obtenues diffèrent des images obtenues avec 0,8 mM d'oléate. De plus, dès 10 min d'incubation (Figure 48B), nous observons une colocalisation régulière du LSR et de la Lf sur le pourtour des cellules, et cette observation est encore plus marquée après une incubation de 20 min (Figure 48D).

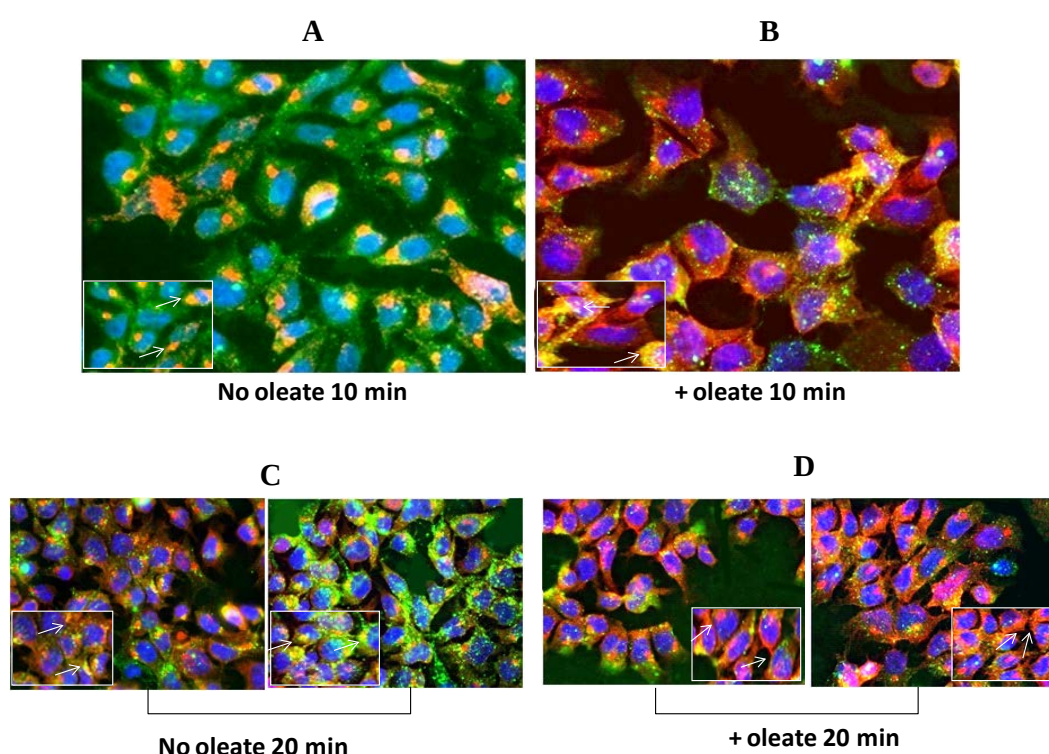


Figure 48.

Images de microscopie confocale illustrant l'effet de la présence d'oléate et du temps d'incubation sur la colocalisation du LSR et de la Lf à la surface de cellules Hepa 1-6. Les cellules ont été incubées avec de la leptine (10 ng.mL^{-1}) pendant 1 h à 37°C de façon à optimiser l'expression du LSR, puis avec la Lf marquée par l'Alexa Fluor 488 (2 mg.mL^{-1}) en l'absence d'oléate et en présence d'oléate pendant 10 min et 20 min à 37°C . La présence de LSR est détectée comme précédemment.

L'ensemble de ces résultats montre que le marquage de la Lf par l'Alexa Fluor 488 constitue une sonde efficace pour visualiser la Lf sur la surface de cellules d'hépatomes. En utilisant cette approche, nous avons réussi à mettre en évidence une colocalisation du LSR et

de la Lf à la surface des cellules Hepa 1-6, suggérant que la Lf puisse se fixer sur le LSR. En absence d'oléate, le traitement des images ne montre qu'un très faible degré de colocalisation, suggérant que l'activation du LSR est nécessaire à la reconnaissance de la Lf. Ce faible signal obtenu en l'absence d'oléate (Figures 47 et 48) s'explique vraisemblablement par le fait que le sérum de veau fœtal présent dans le milieu de culture des cellules renferme des AGL, ce qui permet une certaine activation du LSR, à un degré moindre cependant que l'ajout de 0,8 mM d'oléate.

4.2 Etude de l'interaction LSR/Lf par la technique du *ligand-blot*

Les expériences précédentes ont établi que le LSR et la Lf colocalisaient à la surface de cellules d'hépatomes, suggérant une interaction directe possible entre les 2 protéines. Pour tester cette hypothèse, nous avons mené des expériences de *ligand-blot* entre les deux partenaires protéiques purifiés. Une quantité de 20 µg de LSR purifié a été déposée par puits sur un gel de SDS-PAGE en conditions non réductrices, puis transférée après migration sur une membrane de nitrocellulose. Après visualisation des protéines par coloration au Rouge Ponceau, la membrane a été découpée en deux séries de bandes contenant des dépôts identiques pour les *ligand-blots*. Une série a été placée 5 min en présence de 0,8 mM d'oléate avant incubation avec la Lf, la seconde série a été directement incubée avec la Lf (2 mg.mL⁻¹) pendant 1 h à 37 °C. Après révélation et traitement avec 0,8 mM d'oléate puis incubation avec la Lf, on observe une bande de masse moléculaire apparente de 240 kDa, correspondant à la bande obtenue pour le complexe LSR en conditions non réductrices (Figure 49), indiquant que la Lf est liée au récepteur dans les conditions expérimentales utilisées. Dans les mêmes conditions, mais en l'absence d'oléate, aucune bande protéique n'est visible sur la membrane après incubation avec la Lf et révélation. Un contrôle négatif a également été effectué de façon à vérifier l'absence d'interaction entre l'anticorps anti-Lf et le LSR (Figure 49, colonnes 1 et 2). Cette expérience apporte pour la première fois des arguments en faveur d'une interaction LSR/Lf, et montre également que l'interaction entre les deux partenaires n'est possible que lorsque le récepteur a été activé par un acide gras.

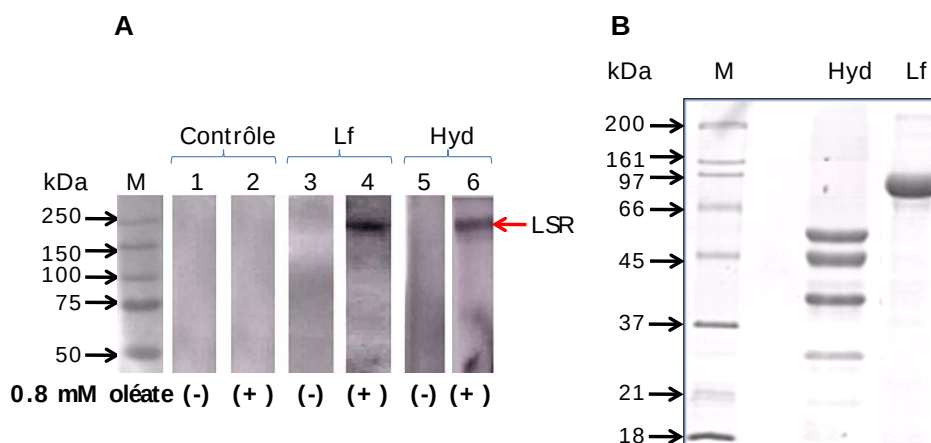


Figure 49.

Expériences de ligand blot montrant l'interaction de la Lf bovine avec le LSR. **A)** Le LSR purifié a été déposé sur un gel de SDS-PAGE à 10% en conditions non réductrices (20 μ g/puits) et transféré après migration sur membrane de nitrocellulose. Après traitement de la membrane par la BSA (3%), les bandes ont été incubées en présence de 0,8 mM d'oléate (colonnes 2, 4, et 6) ou en absence d'oléate (colonnes 1, 3 et 5), suivi d'une incubation pendant 1 h à 37 °C avec de l'anticorps anti-Lf comme contrôle (dilution 1/100, en 1 et 2), ou de la Lf (2 mg.mL⁻¹, en 3 et 4) ou de l'hydrolysate de Lf (2 mg.mL⁻¹, en 5 et 6). La révélation du complexe LSR/Lf a été réalisée par chimioluminescence en utilisant un anticorps secondaire (1/2000) couplé à la HRP. **B)** SDS-PAGE montrant le profil électrophorétique de la Lf ou de son hydrolysate utilisés pour les expériences de ligand-blot.

4.3 Expériences de compétition entre la Lf et les VLDL pour la fixation sur le LSR

Dans le but d'établir un lien possible entre la fixation de la Lf sur le LSR et l'effet observé *in vivo* (inhibition de l'épuration de TG alimentaires), des expériences de compétition ont été réalisées, au cours desquelles le LSR purifié immobilisé sur membrane a été incubé en présence d'oléate, de particules VLDL (particules riches en TG) préalablement purifiées et de concentrations croissantes de Lf. La fixation des VLDL au LSR a été révélée par la détection de l'apoB (Figure 50A). Comme le montre la Figure 50B, la fixation des particules VLDL diminue avec l'augmentation des concentrations en Lf, montrant que la fixation de la Lf entre en compétition avec les particules de lipoprotéines pour la fixation sur le récepteur, et peut donc empêcher la fixation des ligands lipoprotéines.

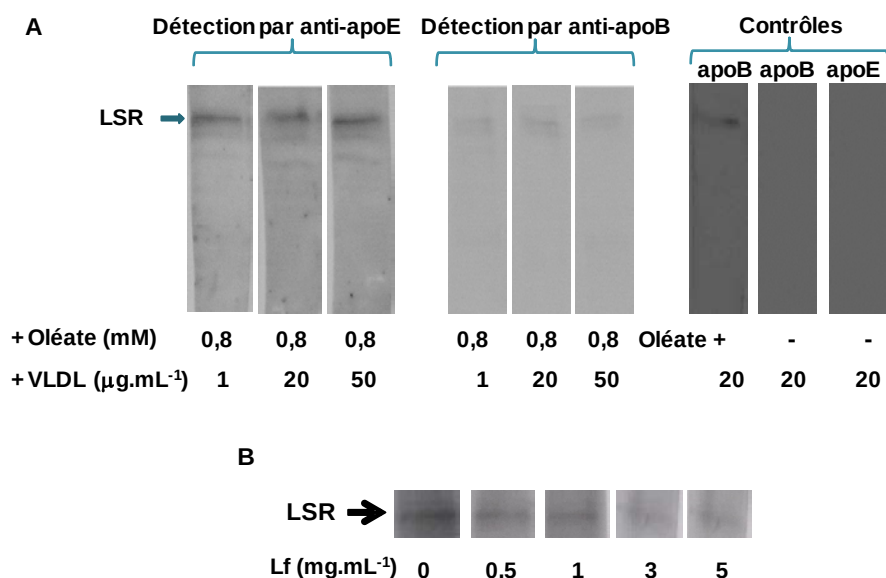


Figure 50.

Expériences de compétition entre la Lf et les VLDL pour la fixation sur le LSR. **A. Mise au point de la détection d'un complexe LSR-VLDL.** Le LSR purifié a été déposé sur un gel de SDS-PAGE à 10% en conditions non réductrices (20 $\mu\text{g/puits}$) et transféré après migration sur membrane de nitrocellulose. Après traitement de la membrane par la BSA (3%), les bandes ont été incubées en présence de 0,8 mM d'oléate ou en absence d'oléate, suivi d'une incubation pendant 1 h à 37 °C avec des VLDL humaine. La révélation du complexe LSR/VLDL a été réalisée par chimioluminescence en utilisant un anticorps primaire apoB ou apoE et un anticorps secondaire (1/2000) couplé à la HRP. Un contrôle a été réalisé pour vérifier l'absence d'interaction quand l'oléate n'est pas présent.

B. Expériences de compétition Le LSR purifié a été déposé sur un gel de SDS-PAGE à 10% en conditions non réductrices (20 $\mu\text{g/puits}$) et transféré après migration sur membrane de nitrocellulose. Les bandes de nitrocellulose ont été incubées 1 h à 37 °C avec 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de VLDL, en présence de concentrations croissantes de Lf. Après lavages par du PBS renfermant 0.5% de Triton X-100, les bandes ont été incubées avec un anticorps anti-apoB et révélées par chimioluminescence, comme précédemment.

4.4 Interaction entre les produits d'hydrolyse ménagée de la Lf et le LSR

Afin d'établir si les domaines isolés de la Lf étaient toujours capables d'interagir avec le LSR, et le cas échéant, de caractériser le domaine de la Lf responsable de l'interaction, nous avons réalisé une hydrolyse ménagée de la Lf par la trypsine et avons réitéré l'expérience précédente avec, dans un premier temps, le mélange de fragments obtenus dans les conditions décrites dans le paragraphe "hydrolyses enzymatiques ; hydrolyse ménagée de la lactoferrine par la trypsine" (Matériels et méthodes). Dans ces conditions, en présence d'oléate uniquement, et avec les mêmes contrôles, nous observons toujours une bande au niveau du LSR (Figure 49), indiquant qu'au moins un des fragments issus de l'hydrolyse ménagée de la Lf est capable d'interagir avec le récepteur.

4.5 Interaction entre le LSR et les domaines N- et C-terminaux de la Lf

La Lf ainsi que le mélange de fragments issus de son hydrolyse ménagée ayant la capacité à se lier au LSR, nous avons voulu localiser plus précisément la région de la Lf qui était impliquée dans l'interaction avec le récepteur. Dans ce but, le fragment pp51, représentatif du domaine C-terminal, ainsi que le mélange des fragments pp24 et pp34, représentatifs du domaine N-terminal ont été utilisés pour des expériences de *ligand blot* (Figure 51)

En présence d'oléate, nous observons une fixation des fragments représentatifs des domaines N- et C-terminaux sur le LSR. Comme précédemment, cette interaction n'est pas retrouvée en absence d'oléate.

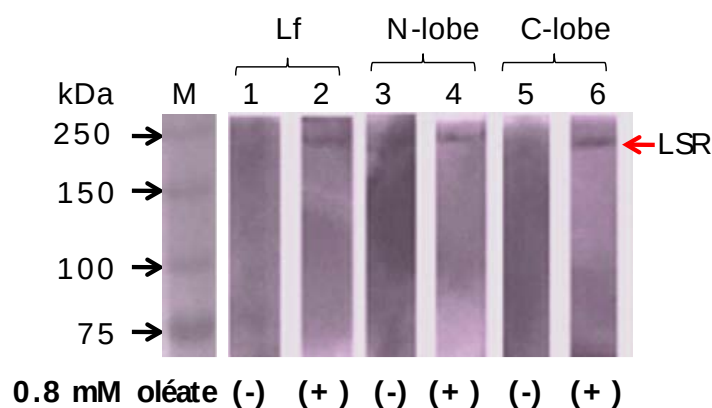


Figure 51.

Ligand-blot montrant l'interaction des domaines N- et C-terminaux de la Lf avec le LSR. Le LSR purifié a été déposé sur un gel de SDS-PAGE à 10% en conditions non réductrices (20 µg/puits) et transféré après migration sur membrane de nitrocellulose. Après traitement de la membrane par la BSA (3%), les bandes ont été incubées en présence l'oléate (en colonnes 2, 4 et 6) ou en son absence (en 1, 3 et 5) pendant 5 min à 37 °C, puis avec de la Lf (2 mg.mL⁻¹, en 3 et 4) ou les fragments correspondant aux domaines N- et C-terminaux (2 mg.mL⁻¹, en 3 et 4, et 5 et ,6 respectivement) puis avec de l'anticorps anti-Lf (dilution 1/100, La révélation a été effectuée comme précédemment. M : marqueurs de masse moléculaire

Alors que des études antérieures ayant montré que les charges positives de la région N-terminale de la Lf étaient déterminantes pour sa fixation aux cellules parenchymales de foie et sa capacité à inhiber la capture des lipoprotéines renfermant de l'apoE (Huettinger *et al.*, 1992), notre étude montre que les domaines N- et C-terminaux ont tous deux la capacité à être

reconnus par le LSR, suggérant que des facteurs autres sont impliqués dans l'interaction entre la Lf et ce récepteur.

4.6 Interaction entre le LSR et les peptides issus de l'hydrolyse de la Lf par la trypsine et la chymotrypsine

De façon à rechercher si des produits d'hydrolyse plus petits étaient capables de conserver leur capacité à se lier au récepteur, une hydrolyse plus complète de la Lf a été réalisée (cf paragraphe 5 et Figure 33).

Les études de *ligand-blot* présentées sur la Figure 52 montrent que le mélange de produits d'hydrolyse, ainsi que le mélange de peptides recueillis dans l'éluat après passage sur membrane à seuil de coupure de 10 kDa gardent la capacité à se fixer sur la forme activée du LSR. Une analyse en spectrométrie de masse a été réalisée dans le but d'identifier les peptides présents dans l'hydrolysats peptidique. La liste des peptides identifiés est présentée en Annexe 5. Dans la mesure où cette analyse a révélé la présence d'un peptide glycosylé, et où il a été montré qu'un certain nombre de récepteurs hépatiques étaient impliqué dans l'épuration des glycoprotéines par reconnaissance de leur partie glycosylée (Pizzo *et al.*, 1981), nous avons éliminé la fraction glycosylée par précipitation à l'éthanol froid et montré par *ligand blot* que cette fraction non glycosylée gardait la capacité à se lier au LSR.

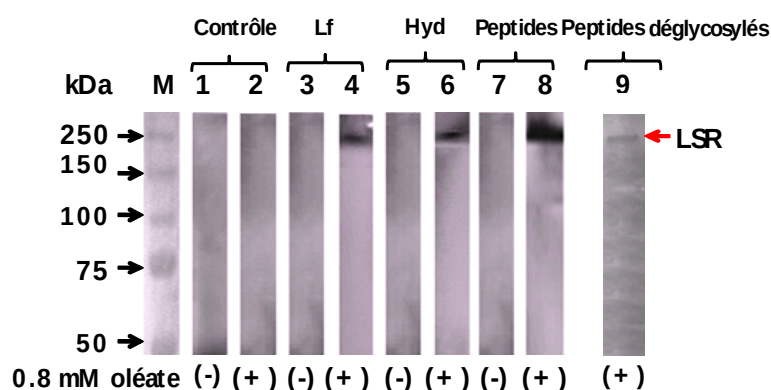


Figure 52.

Ligand blot montrant l'interaction entre les fragments d'hydrolyse de la Lf et le LSR. a) Le LSR purifié a été déposé sur un gel de SDS-PAGE à 10% en conditions non réductrices (20 µg/puits) et transféré après migration sur membrane de nitrocellulose. Après traitement de la membrane par la BSA (3%), les bandes de nitrocellulose ont été incubées 5 min à 37 °C en absence (1, 3, 5, 7) ou en présence d'oléate (2, 4, 6, 8) avec de la Lf (2 mg.mL⁻¹, en 3 et 4); le mélange de produits d'hydrolyse obtenus dans les conditions précédentes (2 mg.mL⁻¹, en 5 et 6), les peptides d'hydrolyse et peptides

déglycosylées de $MM \leq 10 \text{ kDa}$ (2 mg.mL^{-1} , en 7, 8 et 9). La révélation a été effectuée comme précédemment.

5. Discussion

Dans ce chapitre, nous avons tout d'abord vérifié que la Lf que nous avons purifiée au laboratoire augmentait la durée de la phase postprandiale, comme cela avait été montré précédemment (Huettinger *et al.*, 1988, van Dijk *et al.*, 1991). Nous avons constaté un effet plus marqué avec la Lf purifiée au laboratoire qu'avec la Lf commerciale, qui peut s'expliquer soit par le fait que la Lf commerciale renferme certaines impuretés, soit par le fait que la Lf commerciale a probablement subi différents traitements technologiques auquel n'a pas été soumise la Lf purifiée au cours de cette étude (préparation à partir de lait cru), et qui pourraient altérer certaines de ses propriétés, notamment des traitement thermiques susceptibles de dénaturer la protéine

Nous avons recherché si la Lf exerçait un effet sur l'expression ou l'activité du LSR. En effet, la Lf est une protéine relativement résistante vis-à-vis des enzymes digestives, qui peut être transportée du sérum aux noyaux des cellules, où elle régule l'expression de certains gènes cibles comme la collagénase 1 de fibroblastes ou la métalloprotéase matricielle MMP1 (Birkedal-Hansen, 1995). Les études que nous avons réalisées montrent que l'expression protéique du LSR est peu affectée, même si le taux d'ARNm varie de façon significative, dans certaines de nos conditions expérimentales, ce qui pourrait avoir une incidence sur la distribution du complexe LSR entre la membrane plasmique (expression de surface) et l'intérieur des cellules. Nous avons alors recherché si le LSR pouvait constituer l'une des protéines cibles de la Lf et les études présentées dans ce chapitre montrent, pour la première fois, que la Lf est capable de se lier au LSR. Deux approches différentes ont permis d'établir ce point. Tout d'abord, des expériences de colocalisation menées sur une lignée cellulaire d'hépatomes de souris (cellules Hepa 1-6) ont permis d'établir que la Lf colocalisait avec le LSR, lorsque celui-ci est sous sa forme activée (en présence d'oléate). En effet, l'oléate (comme d'autres AGL) permet au LSR de subir un changement conformationnel qui expose le site de liaison des lipoprotéines (Mann *et al.*, 1995). La présence d'AGL, requise pour l'activité du LSR, est cohérente avec son rôle physiologique, puisque le LSR est actif pendant la phase postprandiale, lorsque les systèmes lipasiques exercent leur action sur les TG d'origine alimentaire, entraînant la libération d'AGL. Un léger signal correspondant à un taux de colocalisation faible a cependant été observé dans les expériences conduites sans ajout

d'oléate. Ceci s'explique vraisemblablement par le fait que les cellules ont été cultivées en présence de sérum de veau fœtal, qui fournit un apport alternatif d'AGL au LSR.

Dans un deuxième temps, des expériences de *ligand-blot* ont été réalisées sur la Lf entière. Les résultats obtenus montrent que la Lf se fixe sur le récepteur, et confortent les expériences d'immunofluorescence, en ce sens que la fixation n'est détectée que lorsque le récepteur est activé par les AGL. Ceci suggère que la Lf, comme les lipoprotéines, se fixe sur un site qui n'est accessible que lorsque le changement conformationnel est réalisé, contrairement à la protéine RAP dont l'interaction avec le LSR n'est pas dépendante de la présence d'AGL (Troussard *et al.*, 1995), indiquant que Lf et RAP se lient à des sites distincts sur le LSR. Le fait que l'activation du LSR soit nécessaire pour la reconnaissance de la Lf nous a conduits à effectuer des expériences de compétition, en utilisant un type de lipoprotéine riche en TG : les VLDL. Ces expériences ont révélé que la Lf inhibait la fixation des VLDL de façon dose-dépendante. Ceci constitue un résultat intéressant qui d'une part, établit un lien entre l'interaction de la Lf avec le LSR et l'effet observé sur la lipémie postprandiale, et fournit d'autre part une première explication quant à son mécanisme d'action. Ainsi, l'effet de la Lf résulte probablement de sa compétition avec les particules lipoprotéiques pour les mêmes sites de fixation sur le récepteur, qui engendre une diminution de la capture des lipoprotéines par le LSR.

Dans le but d'identifier les régions de la Lf impliquées dans l'interaction, des expériences d'hydrolyse ménagée ont été réalisées pour isoler les domaines N et C-terminaux. En effet, des conclusions apparemment contradictoires ont été publiées dans la littérature. Ainsi, Huettinger *et al.*, (1992) ont montré que les deux lobes de la Lf se fixaient sur un récepteur hépatique avec des affinités similaires, et il a également été établi ensuite que la vitesse d'internalisation du N-lobe était 4 fois moins élevée que celle du C-lobe ou de la Lf entière (McAbee *et al.*, 1993 ; Sitaram & McAbee, 1997). Cependant, d'autres études ont proposé que l'extrémité N-terminale riche en résidus chargés positivement ressemble au site de fixation de l'apoE et pourrait constituer le site de liaison au récepteur. En particulier, la Lf humaine renferme un cluster de 4 résidus Arg en position 2-5 et une séquence riche en résidus Lys et Arg en position 25-31 (R-X-X-R-K-X-R). Sur la base de modifications chimiques, des études, réalisées sur des cellules parenchymales, avaient conclu que les résidus Arg du N-terminal étaient cruciaux pour la reconnaissance de la Lf par le récepteur (Huettinger *et al.*, 1992, Ziere *et al.*, 1992). D'après Huettinger *et al.*, une digestion ménagée par la trypsine clivant le cluster d'Arg en position 2-5, mais laissant la séquence 25-31 intacte, abolit l'effet

inhibiteur de la Lf sur l'internalisation des remnants alors qu'une étude de Ziery *et al* (1993) a conclu qu'une Lf tronquée des 14 premiers résidus était un compétiteur plus efficace que la Lf entière vis-à-vis de la capture des remnants. Les expériences de *ligand-blot* que nous avons réalisées montrent que les deux domaines N et C-terminaux ont chacun, la capacité de se fixer au LSR sous forme activée. Il convient de rappeler que nous avons travaillé avec de la Lf d'origine bovine, qui possède une séquence RK à la place du cluster de 4 résidus Arg en 2-5. De plus, sa séquence en position 25-31 (WRMKKLG) diverge de la séquence de Lf humaine. Cette observation, couplée au fait que les 2 lobes N et C-terminaux sont reconnus par le récepteur, exclut un rôle crucial du cluster de 4 Arg et suggère qu'au moins 2 types de séquences ou de motifs structuraux sont reconnus. De plus, le fait que le mélange de peptides de tailles modestes, issus de la double hydrolyse par la trypsine et la chymotrypsine, conserve la capacité à se lier au récepteur, suggère que la reconnaissance soit séquence-dépendante et non pas conformation-dépendante. L'analyse par spectrométrie de masse du mélange de peptides montre que si des peptides renfermant des résidus basiques provenant du N-lobe sont retrouvés dans l'hydrolysate, aucun peptide basique provenant du C-terminal n'est retrouvé, suggérant que l'interaction fait appel à d'autres critères qu'une séquence basique. Enfin, le fait que le mélange de peptides conserve sa propriété de fixation au récepteur après élimination des fragments glycosylés nous permet de conclure que la reconnaissance est basée uniquement sur la séquence peptidique et non pas sur la reconnaissance de structures glycaniques.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'élévation de la lipémie postprandiale suite à l'injection par voie i.v. de Lf est due à l'accumulation de résidus de chylomicrons (remnants) dans la circulation et d'une épuration moins efficace de ces particules par le foie (Huettinger *et al.*, 1988). Ceci a conduit à de nombreux travaux dont l'objectif étaient l'élucider les mécanismes moléculaires impliqués ainsi que le récepteur par lequel ces effets étaient médiés. Cependant, la Lf possède de nombreuses activités biologiques, et donc de l'affinité pour un grand nombre de protéines présentes à la surface cellulaire, ce qui rendait cet objectif difficile à atteindre (Suzuki & Lonnerdal, 2002; Suzuki *et al.*, 2005). Au niveau hépatique, diverses études ont montré l'association de la Lf avec le LRP1, le récepteur des asialoglycoprotéines, ou l'héparane sulfate (Ji & Mahley, 1994; McAbee *et al.*, 2000). Parmi ces protéines, le LRP1 était un candidat potentiel, mais il a été démontré ensuite que ce récepteur ne jouait qu'un rôle mineur (« back-up ») dans l'épuration de ces particules. De plus, la protéine GST-RAP, un inhibiteur du LRP1, ne modifie pas l'effet de la Lf sur la fixation des particules de type VLDL aux cellules hépatiques, conduisant à la conclusion que l'effet de la Lf n'était médié ni par le LRP1, ni le LDL-R. Toutes ces études ont été réalisées jusqu'alors sur des modèles cellulaires ou des extraits tissulaires et n'ont pu aboutir à l'identification du récepteur. En parallèle à ces travaux, un nouveau récepteur, le LSR, a été identifié et caractérisé comme présentant de fortes affinités pour les lipoprotéines riches en TG (VLDL et chylomicrons) et comme étant impliqué dans leur capture, internalisation et dégradation (Stenger *et al.*, 2012). Le LSR étant le récepteur principal impliqué dans la régulation de la lipémie postprandiale par la capture des chylomicrons et de leurs remnants, nous avons recherché si le LSR pouvait constituer l'une des cibles de la Lf. La Lf ayant par ailleurs la capacité de se lier avec des affinités variables à différentes protéines de cellules hépatiques, nous avons choisi de travailler sur du LSR purifié afin d'éviter toute ambiguïté d'interprétation. Au cours de ce travail de thèse, nous avons montré que la Lf n'affectait pas le taux d'expression du LSR, et montré pour la première fois que la Lf, comme ses produits d'hydrolyse, était capable de se fixer sur la forme activée du récepteur. De plus, nous avons déterminé que la Lf entraînait en compétition avec les VLDL pour la fixation sur le récepteur, et proposé que l'élévation de la lipémie postprandiale après un traitement par la Lf soit médiée, au moins en partie, par son interaction avec le LSR, qui engendrerait une inhibition de l'épuration des chylomicrons et de leurs remnants par cette voie.

Le fait qu'un mélange de peptides de relativement petite taille, issus d'un double hydrolyse par la trypsine et chymotrypsine conserve la capacité à se fixer au récepteur est une observation intéressante, qui suggère que des produits d'hydrolyse de la Lf obtenus dans le

cadre d'un processus normal de digestion, par exemple après consommation de produits laitiers, seraient susceptibles de moduler l'activité du LSR à condition qu'ils soient capables d'atteindre cette cible. Les études futures s'engagent donc dans deux directions distinctes :

- une étude *in vivo* qui consisterait à administrer de la Lf par voie orale à des souris et à suivre l'effet sur la lipémie post-prandiale. De premiers essais réalisés par Delphine Lambert dans le cadre de son stage de Master 2 montre qu'une injection intrapéritonéale de Lf donne des résultats similaires à l'injection par voie *i.v.*, ce qui facilitera la vérification de l'activité biologique de la Lf ou de ses produits d'hydrolyse *in vivo*. Toutefois, les premiers essais d'administration par voie orale n'ont pas été concluants et mériteraient d'être poursuivis à plus grande échelle, ou sur des temps plus longs, en suivant également la prise de poids *versus* un groupe témoin. Une collaboration devrait débuter prochainement avec le Pr Hans-Jürgen Danneel, de la Fachhochschule Ostwestfalen-Lippe, qui a développé un système de séparation des protéines et des peptides à grande échelle, et pourrait nous fournir aussi bien de grandes quantités de Lf pure (qui sera préparée à partir de fractions de protéines lactosériques enrichies en Lf) que différentes fractions des peptides issus de ses produits d'hydrolyse. Cette étude devrait nous apporter une meilleure compréhension de l'influence de la consommation de la Lf sur la disponibilité des lipides pendant la phase postprandiale, et permettre de définir de nouvelles approches nutritionnelles afin d'optimiser l'apport lipidique vers les différents tissus dans les populations ciblées. En effet, bien qu'une alimentation riche en lipides soit disponible dans le monde industrialisé d'aujourd'hui, certaines populations à risques pourraient bénéficier d'un apport lipidique plus important. Ainsi, la survie et la croissance accélérée de nouveau-nés prématurés dépendent d'une augmentation d'apports caloriques sous forme de lipides. Les personnes âgées et les patients qui ont subi une intervention chirurgicale sont sujets à une perte de poids importante, souvent associée à un dysfonctionnement du système immunitaire et à une diminution des chances de survie. Les études sur la régulation de la disponibilité des lipides permettront le développement de nouvelles stratégies nutritionnelles – supplément alimentaire ou nutraceutique – afin d'augmenter l'efficacité de l'utilisation ou le stockage de ces substrats énergétiques chez ces patients. D'autre part, la Lf étant commercialisée comme complément alimentaire, on peut s'interroger sur les effets d'une consommation régulière de lactoferrine par des populations souffrant d'obésité et présentant des complications cardiovasculaires.

- Une étude *in vitro*, visant à caractériser le ou les peptides impliqués dans l'interaction avec le LSR. Les analyses de spectrométrie de masse ont révélé qu'un nombre important de

peptides était présent dans la fraction obtenue après la double hydrolyse. L'objectif serait donc de préparer à nouveau un hydrolysate dans les mêmes conditions, mais à plus grande échelle, de réaliser son fractionnement, et de reprendre les études d'interaction avec le LSR afin tout d'abord de déterminer quelle fraction possède la capacité de se fixer au récepteur, et finalement quel peptide est responsable de l'interaction.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Acton S., Rigotti A., Landschulz K.T. Xu S., Hobbs H. H. & Krieger M. (1996). Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science*; 271:518-520
- Adiels M. Olofsson S. O., Taskinen M. R. & Boren J. (2006). Diabetic dyslipidaemia. *Curr Opin Lipidol*; 17:238-246
- Alberti G. (2005). Introduction to the metabolic syndrome. *Eur Heart J Suppl*; 7: D3-D5
- Alberti K. G., Zimmet P. & Shaw J. (2006). Metabolic syndrome- a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. *Diabet Med*; 23:469-480
- Allayee H., Castellani L. W., Cantor R. M., de Bruin T. W. ALusis A. J. (2003). Biochemical and genetic association of plasma apolipoprotein A-II levels with familial combined hyperlipidemia. *Circ Res*; 92:1262-1267
- Andersen O. M., Reiche J., Schmidt V., Gotthardt M., Spoelgen R., Behlke J., von Arnim C. A., Breiderhoff T., Jansen P., Wu X., Bales K. R., Cappai R., Masters C. L., Gliemann J., Mufson E. J., Hyman B. T., Paul S. M., Nykjaer A. & Willnow T. E. (2005). Neuronal sorting protein-related receptor sorLA/LR11 regulates processing of the amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 102: 13461-13466
- Andersen O. M., Schmidt V., Spoelgen R., Gliemann J., Behlke J., Galatis D., McKinstry W. J., Parker M. W., Masters C. L., Hyman B. T., Cappai R. & Willnow T. E. (2006). Molecular dissection of the interaction between amyloid precursor protein and its neuronal trafficking receptor SorLA/LR11. *Biochem*; 45:2618-2628
- Antikainen M. Holmberg C., Olivecrona T., Bengtsson-Olivecrona G., Labeur C., Rosseneu M. & Taskinen M-R. (1993). Changes in biological activity and immunoreactive mass of lipoprotein lipase in congenital nephrosis: relationship to hypertriglyceridaemia. *Eur J Clin Invest*; 23:368-374
- Arbeeny C. M. & Rifici V. A. (1984). The uptake of chylomicron remnants and very low density lipoprotein remnants by the perfused rat liver. *J Biol Chem*; 259:9662-9666
- Areschoug T. & Gordon S. (2009). Scavenger receptors: role in innate immunity and microbial pathogenesis. *Cell Microbiol*; 11:1160-1169
- Armstrong V.W., Cremer P., Eberle E., Manke A., Schulze F., Wieland H., Kreuzer H. & Seidel D. (1986). The association between serum Lp (a) concentrations and angiographically assessed coronary atherosclerosis. Dependence on serum LDL levels. *Atherosclerosis*; 62:249-257
- Ashida K., Sasaki H., Yasushi A. & Lönnerdal B. S. (2004). Cellular internalization of lactoferrin in intestinal epithelial cells. *Biometals*; 17:311-315
- Asp L., Magnusson B., Rutberg M., Li L., Boren J. & Olofsson S.O. (2005). Role of ADP ribosylation factor 1 in the assembly and secretion of ApoB-100 containing lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 25:566-570
- Baier L. J., Wiedrich C., Dobberfuhr A., Traurig M., Thuillez P., Bogardus C. & Hanson R. 1998. Sequence analysis of candidate genes in a region of chromosome 1 linked to type 2 diabetes. *Diabetes*; 47: A171

- Baker E. N., Rumball S. V. & Anderson B. F. (1987). Transferrins: insights into structure and function from studies on lactoferrin. *Trends Biochem Sci*; 12:350-353
- Baker E. N. (1994). Structure and reactivity of transferrins. *Adv Inorg Chem*; 41:389-463
- Baker E. N., Anderson B. F., Baker H. M., MacGillivray R. T. A., 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 Lactoferrin Res*; 443: 1-14
- Baker E. N., Baker H. M. & Kidd R. D. (2002). Lactoferrin and transferrin: Functional variations on a common structural framework. *Biochem Cell Biol*; 80:27-34
- Baker H. M., Baker E. B. (2004). Lactoferrin and Iron: structural and dynamic aspects of binding and release. *BioMetals*; 17:209-216
- Baker E. N. & Baker H. M. (2005). Molecular structure, binding properties and dynamics of lactoferrin. *Cell Mol Life Sci*; 62:2531-2539
- Barbaras R., Puchois P., Grimaldi P., Barkia A., Fruchart J. C. & Ailhaud G. (1987). Purification of an apolipoprotein A binding protein from mouse adipose cells. *Biochem Biophys Res Commun*; 149:545-554
- Barth J. L. & Argraves W. S. (2001). Cubilin and megalin: partners in lipoprotein and vitamin metabolism. *Trends Cardiovasc Med*; 11: 26-31
- Beffert U., Weeber E. J., Durudas A., Qiu S., Masiulis I., Sweatt J. D., Li W. P., Adelmann G., Frotscher M., Hammer R. E. & Herz J. (2005). Modulation of synaptic plasticity and memory by Reelin involves differential splicing of the lipoprotein receptor Apoer2. *Neuron*; 47:567-579
- Bellamy W., Takase M., Wakabayashi H., Kawase K. & Tomita M. (1992a). Antibacterial spectrum of lactoferricin B, a potent bactericidal peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. *J Appl Bacteriol*; 73:472-479
- Bellamy W., Takase M., Yamauchi K., Wakabayashi H., Kawase K. & Tomita M. (1992b). Identification of the bactericidal domain of lactoferrin. *Biochim Biophys Acta*; 1121:130-136
- Benaïssa M., Peyrat J. P. & Hornez L. (2005). Expression and prognostic value of lactoferrin mRNA isoforms in human breast cancer. *Int J Cancer*; 114:299-306
- Bihain B. E., & Yen F. T. (1992). Free Fatty Acids Activate a High-Affinity Saturable Pathway for Degradation of Low-Density Lipoproteins in Fibroblasts from a Subject Homozygous for Familial hypercholesterolemia. *Biochem*; 31:4628-4636
- Bihain B. E. & Yen F. T. (1998). The lipolysis stimulated receptor: A gene at last. *Curr Opin Lipidol*; 9:221-224
- Birkedal-Hansen H. (1995). Proteolytic remodeling of extracellular matrix. *Curr Opin Cell Biol*; 7:728-35
- Boren J., Graham L., Wettsten M., Scott J., White A. & Olofsson S. O. (1992). The assembly and secretion of ApoB 100-containing lipoproteins in Hep G2 cells. ApoB 100 is cotranslationally integrated into lipoproteins. *J Biol Chem*; 267:9858-9867

Bostrom K., Boren J., Wettsten M., Sjoberg A., Bondjers G., Wiklund O., Carlsson P. & Olofsson S. O. (1988). Studies on the assembly of apoB-100 containing lipoproteins in HepG2 cells. *J Biol Chem*; 263:4434-4442

Boucher P., Liu P., Gotthardt M., Hiesberger T., Anderson R.G. & Herz J. (2002). Platelet-derived growth factor mediates tyrosine phosphorylation of the cytoplasmic domain of the low density lipoprotein receptor-related protein in caveolae. *J Biol Chem*; 277:15507-15513

Bradford M. M. (1976). Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*; 72:248-254

Bray G. A. & Gray D. S. (1988). Obesity Part I: Pathogenesis. *West J Med*; 149:429-441

Breslow J. L. (1995). Familial disorders of high density lipoprotein metabolism. In: Scriver C. R., Beaudet A. L., Sly W. S. & Valle D., editors. The metabolic and molecular basis of inherited disease. 7th ed. New York; McGraw-Hill:Page No.2031-2052

Brewer H. B., Jr, Lux S. E., Ronan R. & John K. M. (1972). Amino acid sequence of human apoLp-Gln-II (apoA-II), an apolipoprotein isolated from the high-density lipoprotein complex. *Proc Natl Acad Sci USA*; 69:1304-1308

Brewer H. B., Jr, Shulman R., Herbert P., Ronan R. & Wehrly K. (1974). The complete amino acid sequence of alanine apolipoprotein (apo C-3), an apolipoprotein from human plasma very low density lipoproteins. *J Biol Chem*; 249: 4975-4984

Brines R. D. & Brock J. H. (1983). The effect of trypsin and chymotrypsin on the in vitro antimicrobial and iron-binding properties of lactoferrin in human milk and bovine colostrums: unusual resistance of human apolactoferrin to proteolytic digestion. *Biochim Biophys Acta*; 759:229-235

Britigan B. E., Lewis T. S., Waldschmidt M., McCormick M. L. & Krieg, A. M. (2001). Lactoferrin binds CpG-containing oligonucleotides and inhibits their immunostimulatory effects on human B cells. *J Immunol*; 167:2921-2928

Brock J. H., Arzabe F., Lampreave F. & Piñeiro A. (1976). The effect of trypsin on bovine transferrin and lactoferrin. *Biochimica et Biophysica Acta*; 446:214-225

Brown S. D., Twells R. C., Hey P. J., Cox R. D., Levy E. R., Soderman A. R., Metzker M. L., Caskey C. T., Todd J. A. & Hess J. F. (1998). Isolation and characterization of LRP6, a novel member of the low density lipoprotein receptor gene family. *Biochem Biophys Res Commun*; 248: 879-888

Bujo H., Hermann M., Lindstedt K. A., Nimpf J. & Schneider W. J. (1997). Low density lipoprotein receptor gene family members mediate yolk deposition. *J Nutr*; 127:801S-804S

Cahill G. F. (2006). Fuel metabolism in starvation. *Annu Rev Nutr*; 26:1-22

Capell W. H., Zambon A., Austin M. A., Brunzell J. D. & Hokanson J. E. (1996). Compositional differences of LDL particles in normal subjects with LDL subclass phenotype A and LDL subclass phenotype B. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 16:1040-1060

- Castellani L.W., Navab M., Van Lenten B. J., Hedrick C. C., Hama S. Y., Goto A. M., Fogelman A. M. & Lusis A. J. (1997). Overexpression of apolipoprotein A-II in transgenic mice converts high density lipoproteins to pro-inflammatory particles. *J Clin Invest*; 100:464-474
- Castellani L.W., Goto A. M. & Lusis A. J. (2001). Studies with apolipoprotein A-II transgenic mice indicate a role for HDLs in adiposity and insulin resistance. *Diabetes*; 50:643-651
- Castellani, L.W., Gargalovic, P., Febbraio, M., Charugundla, S., Jien, M. L., and Lusis, A. J. (2004). Mechanisms mediating insulin resistance in transgenic mice overexpressing mouse apolipoprotein A-II. *J. Lipid Res*; 45:2377-2387
- Castellani L.W., Nguyen C. N., Charugundla S., Weinstein M. M., Doan C. X., Blaner W. S., Wongsiriroj N. & Lusis A. J. (2008). Apolipoprotein AII is a regulator of very low density lipoprotein metabolism and insulin resistance. *J Biol Chem*; 283:11633-11644
- Catapano A. L., Kinnunen P. K. J., Breckenridge W. C., Gotto A. M., Jr., Jackson R. L., Little J. A., Smith L. C. & Sparrow J. T. (1979). Lipolysis of apoC-II deficient very low density lipoproteins: enhancement of lipoprotein lipase action by synthetic fragments of apoC-II. *Biochem Biophys Res Commun*; 89:951-957
- Cerne D., Kaplan-Pavlovic S., Kranjec I. & Jurgens G. (2000). Mildly elevated serum creatinine concentration correlates with the extent of coronary atherosclerosis. *Ren Fail*; 22:799-808
- Chan D. C., Watts G. F., Barrett P. H., Mamo C. L. & Redgrave T.G. (2002). Markers of triglyceride-rich lipoprotein remnant metabolism in visceral obesity. *Clin Chem*; 48:278-283
- Chung B. H. J. P., Segrest, K. Smith, F. M. Griffin & Brouillette C. G. (1989). Lipolytic surface remnants of triglyceride-rich lipoproteins are cytotoxic to macrophages but not in the presence of high density lipoprotein. A possible mechanism of atherogenesis? *J Clin Invest*; 83:1363-1374
- Coddeville B., Strecker G., Wieruszeski J. M., Vliegenthart J. F., van Halbeek H., Peterkatalinic J., Egge H. & Spik G. (1992). Heterogeneity of bovine lactotransferrin glycans. Characterization of α -Galp-(1 $\rightarrow$ 3)- β -Gal- and α NeuAc-(2 $\rightarrow$ 6)- β GalpNAc-(1 $\rightarrow$ 4)- β -GlcNAc-substituted N-linked glycans. *Carbohydr Res*; 236:145-164
- Collet X., Tall A., Serajuddin H., Guendouzi K., Royer L., Oliveira H., Barbaras R., Jiang X. & Franccone O. (1999). Remodeling of HDL by CETP in vivo and by CETP and hepatic lipase in vitro results in enhanced uptake of HDL CE by cells expressing scavenger receptor BI. *J Lipid Res*; 40:1185-1193
- Cooper A. D., Erickson S. K., Nutik R., & Shrewsbury M. A. (1982). Characterization of chylomicron remnant binding to rat liver membranes. *J Lipid Res*; 23:42-52
- Cooper G. R., Henderson L. O., Smith S. J. & Hannon W. H. (1991). Clinical applications and standardization of apolipoprotein measurements in the diagnostic workup of lipid disorders. *Clin. Chem*; 37: 619-620
- Cornish J., Palmano K. & Callon K. E. (2006). Lactoferrin and bone; structure-activity relationships. *Biochem Cell Biol*; 84:297-302

- Crawford S. E. & Borensztajn J. (1999). Plasma clearance and liver uptake of chylomicron remnants generated by hepatic lipase lipolysis: evidence for a lactoferrin-sensitive and apolipoprotein E-independent pathway. *J Lipid Res*; 40:797-805
- Criqui M. H., Heiss G. & Cohn R. (1993). Plasma triglyceride level and mortality from coronary heart disease. *N Engl J Med*; 328:1220-1225
- Cummings M. H., Watts G. F., Umpleby M., Hennessy T. R., Quiney J. R. & Sönksen P. H. (1995). Increased hepatic secretion of very low density lipoprotein apolipoprotein B-100 in heterozygous familial hypercholesterolaemia: a stable isotope study. *Atherosclerosis*; 113:79-89
- Daly N. L., Djordjevic J.T., Kroon P.A. & Smith R. (1995). Three dimensional structure of the second cysteine-rich repeat from the human low-density lipoprotein receptor. *Biochem*; 34:14474-14481
- 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*; 47:486-498
- Davignon J., Gregg R. E. & Sing C. F. (1988). Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. *Arteriosclerosis*; 8:1-21
- De la Rosa G., Yang D., Tewary P., Varadhachary A. & Oppenheim J. J. (2008). Lactoferrin acts as an alarmin to promote the recruitment and activation of APCs and antigen-specific immune responses. *J Immunol*; 180:6868-6876
- Deckelbaum R. J., Granot E., Oschry Y., Rose L. & Eisenberg S. (1984). Plasma triglyceride determines structure-composition in low and high density lipoproteins. *Arteriosclerosis*; 4:225-231
- Duell P. B. (1999). Diabetes mellitus. In: Betteridge D. J., Illingworth D. R., Shepherd J., editors. *Lipoproteins in heart and disease*. London; Arnold: Page No.897-929
- Durrington P. N., Hunt L., Ishola M., Kane J. P. & Stephens W. P. (1986). Serum apolipoproteins AI and B and lipoprotein in middle-aged men with and without previous myocardial infarction. *Br Heart J*; 56:206-212
- Durrington P. N. (1995). Hyperlipidaemia: diagnosis and management. 2nd ed. Oxford: Butterworth Heinemann
- Eda S., Kikugawa K. & Beppu M. (1997). Characterization of lactoferrin-binding proteins of human macrophage membrane: multiple species of lactoferrin-binding proteins with polylactosamine-binding ability. *Biol Pharm Bull*; 20:127-133
- Egito A. S., Girardet J. M., Miclo L. & Gaillard J. L. (2001). Highly sensitive periodic acid/Schiff detection of bovine milk glycoproteins electrotransferred after nondenaturing electrophoresis, urea electrophoresis, and isoelectric focusing. *Le Lait*; 81:775-785
- Egito A. S., Miclo L., López C., Adam A., Girardet J. M. & Gaillard J. L. (2002). Separation and characterization of mare's milk α s1, β -, κ -caseins, γ -casein-like, and proteose peptone components 5-like peptides. *J Dairy Sci*; 85:697-706

- Ehnholm C., Garoff H., Renkonen O. & Simons K. (1972). Protein and carbohydrate composition of Lp(a) lipoprotein from human plasma. *Biochem*; 11:3229-3232
- Eisenberg S. (1984). High density lipoprotein metabolism. *J Lipid Res*; 25: 1017-1058
- Elass-Rochard E., Roseanu A., Legrand D., Salmon V., Motas C., Montreuil J. & Spik G. (1995). Lactoferrin-lipopolysaccharide interaction: involvement of the 28±34 loop region of human lactoferrin in the high-affinity binding to Escherichia coli 055B5 lipopolysaccharide. *Biochem J*; 312:839-845
- Elbein S. C., Yount P. A., Teng K. & Hasstedt S. J. (1998). Genome-wide search for type 2 diabetes susceptibility genes in Caucasians: evidence for a recessive locus on chromosome 1. *Diabetes*; 47:A15
- Enriori P. J., Evans A. E., Sinnayah P. & Cowley M. A. (2006). Leptin resistance and obesity. *Obesity*; 14:254S-258S
- Epstein F. H. & Higgins M. (1992). Epidemiology of obesity. In: Bjorntorp P. & Brodoff B. N., editors. Obesity. Philadelphia; Lippincott Co: Page No.230-342
- Fagot-Campagna A., Rolka D. B., Beckles G. L., Gregg E. W. & Narayan K. M. (2000). Prevalence of lipid abnormalities, awareness, and treatment in U.S. adults with diabetes. *Diabetes*; 49:A78-A79
- Fayanne E. Thorngate & David L. Williams. http://www.morphology.dp.ua/_dict/?wid=770
- Fee J. C. & Chand A. (2006). Capture of lactoferrin, and lactoperoxidase from raw whole milk by cation exchange chromatography. *Sep Puri Tech*; 48:143-149
- Fisher W. R., Zech L. A., Kilgore L. L. & Stacpoole P. W. (1991). Metabolic pathways of apolipoprotein B in heterozygous familial hypercholesterolemia: studies with a [3H] leucine tracer. *J Lipid Res*; 32:1823-1836
- Fleet J. C. (1995). A new role for lactoferrin: DNA binding and transcription activation. *Nutr Rev*; 53:226-231
- Fojo S. S. & Brewer H. B. (1991). The Familial hyperchylomicronemia syndrome: new insights into underlying genetic defects. *JAMA*; 265:904-908
- Fojo S. S., Beg O., Dichek H., Brewer H. B. & Jr. (1992). The molecular defects in lipoprotein lipase deficient patients. *Eur J Epidemiol*; 8:59-63
- Fransson G. B. & Lonnerdal B. (1983). Distribution of trace-elements and minerals in human and cows milk. *Pédiatrie Research*; 77:912-915
- Fraser I., Hughes D., Gordon S. (1993). Divalent cation-independent macrophage adhesion inhibited by monoclonal antibody to murine scavenger receptor. *Nature*; 364:343-346
- Friedman J. M. (2000). Obesity in the new millennium. *Nature*; 404:401-405
- Garcia C. K., Wilund K., Arca M., Zuliani G., Fellin R., Maioli M., Calandra S., Bertolini S., Cossu F., Grishin N., Barnes R., Cohen J. C. & Hobbs H. H. (2001). Autosomal recessive hypercholesterolemia caused by mutations in a putative LDL receptor adaptor protein. *Science*; 292:1394-1398
- 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

Gaubatz J. W., Heideman C., Gotto A. M., Jr, Morrisett J. D. & Dahlen G. H. (1983). Human plasma lipoprotein [a]. Structural properties. *J Biol Chem*; 258:4582-4589

Gaubatz J. W., Ghanem K. I., Guevara J., Nava M. L., Patsch W., & Morrisett J. D. (1990). Polymorphic forms of human apoprotein (a): inheritance and relationship of their molecular weights to plasma levels of lipoprotein (a). *J Lipid Res*; 31:603-613

Ginsberg H. N., Le N. A., Goldberg I. J., Gibson J. C., Rubinstein A., Wang-Iverson P., Norum N. & Brown W. V. (1986). Apolipoprotein B metabolism in subjects with deficiency of apolipoproteins CIII and AI. Evidence that apolipoprotein CIII inhibits catabolism of triglyceride-rich lipoproteins by lipoprotein lipase in vivo. *J Clin Invest*; 78:1287-1295

Girardet J. M., N'Negue M. A., Egito A. S., Campagna S., Lagrange A. & Gaillard J. L. (2004). Multiple forms for equine α lactalbumin: evidence of N-glycosylated and deamidated forms. *Int Dairy J*; 14:207-217

Girardet J.-M., Miclo L., Florent S., Mollé D. & Gaillard J.-L. (2006). Determination of the phosphorylation level and deamidation susceptibility of equine β -casein. *Proteomics*; 6:3707-3717

Goldberg I. J. (1996). Lipoprotein lipase and lipolysis: central roles in lipoprotein metabolism and atherogenesis. *J Lipid Res*; 37:693-707

Goldstein J. L., Hobbs H. H. Brown M. S. (2001). Familial hypercholesterolemia. In Scriver C. R., Beaudet A. L. Sly W. S. Editors. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 8th ed. New York; McGraw-Hill, Page No. 2863-2913

Grant B. & Hirsh D. (1999). Receptor-mediated endocytosis in the caenorhabditis elegans Oocyte. *Mol Biol Cell*; 10:4311-4326

Groves M. L. (1960). The isolation of a red protein from milk. *J Am Chem Soc*; 52:3345-3350

Haas J., Beer A.G., Widschwendter P., Oberdanner J., Salzmann K., Sarg B., Lindner H., Herz J., Patsch J.R. & Marschanga P. (2011). LRP1b shows restricted expression in human tissues and binds to several extracellular ligands, including fibrinogen and apoE carrying lipoproteins. *Atherosclerosis*; 216:342-347

Hamilton R. L. (1983). In *Plasma Protein Secretion by the Liver*. Peters H., Redman T. & Glaumann C., editors. Academic, London; Page No. 357-374

Hamsten A., Silveira A., Boquist S., Tang R., Bond G., de Faire U. & Björkegren J. (2005). The Apolipoprotein CI Content of Triglyceride-Rich Lipoproteins Independently Predicts Early Atherosclerosis in Healthy Middle-Aged Men. *ACC*; 45:1013-1017

Hansel B., Giral P., Nobecourt E., Chantepie S., Bruckert E., Chapman M. J. & Kontush A. (2004). Metabolic syndrome is associated with elevated oxidative stress and dysfunctional dense high-density lipoprotein particles displaying impaired antioxidative activity. *J Clin Endocrinol Metab*; 89:4963-4971

- Harada E, Itoh Y, Sitizyo K, Takeuchi T, Araki Y & Kitagawa H (1999a). Characteristic transport of lactoferrin from the intestinal lumen into the bile via the blood in piglets. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*; 124:321-327
- Hashimoto, Hirose K., Sato T., Fukushima N., Miura N. & Nishimura S.-I. (2010). Functional network of glycan-related molecules: Glyco-Net in Glycoconjugate Data Bank. Ryo. *BMC Systems Biology*; 4:91
- Havel R. J., Shore V. G., Shore B. & Bier D. M. (1970). Role of specific glycopeptides of human serum lipoproteins in the activation of lipoprotein lipase. *Circ Res*; 17:595-600
- Havel R. J. (1984). The formation of LDL: mechanisms and regulation. *J Lipid Res*; 25:1570-1576
- Havel R. J. & Kane J. P. (1995). Introduction: structure and metabolism of plasma lipoproteins. In: Scriver C. R., Beaudet A. L., Sly W. S. & Valle D., editors. The metabolic and molecular basis of inherited disease. 7th ed. New York; McGraw-Hill:Page No.1841-1851
- Havel R. J. (2010). Triglyceride-Rich Lipoproteins and Plasma Lipid Transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 30:9-19
- He J & Furmanski P. (1995). Sequence specificity and transcriptional activation in the binding of lactoferrin to DNA. *Nature*; 373:721-724
- Hedrick C. C., Castellani L. W., Warden C. H., Puppione D. L. & Lusis A. J. (1993). Influence of mouse apolipoprotein A-II on plasma lipoproteins in transgenic mice. *J Biol Chem*; 268:20676-20682
- Hendrixson D. R., Qiu J., Shewry S. C., Fink D. L., Petty S., Baker E. N., Plaut A. G. & StGeme J. W. (2003). Human milk lactoferrin is a serine protease that cleaves Haemophilus surface proteins at arginine-rich sites. *Mol Microbiol*; 47: 607-617
- Hennart P. F., Brasseur D. J., Delognedesnoeck 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*; 55:32-39
- Hennig B. & Chow C. K. (1988). Lipid peroxidation and endothelial cell injury: implications in atherosclerosis. *Free Radic Biol Med*; 4:99-106
- Herbert B. R., Molloy M. P., Gooley A. A., Walsh B. J., Bryson W. G. & Williams K. L. (1998). Improved protein solubilization in 2-D electrophoresis using tributyl phosphine as reducing agent. *Electrophoresis*; 19:845-851
- Herbsleb M., Birkenkamp-Demtroder K., Thykjaer T., Wiuf C., Hein N. M., Forntoft T. & Dyrskjot L. (2008). Increased cell motility and invasion upon knockdown of lipolysis stimulated lipoprotein receptor (LSR) in SW780 bladder cancer cells. *BMC Medical Genomics*; 10:1755-8794
- Herz J., Chen Y., Masiulis J. & Zhou L. (2009). Expanding functions of lipoprotein receptors. *J Lip Res*; 50:S287-S292
- Hiltunen T. P., Gough P.J., Greaves D. R., Gordon S. & Ylä-Herttuala S. (2001). Rabbit atherosclerotic lesions express scavenger receptor AIII mRNA, a naturally occurring splice variant that

encodes a non-functional, dominant negative form of the macrophage scavenger receptor. *Atherosclerosis*; 154:415-419

Hodis H. N., Mack W. J. Krauss R. M. (1999). Pathophysiology of triglyceride-rich lipoproteins in atherothrombosis, clinical aspects. *Clin Cardiol*; 22:II15-II20

Hofmann S. M., Zhou L., Perez-Tilve D., Greer T., Grant E., Wancata L., Thomas A., Pfluger P.T., Basford J. E., Gilham D., Herz J., Tschop, M. H. & Hui D. Y. (2007). Adipocyte LDL receptor-related protein-1 expression modulates postprandial lipid transport and glucose homeostasis in mice. *J Clin Invest*; 117:3271-3282

Hokanson J. E. & Austin M. A. (1996). Plasma triglyceride level is a risk factor for cardiovascular disease independent of high-density lipoprotein cholesterol level: a meta-analysis of population-based prospective studies. *J Cardiovasc Risk*; 3:213-219

Hu W. L., Mazurier J., Sawatzki G., Montreuil J. & Spik G. (1988). Lactoferrin receptor of mouse small-intestinal brush border. Binding characteristics of membrane-bound and Triton X-100-solubilized forms. *Biochem J*; 249:435-441

Hu W. L., Mazurier J., Montreuil J. & Spik G. (1990). Isolation and partial characterization of a lactotransferrin receptor from mouse intestinal brush border. *Biochem*; 29:535-541

Huettinger M., Retzek H., Eder M. & Goldenberg H. (1988). Characteristics of chylomicronremnant uptake into rat liver. *Clin Biochem*; 21:87-92

Huettinger H., Retzek H., Hermann H. & Goldenberg H. (1992). Lactoferrin specifically inhibits endocytosis of chylomicron remnants but not alpha-macroglobulin. *J Biol Chem*; 267:18551-18557

Hulthe J., Bokemark L., Wikstrand J. & Fagerberg B. (2000). The metabolic syndrome, LDLparticle size, and atherosclerosis. The atherosclerosis and insulin resistance (AIR) study. *Arterioscl Thromb Vasc Biol*; 20:2140-2147

Hussain M. M., Kedees M. H., Singh K., Athar H. & Jamali N. Z. (2001). Signposts in the assembly of chylomicrons. *Front Biosci*; 6: D320-D331

Hutchens T. W., Rumball S. V. & Lonnerdal B. (1994). Lactoferrin: Structure and function. *Adv Exp Med Biol*; 357:21-32

Hwang S. A. & Actor J. K. (2009). Lactoferrin modulates BCG infected dendritic cell functions. *Int Immunol*; 21:1185-1197

Indyka H. E. & Filonz E. L. (2005). Determination of lactoferrin in bovine milk, colostrum and infant formulas by optical biosensor analysis. *Int Dairy J*; 15:429-438

Isomaa B., Almgren P. & Tuomi T. (2001). Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. *Diabetes Care*; 24:683-690

Ito Y., Azrolan N., O'Connell A., Walsh A., & Breslow J. L. (1990). Hypertriglyceridemia as a result of human apo CIII gene expression in transgenic mice. *Science*; 249:790-793

Iwamaru Y., Shimizu Y. Imamura M. (2008). Lactoferrin induces cell surface retention of prion protein and inhibits prion accumulation. *J Neurochem*; 107:636-646

Jackson R. L., Sparrow J. T., Baker H. N., Morrisett J. D., Taunton O. D. & Gotto A. M. (1974). The primary structure of apolipoprotein serine. *J Biol Chem*; 249:5308-5313

Jackson R. L., Baker H. N., Gilliam E. B., Gotto A. M. & Jr. (1977). Primary structure of very low density apolipoprotein C-II of human plasma. *Proc Natl Acad Sci USA*; 74:1942-1950

Jacobsen, L., Madsen, P., Jacobsen, C., Nielsen, M.S., Gliemann, J., and Petersen, C.M. (2001). Activation and functional characterization of the mosaic receptor SorLA/LR11. *J Biol Chem*; 276:22788-22796

Ji Z. S. & Mahley R.W. (1994). Lactoferrin binding to heparan sulfate proteoglycans and the LDL receptor-related protein. Further evidence supporting the importance of direct binding of remnant lipoproteins to HSPG. *Arterioscler Thromb*; 14: 2025-2031

Johnson E. B., Hammer R. E. & Herz J. (2005). Abnormal development of the apical ectodermal ridge and polysyndactyly in Megf7-deficient mice. *Hum Mol Genet*; 14:3523-3538

Jong M. C., M. H., Hofker & Havekes L.M. (1999). Role of apo-Cs in lipoprotein metabolism. Functional differences between apoC1, apoC2, and apo C3. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 19:472-484

Kapitany R. A. & Zebrowki E. J. (1973). A high resolution PAS stain for polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem*; 56:361-369

Kardia S. L., Modell S. M. & Peyser P. A. (2003). Family-centered approaches to understanding and preventing coronary heart disease. *Am J Prev Med*; 24:143-151

Kato M., Patel M. S., Levasseur R., Lobov I., Chang B. H., Glass D. A. II, Hartmann C., Li, L. HwangT. H., Brayton C. F., Lang R. A., Karsenty G. & Chan L. (2002). Cbfa1-independent decrease in osteoblast proliferation, osteopenia, and persistent embryonic eye vascularization in mice deficient in Lrp5, a Wnt coreceptor. *J Cell Biol*; 157:303-314

Kendrick J. S., Chan L. & Higgins J. A. (2001). Superior role of apolipoprotein B48 over apolipoprotein B100 in chylomicron assembly and fat absorption: an investigation of apobec-1 knock-out and wild type mice. *Biochem J*; 356:821-827

Kim D. H., Iijima H., Goto K., Sakai J., Ishii H., Kim H. J., Suzuki H., Kondo H., Saeki S. & Yamamoto T. (1996). Human apolipoprotein E receptor 2. A novel lipoprotein receptor of the low density lipoprotein receptor family predominantly expressed in brain. *J Biol Chem*; 271:8373-8380

Konishi M., Iwasa M. & Yamauchi K. (2006). Lactoferrin inhibits lipid peroxidation in patients with chronic hepatitis C. *Hepato Res*; 36:27-32

Koschinsky M. L. & Marcovina S. M. (2004). Structure-function relationships in apolipoprotein (a): insights into lipoprotein (a) assembly and pathogenicity. *Curr Opin in Lipidol*; 15:167-174

Kostner G. M., Avogaro P., Cazzolato G., Marth E., Bittolo Bon G. & Quinci G.B. (1981). Lipoprotein Lp(a) and the risk for myocardial infarction. *Atherosclerosis*; 38:51-61

Kottke B. A., Zinsmeister A. R. & Holmes D.R. Jr. (1986). Apolipoproteins and coronary artery disease. *Mayo Clin Proc*; 61:313-320

Kovanen P. T., Brown M. S. & Goldstein J. L. (1979). Increased binding of low density lipoprotein to liver membranes from rats treated with 17 α -ethinyl estradiol. *J Biol Chem*; 254:11367-11373

Kuchibhotla S., Vanegas D., Kennedy D. J., Guy E., Nimako G., Morton R. E., Febbraio M. (2008). Absence of CD36 protects against atherosclerosis in ApoE knock-out mice with no additional protection provided by absence of scavenger receptor A I/II. *Cardiovasc Res* 78:185-196

Kuwata H., Yamauchi K., Teraguchi S., Ushida Y., Shimokawa Y., Toida T. & Hayasawa H. (2001). Functional fragments of ingested lactoferrin are resistant to proteolytic degradation in the gastrointestinal tract of adult rats. *J Nutr*; 131:2121-2127

La Rosa J. C., Levy R. I., Herbert P., Lux S. E. & Fredrickson D. S. (1970). A specific apoprotein activator for lipoprotein lipase. *Biochem Biophys Res Commun*; 41:57-60

Laemmli U. K. & Favre M. (1973). Maturation of the head of bacteriophage T4. I. DNA packaging events. *J Mol Biol*; 80:575-599

Lamarche B., Tchernof A., Dagenais G. R., Cantin B., Lupien P. J. & Després J. P. (1997). Small, dense LDL particles and the risk of ischemic heart disease: prospective results from the Québec Cardiovascular Study. *Circulation*; 95:69-75

Last J. M. (1988). A dictionary of epidemiology. 2nd ed. Oxford, Oxford University Press

Lee D. M. & Alaupovic P. (1974). Physicochemical properties of low-density lipoproteins of normal human plasma. Evidence for the occurrence of lipoprotein B in associated and free forms. *Biochem J*; 137:155-67

Le T. T., Duren H. M., Slipchenko M. N., Hu C. D. & Cheng J. X. (2010). Label-free quantitative analysis of lipid metabolism in living *Caenorhabditis elegans*. *J Lipid Res*; 51:672-677

Legrand D., Ellass E. & Carpentier M., (2005). Lactoferrin: a modulator of immune and inflammatory responses. *Cell Mol Life Sci*; 62:2549-2559

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 transferring. *Biochimie*; 70:1185-1195

Legrand D., Pierce A. & Ellass E. (2008). Lactoferrin structure and functions. *Adv Exp Med Biol*; 606:163-194

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

Li Y., Marzolo M. P., van Kerkhof P., Strous G. J. & Bu G. (2000). The YXXL motif, but not the two NPXY motifs, serves as the dominant endocytosis signal for low density lipoprotein receptor-related protein. *J Biol Chem*; 275:17187-94

- Li Y., van Kerkhof P., Marzolo M. P., Strous G. J. & Bu G. (2001). Identification of a major PKA phosphorylation site within the cytoplasmic tail of LRP: Implication for receptor-mediated endocytosis. *Mol Cell Biol*; 21:1185-1195
- Libby P. (2003). Vascular biology of atherosclerosis: overview and state of the art. *Am J Cardiol*; 6:3A-6A
- Lillis A. P., Mikhailenko I. & Strickland D. K. (2005). Beyond endocytosis: LRP function in cell migration, proliferation and vascular permeability. *J Thromb Haemost*; 3:1884-1893
- Liu C. X., Musco S., Lisitsina N. M., Fogacs E., Minna J. D. & Lisitsyn N. A. (2000). Lrp-dit, a putative endocytic receptor gene, is frequently inactivated in non-small cell lung cancer cell Lines. *Cancer Res*; 60:1961-1967
- Liu C. X., Li Y., Obermoeller-McCormick L. M., Schwartz A. L. & Bu G. (2001). The putative tumor suppressor LRP1B, a novel member of the low density lipoprotein (LDL) receptor family, exhibits both overlapping and distinct properties with the LDL receptor-related protein. *J Biol Chem*; 276:28889-28896
- Lund-Katz, S., Laplaud P. M., Phillips M. C. & Chapman M. J. (1998). Apolipoprotein B-100 conformation and particle surface charge in human LDL subspecies: implication for LDL receptor interaction. *Biochem*; 37:12867-12874
- Mahley R. W. & Rall S. C. Jr. (2000). Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein. *Annu Rev Genomics Hum Genet*; 1:507-537
- Malmström R., Packard C. J. Caslake M. (1997). Defective regulation of triglyceride metabolism by insulin in the liver in non-insulindependent diabetes mellitus. *Diabetologia*; 40:454-462
- Mann C. J., Khallou J., Chevreuil O., Troussard A. A., Guermani L. M., Launay K., Delplanque B., Yen F. T., & Bihain B.E. (1995). Mechanism of Activation and Functional Significance of the Lipolysis-Stimulated Receptor. Evidence for a Role as Chylomicron Remnant Receptor? *Biochem*; 34:10421-10431
- Mann C. J., Troussard A. A., Yen F. T., Hannouche N., Najib J., FruchartJ. C., Lotteau V., Andre´ P., & Bihain B. E. (1997). Inhibitory Effect of Specific Apolipoprotein C-III Isoforms on the Binding of Triglyceride-rich Lipoproteins to the Lipolysis-stimulated Receptor. *J Biol Chem*; 272: 31348–31354
- Mansbach C. M. & Dowell R. F. (1995). Role of the intestine in chylomicron remnant clearance. *Am J Physiol*; 269:G144-152
- Mason A. B. & Brown S. A. (1987). Differential effect of iodination of ovotransferrin and its two half-molecule domains on binding to transferrin receptors on chick embryo red blood cells. *Biochem J*; 247:417-425
- Masuda S., Oda Y., Sasaki H., Ikenouchi J., Higashi T., Akashi M., Nishi E. & Furuse M. (2011). LSR defines cell corners for tricellular tight junction formation in epithelial cell. *Cell Sci*; 124:548-555
- May P., Herz J. & Bock H. H. (2005). Molecular mechanisms of lipoprotein receptor signalling. *Cell Mol Life Sci*; 62:2325-2338

Maynard F., Pierre A., & Maubois J. J. (1989). Fractionation of human lactoferrin and lactalbumin using microfiltration and ultrafiltration. *Dairy Sci Tech*; 69:59-64

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

McAbee D. D. & Esbensen K. (1991). Binding and endocytosis of apolactoferrin and holo-lactoferrin by isolated rat hepatocytes. *J Biol Chem*; 266:23624-23631

McAbee D. D., Nowatzke W., Oehler C., Sitaram M., Sbaschnig E., Opferman J. T., Carr J., & Esbensen K. (1993). Endocytosis and degradation of bovine apo- and holo-lactoferrin by isolated rat hepatocytes are mediated by recycling calcium-dependent binding sites. *Biochem*; 32:13749-13760

McAbee D. D., Ling Y.Y. & Stich, C. (1998). Iron loading of isolated rat hepatocytes inhibits asialoglycoprotein receptor dynamics and induces formation of rat hepatic lectin-1 (RHL-1) oligomers. *Biochem J*; 331:719-726

McAbee, D.D., Jiang, X., and Walsh, K.B. (2000). Lactoferrin binding to the rat asialoglycoprotein receptor requires the receptor's lectin properties. *Biochem J*; 348:113-117

McConathy W. J., Gesquiere J.C., Bass H., Tartar A., Fruchart J.C. & Wang C.S. (1992). Inhibition of lipoprotein lipase activity by synthetic peptides of apolipoprotein C-III. *J Lipid Res*; 33:995-1003

McLean J.W., Tomlinson J. E., Kuang W. J., Eaton D. L, Chen E. Y, Fless G. M., Scanu A. M. & Lawn R. M. (1987). cDNA sequence of human apolipoprotein(a) is homologous to plasminogen. *Nature*; 330:132-137

McNamara J. R., Small D. M., Li Z. & Schaefer E. J. (1996). Differences in LDL subspecies involve alterations in lipid composition and conformation changes in apolipoprotein B. *J Lipid Res*; 37:1924-1935

Mehrabian M., Qiao J. H., Hyman R., Ruddle D., Laughton C. & Lusis A. J. (1993). Influence of the apoA-II gene locus on HDL levels and fatty streak development in mice. *Arterioscler Thromb*; 13:1-10

Mehta J. L., Chen J., Paul L., Hermonat, Romeo F., Novelli G. (2006). Lectin-like, oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1): A critical player in the development of atherosclerosis and related disorders. *Cardiovasc Res*; 69:36-45

Mesli S., Javorschi S., Berard A. M., Landry M., Priddle H., Kivlichan D., Smith A. J., Yen F. T., Bihain B. E. & Darmon M. (2004). Distribution of the lipolysis stimulated receptor in adult and embryonic murine tissues and lethality of LSR^{-/-} embryos at 12.5. *Eur J Biochem*; 271:3103-3114

Millán J., Pintó X., Muñoz A., Zúñiga M., Rubiés-Prat J., Felipe Pallardo L. F., Masana L., Mangas A., Hernández-Mijares A., González-Santos P., Ascaso J. F. & Pedro-Botet J. (2009). Lipoprotein ratios: Physiological significance and clinical usefulness in cardiovascular prevention. *Vasc Health Risk Manag*; 5:757-765

Miller E. J. & Rhodes R. K. (1987). Preparation and characterization of the different types of collagen. *Methods Enzymol*; 82: 33-64

- Moheb L. A., Tzschach A., Garshasbi M. (2008). Identification of a nonsense mutation in the very low-density lipoprotein receptor gene (VLDLR) in an Iranian family with dysequilibrium syndrome. *Eur J Hum Genet*;16:270–273
- Montreuil J., Tonnelat J. & Mullet S. (1960). Preparation and properties of lactosiderophilin (lactotransferrin) of human milk. *Biochimica et Biophysica Acta*; 45:413-421
- Montreuil J., Bouquelet S. & Debray H. (1986). Glycoproteins. In: Chaplin M. F., Kennedy J. & F., editors. *Carbohydrate Analysis: A Practical Approach*. Oxford; IRL:143-204
- 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
- Morrissey J. H. (1981). Silver Stain for Proteins in Polyacrylamide Gels: A Modified Procedure with Enhanced Uniform Sensitivity. *Anal Biochem*; 117:307-310
- Moser K. & White F. M. (2006). Phosphoproteomic analysis of rat liver by high capacity Imac and LC MS/MS. *J Proteome Research*; 5:98-104
- Murphy J. E., Tedbury P. R., Homer-Vanniasinkam S., Walker J. H. & Ponnambalam S. (2005). Biochemistry and cell biology of mammalian scavenger receptors. *Atherosclerosis*;182:1-15
- Murray C. J. & Lopez A. D. (1996). Murray C. J. & Lopez A. D., editors. Global burden of disease and injury series, Vol.1: The global burden of disease. A Comprehensive assessment of mortality and disability from diseases, injuries, and risk factors in 1990 and projected to 2020. WHO; 1996, Geneva
- National Institutes of Health: Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). (2001). Bethesda, MD, National Institutes of Health
- National Cholesterol Education Program Expert panel on detection, evaluation and treatment of high blood pressure in adults. Executive summary of the third report of the National Cholesterol Education Program expert panel on detection and evaluation and treatment of high blood cholesterol in adults. (Adult Treatment Panel III). (2001). *JAMA*; 285: 2486–2497
- National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). (2002). *Circulation*; 106 :3143-3421
- Niall H. D. (1973). Automated Edman degradation: the protein sequenator. *Methods in Enzymology*; 27:942-1010
- Nillesse N., Pierce A., Lecocq M., Benaissa M. & Spik G. (1994). Expression of the lactotransferrin receptor during the differentiation process of the megakaryocyte Dami cell line. *Biol Cell*; 82:149-159
- Obermoeller-McCormick L. M., Li Y., Osaka H., FitzGerald D. J., Schwartz A. L. & Bu G. (2001). Dissection of receptor folding and ligand-binding property with functional minireceptors of LDL receptor-related protein. *J Cell Sci*; 114: 899-908

- Offe K., Dodson S. E., Shoemaker J. T., Fritz J. J., Gearing M., Levey A. I & Lah J. J. (2006). The lipoprotein receptor LR11 regulates amyloid beta production and amyloid precursor protein traffic in endosomal compartments. *J Neurosci*; 26:1596-1603
- Oka K., Ishimufuoka K., Chu M. J., Sullivan M., Krushkal J., Li W.H. & Chan L. (1994). Mouse very-low-density-lipoprotein receptor (VLDLR) cDNA cloning, tissue-specific expression and evolutionary relationship with the low-density-lipoprotein receptor. *Eur J Biochem*; 224:975-982
- Olofsson S.O., Stillemark-Billton P. & Asp L. (2000). Intracellular assembly of VLDL: two major steps in separate cell compartments. *Trends Cardiovasc Med*; 10:338-345
- Olofsson S. O. & Boren J. (2005). Apolipoprotein B: a clinically important apolipoprotein which assembles atherogenic lipoproteins and promotes the development of atherosclerosis. *J Intern Med*; 258:395-410
- Olson G. E., Winfrey V. P., NagDas S. K., Hill K. E. & Burk R. S. (2007). Apolipoprotein E Receptor-2 (ApoER2) Mediates Selenium Uptake from Seleno protein P by the Mouse Testis. *J Biol Chem*; 282:12290-12297
- Omran A. R. (2005). The Epidemiologic Transition: A Theory of the Epidemiology of Population Change. *Milbank Quarterly*; 83:731-757
- Orr A. W., Pedraza C. E., Pallero M. A., Elzie C. A., Goicoechea S., Strickland D. K. & Murphy-Ullrich J.E. (2003). Low density lipoprotein receptor-related protein is a calreticulin co-receptor that signals focal adhesion disassembly. *J Cell Biol*; 161:1179-1189
- Ou T., Yamakawa-Kobayashi K. & Arinami T. (1998). Methylenetetrahydrofolate reductase and apolipoprotein E polymorphisms are independent risk factors for coronary heart disease in Japanese: a case-control study. *Atherosclerosis*; 137:23-28
- Pakkanen, R., & Aalto, J. (1997). Growth factors and antimicrobial factors of bovine colostrum. *Int Dairy J*; 7:285-297
- Papatheodorou P., Carette J. E., Bell G. B., Schwan C., Guttenberg G., Brummelkamp T. R. & Aktories K. (2011). Lipolysis-stimulated Lipoprotein Receptor (LSR) is the Host Receptor for the Binary Toxin Clostridium Difficile Transferase (CDT). *PNAS*; 108:16422-16427
- Papatheodorou P., Claudia Wilczek, Thilo Nölke, Gregor Guttenberg, Daniel Hornuss, Carsten Schwan, Klaus Aktories (2012) Identification of the cellular receptor of Clostridium spiroforme toxin. *Infect Immun*; 80:1418-1423
- Parkyn C. J., Vermeulen E. G. & Mootoosamy R. C. (2008). LRP1 controls biosynthetic and endocytic trafficking of neuronal prion protein. *J Cell Sci*; 121:773-783
- 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
- Penco S., Scarfi S. & Giovine M. (2001). Identification of an import signal for, and the nuclear localization of human lactoferrin. *Biotechnol Appl Biochem*; 34:151-159

- Perkins D. N., Pappin D. J., Creasy D. M. & Cottrell J. S. (1999). Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis*; 20:3551-3567
- Peter C. J., Taylor M. E. & Drickamer K. (2006). Two categories of mammalian galactose-binding receptors distinguished by glycan array profiling. *Glycobiol*; 16:1C-7C
- Pierce A., Colavizza D., Benaissa M., Maes P., Tartra A., Montreuil J. & Spik G. (1991). Molecular cloning and sequence analysis of bovine lactoferrin. *Eur J Biochem*; 196:177-184
- Pierce A., Colavizza D., Benaissa M., Maes P., Tartra A., Montreuil J. & Spik G. (1991). Molecular cloning and sequence analysis of bovine lactoferrin. *Eur J Biochem*; 196:177-184
- Pierce A., Legrand D., Mazurier J. (2009). Lactoferrin: a multifunctional protein. *Med Sci (Paris)*; 25:361-369
- Pieters M. N., Schouten D. & Van Berkel T. J. (1994). In vitro and in vivo evidence for the role of HDL in reverse cholesterol transport. *Biochim Biophys Acta*; 1225:125-134
- Pinson K. I., Brennan J., Monkley S., Avery B. J. & Skarnes W. C. (2000). An LDL-receptor-related protein mediates Wnt signalling in mice. *Nature*; 407:535-538
- Pizzo S. V., Lehrman M. A., Imber M. J. & Guthrow C. E. (1981). The clearance of glycoproteins in diabetic mice. *Biochem Biophys Res Commun*; 101:704-708
- Plate K., Beutel S., Buchholz H., Demmer H., Fischer-Fruhholz S., Reif O., Ulber R., Scheper T. (2006). Isolation of bovine lactoferrin, lactoperoxidase and enzymatically prepared lactoferricin from proteolytic digestion of bovine lactoferrin using adsorptive membrane chromatography. *J Chromato*; 1117:81-86
- Pouillet P., Carpentier S. & Barillot E. (2007). MyProMS, a web server for management and validation of mass spectrometry-based proteomic data. *Proteomics*; 7:2553-2556
- Raabe M., Véniant M. M., Sullivan M. A., Zlot C. H., Björkegren J., Nielsen L. B., Wong J. S., Hamilton R. L., & Stephen G. (1999). Young. Analysis of the role of microsomal triglyceride transfer protein in the liver of tissue-specific knockout mice. *J Clin Invest*; 103: 1287-1298
- Rader J., Daniel, Hobbs. & Helen H. (2008). Disorders of lipoprotein metabolism. Harrison's Principles of Internal Medicine 18th ed. McGraw Hill Publishers New York: Page No.3157-3159, <http://www.accessmedicine.com>
- Rall S. C., Weisgraber K. H. & Mahley R. W. (1982). Human apolipoprotein E: the complete amino acid sequence. *J Biol Chem*; 257:4171-4180
- Ramachandran A., Snehalatha C., Kapur A., Vijay V., Mohan V., Das A. K., Rao P. V., Yajnik C. S., Kumar P. K. M., Nair J. D. (2001). Diabetes Epidemiology Study Group in India (DESI). High prevalence of diabetes and impaired glucose tolerance in India: National Urban Diabetes Survey. *Diabetologia*; 44: 1094-1101
- Regnstrom J., Nilsson J., Tornvall P., Landou C. & Hamsten A. (1992). Susceptibility to low-density lipoprotein oxidation and coronary atherosclerosis in man. *Lancet*; 339:1183-1186

Rhoads G.G., Dahlen G., Berg K., Morton N. E. & Dannenberg A. L. (1986). Lp (a) lipoprotein as a risk factor for myocardial infarction. *JAMA*; 256:2540-2544

Rhainds D. & Brissette L. (2004). The role of scavenger receptor class B type I (SR-BI) in lipid trafficking. defining the rules for lipid traders. *Int J Biochem Cell Biol*; 36:39-77

Rijsewijk F., Schuermann M., Wagenaar E., Parren P., Weigel D. & Nusse R. (1987). The Drosophila homolog of the mouse mammary oncogene int-1 is identical to the segment polarity gene wingless. *Cell*; 50: 649-657

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

Ross R. (1999). Atherosclerosis - an inflammatory disease. *N Engl J Med*; 340:115-126

Rossi P., Giansanti F., Boffi A., Ajello M., Valenti P., Chiancone E. & Antonini G. (2002). Ca²⁺ binding to bovine lactoferrin enhances protein stability and influences the release of bacterial lipopolysaccharide. *Biochem Cell Biol*; 80:41-48

Rubinstein D. C., Cohen J. C., Berger G. M., vander-Westhuyzen D. R., Coetzee G. A. & Gevers W. (1990). Chylomicron remnant clearance from the plasma in familial hypercholesterolemic homozygotes with defined receptor defects. *Clin Invest*; 86:1306-1312

Saito A., Pietromonaco S., Loo A. K. & Farquhar M. G. (1994). Complete cloning and sequencing of rat gp330/“megalin,” a distinctive member of the low density lipoprotein receptor gene family. *Proc. Natl Acad Sci USA*; 91: 9725-9729

Scanu A. (1966). Forms of human serum high density lipoprotein protein. *J Lipid Res*; 7:295-306

Scanu A., Pollard H., Hirz R. & Kothary K. (1969). On the conformational instability of human serum low-density lipoprotein: effect of temperature. *Proc Natl Acad Sci USA*; 62:171-178

Scarselli E., Ansuini H., Cerino R., Roccasecca R. M., Acali S., Filocamo G., Traboni C., Nicosia A., Cortese R. & Vitelli A. (2002). The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J*; 21:5017-5025

Schneeman B. O., Kotite L., Todd K. M. & Havel R. J. (1993). Relationships between the responses of triglyceride-rich lipoproteins in blood plasma containing apolipoproteins B-48 and B-100 to a fat containing meal in normolipidemic humans. *Proc Natl Acad Sci USA*; 90:2069-2073

Schonfeld G., Pfleger B., Roy R. & Witztum J. (1978). Hydrolysis of triglycerides in very low density lipoproteins produces alterations in apoB immunoreactivity and in very low density lipoprotein-cell interactions. *Circulation*; 58: II 11- II 78

Segrest J. P., Jackson R. L., Morrisett J. D. & Gotto A. M. Jr. (1974). A molecular theory of lipid protein interactions in the plasma lipoproteins. *FEBS Lett*; 38: 247-258

- Segrest J. P., Jones M. K., Loof H. D. & Dashti N. (2001). Structure of apolipoprotein B 100 in low density lipoproteins. *J Lipid Res*; 42:1346-1367
- Semenov M. V., Tamai K., Brott B. K., Kuhl M., Sokol S. & He X. (2001). Head inducer Dickkopf-1 is a ligand for Wnt coreceptor LRP6. *Curr Biol*; 11:951-961
- Sharma A. K., Rajashankar K. R., Yadav M. P. & Singh T. P. (1999). Structure of mare apolactoferrin: the N and C lobes are in the closed form. *Acta Crystallographica*; D55:1152-1157
- Shimazaki K., Kamio M., Nam M. S., Harakawa S., Tanaka T., Omata Y., Saito A., Kumura H., Mikawa K., Igarashi L & Suzuki, N. (1998). Structural and immunochemical studies on bovine lactoferrin fragments. *Adv Exp Med Biol*; 443:41-48
- Shimazaki K., Kawaguchi A., Sato T., Ueda Y., Tomimura T. & Shimamura S. (1993). Analysis of human and bovine milk lactoferrins by Rotofor and chromatofocusing. *Int J Biochem*; 25:1653-1658
- Shimazaki K., Uji K., Tazume T., Kumura H. & Shimo-Oka T. (2000). Approach to identification and comparison of the heparininteracting sites of lactoferrin using synthetic peptides. In Shimazaki H. T. K., Tomita M., Kuwata T., Perraudin J.P. Editors. Lactoferrin: structure, function and applications. *Amsterdam; Elsevier Science BV*:37-46
- Simons K., Ehnholm C., Renkonen O. & Bloth B. (1970). Characterization of the Lp (a) lipoprotein in human plasma. *Acta Pathol Microbiol Scand B Microbiol Immunol*; 78:459-466
- 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
- Smith L. C., Pownall H. J., Gotto A. M. & Jr. (1978). The plasma lipoproteins: structure and metabolism. *Ann Rev Biochem*; 47:751-757
- Smith L. C., Voyta J. C., Catapano A. L., Kinnunen P. K. J., Gotto A. M. & Jr., & Sparrow J. T. (1980). Activation of lipoprotein lipase by synthetic fragments of apolipoprotein C-II. *Ann NY Acad Sci*; 348:213-223
- Son K. N., Park J. B., Chung C. K., Chung D. K., Yu D. Y., Lee K. K. & Kim J. (2002). Human lactoferrin activates transcription of IL-1 β gene in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun*; 290:236-241
- Song Y., Stampfer M. J. Liu S. (2004). Meta-analysis: apolipoprotein E genotypes and risk for coronary heart disease. *Ann Intern Med*; 141:137-147
- Sorensen M. & Sorensen S. P. L. (1939). The proteins in whey. *CR Trav Lab Carlsberg*; 23:55-99
- Soutar A. K., Myant N. B. & Thompson G. R. (1982). The metabolism of very low density and intermediate density lipoproteins in patients with familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*; 43:217-231
- Spik G., Coddeville B., Mazurier J., Bourne Y., Cambillaut C. & Montreuil J. (1994). Primary and three-dimensional structure of lactotransferrin (lactoferrin) glycans. *Adv Exp Med Biol*; 357: 21-32

- Stamler J., Daviglus M L., Garside D. B., Dyer A. R., Greenland P. Neaton J. D. (2000). Relationship of baseline serum cholesterol levels in 3 large cohorts of younger men to long-term coronary, cardiovascular, and all-cause mortality and to longevity. *JAMA*; 284:311-318
- Stampfer M. J. & Sacks F.M. (1991). A prospective study of cholesterol, apolipoproteins and the risk of myocardial infarction. *N Engl J Med*; 325:373-381
- Steijns J. M. & van Hooijdonk A. C. M. (2000). Occurrence, structure, biochemical properties and technological characteristics of lactoferrin. *BJR*; W: S11-S17
- Steinberg D. & Witztum J. L. (1990). Lipoproteins and atherogenesis: Current concepts. *JAMA*; 264:3047-3052
- Stenger C., Hanse M., Pratte D., MbalaM. L., Akbar S., Koziel V., Escanye M. C., Kriem B., Malaplate-Armand C., Olivier J. L., Oster T., Pillot T. & Yen F. T. (2010). Up-regulation of hepatic lipolysis stimulated lipoprotein receptor by leptin: a potential lever for controlling lipid clearance during the postprandial phase. *FASEB J*; 24:4218-4228
- Stenger C., Corber C. & Yen F. T. (2012). Structure and function of the lipolysis stimulated lipoprotein receptor in Chemical Biology (Ekinci, D., ed): pp: 267-292, *InTech, Rijeka*
- Stenman S., von-Smitten K. & Vaheri A. (1980). Fibronectin and atherosclerosis. *Acta Med Scand*; 642:165-170
- Stillemark B. P., Boren J., Andersson M., Larsson T., Rustaeus S., Karlsson K. A. & Olofsson S. O. (2000). The assembly and secretion of apolipoprotein B-48 containing very low density lipoproteins in McA-RH7777 cells. *J Biol Chem*; 275:10506-10513
- Stillemark-B. P., Beck C., Boren J. & Olofsson S. O. (2005). Relation of the size and intracellular sorting of apoB to the formation of VLDL 1 and VLDL 2. *J Lipid Res*; 46:104-114
- Stockinger W., Brandes C., Fasching D., Hermann M., Gotthardt M., Herz J., Schneider W. J. & Nimpf J. (2000). The reelin receptor ApoER2 recruits JNK-interacting proteins-1 and -2. *J Biol Chem*; 275:25625-25632
- Strickland D. K., Gonias S. L. & Argraves W.S. (2002). Diverse roles for the LDL receptor family. *Trends Endocrin Met*; 13:66-74
- Sudhof T. C., Goldstein J. L., Brown M.S. & Russell D.W. (1985). The LDL receptor gene: a mosaic of exons shared with different proteins. *Science*; 228:815-822
- Superti F., Siciliano R., Rega B., Giansanti F., Valenti P. & Antonin G. (2001). Involvement of bovine lactoferrin metal saturation, sialic acid and protein fragments in the inhibition of rotavirus infection. *BBA*; 1528:107-115
- Suzuki Y. A. & Lönnerdal B. (2002). Characterization of mammalian receptors for lactoferrin. *Biochem Cell Biol*; 80:75-80
- Suzuki Y. A., Shin K. & Lönnerdal B. (2001). Molecular cloning and functional expression of a human intestinal lactoferrin receptor. *Biochem*; 40:15771-15779

- Suzuki Y. A., Lopez V. & Lonnerdal B. (2005). Mammalian lactoferrin receptors: structure and function. *Cell Mol Life Sci* 62, 2560-75.
- Swan H. J. (1980). The Framingham Offspring Study: a commentary. *J Am Coll Cardiol*; 33: 1136-1140
- Taira, K., Bujo, H., Hirayama, S., Yamazaki, H., Kanaki, T., Takahashi, K., Ishii, I., Miida, T., Schneider, W.J., Saito, Y. LR11, a mosaic LDL receptor family member, mediates the uptake of ApoE-rich lipoproteins in vitro. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 21:1501-1506
- Takahashi S., Kawarabayasi Y., Nakai T., Sakai J. & Yamamoto T. (1992). Rabbit very-low-density-lipoprotein receptor: A-low- density-lipoprotein receptor-like protein with distinct ligand specificity. *Proc Natl Acad Sci USA*; 89:9252-9256
- Takahashi S., Suzuki J., Kohno M., Oida K., Tamai T., Miyabo S., Yamamoto T. & Nakai T. (1995). Enhancement of the binding of triglyceride-rich lipoproteins to the very low density lipoprotein receptor by apolipoprotein E and lipoprotein lipase. *J Biol Chem*; 270:15747-15754
- Takayama Y., Mizumachi K. & Takezawa T. (2002). The bovine lactoferrin region responsible for promoting the collagen gel contractile activity of human fibroblasts. *Biochem. Biophys. Research Communications*; 299:813-817
- Takayama Y. & Takezawa T. (2006). Lactoferrin promotes collagen gel contractile activity of fibroblasts mediated by lipoprotein receptors. *Biochem Cell Biol*; 84:268-274
- Tall A. R. (1998). An overview of reverse cholesterol transport. *Eur Heart J*; 19:A31-A35
- Tamai K., Semenov M., Kato Y., Spokony R., Liu C., Katsuyama Y., Hess F., Saint-Jeannet J. P. & He X. (2000). LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. *Nature*; 407: 530-535
- Tan K. C. B., Cooper M. B., Ling K. L. E. (1995). Fasting and postprandial determinants for the occurrence of small dense LDL species in noninsulin-dependent diabetic patients with and without hypertriglyceridaemia: the involvement of insulin, insulin precursor species and insulin resistance. *Atherosclerosis*; 113:273-287
- Taskinen M. R. (2003). Diabetic dyslipidaemia: from basic research to clinical practice. *Diabetologia*; 46:733-749
- Teng C.T., Beard C., Gladwell W. (2002): Differential expression and estrogen response of lactoferrin gene in the female reproductive tract of mouse, rat and hamster. *Biol Reprod*; 67:1439-1449
- Teng C., Gladwell W. & Raphiou I. (2004). Methylation and expression of the lactoferrin gene in human tissues and cancer cells. *Biometals*; 17: 317-323
- The International Diabetes Federation consensus worldwide definition of the metabolic syndrome (2005). Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycemia: report of a WHO/IDF consultation. Geneva 27, Switzerland: <http://da3.diabetesatlas.org/indexe3ea.html>
- Tomita T., Yamasaki Y., Kubota M., Tohdo R., Katsura M., Ikeda M., Nakahara I., Shiba Y., Matsuhisa M. & Hori M. (1998). High plasma free fatty acids decrease splanchnic glucose uptake in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Endocr J*; 45:165-173

- Tomlinson J. E., McLean J. W. & Lawn R. M. (1989). Rhesus monkey apolipoprotein (a). Sequence, evolution and sites of synthesis. *J Biol Chem*; 264:5957-5965
- Trommsdorff M., Borg J. P., Margolis B. & Herz J. (1998). Interaction of cytosolic adaptor proteins with neuronal apolipoprotein E receptors and the amyloidprecursor protein. *J Biol Chem*; 273:33556-33560
- Trommsdorff M., Gotthardt M., Hiesberger T., Shelton J., Stockinger W., Nimpf J., Hammer R. E., Richardson J. A. & Herz J. (1999). Reeler/Disabled-like disruption of neuronal migration in knockout mice lacking the VLDL receptor and ApoE receptor 2. *Cell*; 97:689-701
- Troussard A. A., Khallou J., Mann C. J., Andre P., Strickland D. K., Bihain B. E. & Yen F.T. (1995). Inhibitory effect on the lipolysis-stimulated receptor of the 39-kDa receptor-associated protein. *J Biol Chem*; 270:17068-17071
- Truong T. Q., Auger A., Denizeau F. & Brissette L. (2000). Analysis of low density lipoprotein catabolism by primary cultures of hepatic cells from normal and low-density lipoprotein receptor knockout mice. *Biochim Biophys Acta*;1484:307-315
- Tu, Y. Y., C. C. Chen, and H. M. Chang (2001) Isolation of immunoglobulin in yolk (IgY) and rabbit serum immunoglobulin G (IgG) specific against bovine lactoferrin by immunoaffinity chromatography. *Food Res Int*; 34:783-789
- Tushuizen M. E., Diamant M. & Heine R. J. (2005). Postprandial dysmetabolism and cardiovascular disease in type 2 diabetes. *Postgrad Med J*; 81:1-6
- Utermann G. & Weber W. (1983). Protein composition of Lp (a) lipoprotein from human plasma. *FEBS Lett*; 154:357-361
- Vaheri A., Salonen E. M., Vartio T., Hedman K. & Stenman S. (1983). Fibronectin and tissue injury. In Woolf N., editor. *Biology and Pathology of the Vessel Wall. Praegen, Berlin*; Page No. 161-171
- Valenti P. & Antonini G. (2005). Lactoferrin: an important host defence against microbial and viral attack. *Cell Mol Life Sci* ;62:2576-2587
- van Dijk M. C. M., Ziere G. J., Boers W., Linthorst C., Bijsterbosch M. K. & van Berkel T. J. C. (1991). Recognition of chylomicron remnants and b-migrating very low-density lipoproteins by the remnant receptor of parenchymal liver cells is distinct from the liver a2-macroglobulin recognition site. *Biochem J*; 279:863-870
- Van Snick J.L. & Masson P.L. (1976). The binding of human lactoferrin to mouse peritoneal cells. *J Exp Med*; 144:1568-1580
- Van't Hooft F. M., Ruotolo G., Boquist S., de Faire U., Eggertsen G. & Hamsten A. (2001). Human evidence that the apolipoprotein A-II gene is implicated in visceral fat accumulation and metabolism of triglyceride-rich lipoproteins. *Circulation*;104: 1223-1228
- VanVeen H. A., Geerts M. E., van Berkel P. H. & Nuijens J. H. (2004). The role of N-linked glycosylation in the protection of human and bovine lactoferrin against tryptic proteolysis. *Eur J Biochem*; 271:678-684

- Villén J., Beausoleil S. A., Gerber S. A. & Gygi S. P. (2007). Large-scale phosphorylation analysis of mouse liver. www.pnas.org/cgi/content/full/0609836104/DC1
- Vohl M. C., Lamarche B., Bergeron J., Moorjani S., Prud'homme D., Nadeau A., Tremblay A., Lupien P.J., Bouchard C. & Després J. P. (1997). The MspI polymorphism of the apolipoprotein A-II gene as a modulator of the dyslipidemic state found in visceral obesity. *Atherosclerosis*; 128:183-190
- Wakabayashi H., Takase M. & Tomita M. (2003). Lactoferricin derived from milk protein lactoferrin. *Curr Pharm Des*; 9:1277-1287
- Ward P. P., Paz E. & Conneely O. M. (2005). Multifunctional roles of lactoferrin: a critical overview. *Cell Mol Life Sci*; 62:2540-548
- Warden C. H., Hedrick C. C., Qiao J. H., Castellani L. W. & Lusis A. J. (1993). Atherosclerosis in transgenic mice overexpressing apolipoprotein A-II. *Science*; 261:469-472
- Wasan K. M. & Cassidy S. M. (1998). Role of plasma lipoproteins in modifying the biological activity of hydrophobic drugs. *J Pharm Sci*; 87:411-424
- Wasan K. M., Brocks D. R., Lee S. D., Sachs-Barrable K. & Thornton S. J. (2008). Impact of lipoproteins on the biological activity and disposition of hydrophobic drugs: implications for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*; 7:84-99
- Wehrli M., Dougan S. T., Caldwell K., O'Keefe L., Schwartz S., Vaizel Ohayon D., Schejter E., Tomlinson A. & DiNardo S. (2000). Arrow encodes an LDL-receptor-related protein essential for Wingless signaling. *Nature*; 407:527-530
- Wei Z., Nishimura T. & Yoshida S. (2000). Présence of a glycan at a potential N-glycosylation site, Asn-281, of bovine lactoferrin. *J Dairy Sci*; 83: 683-689
- Welsh J. B., Zarrinkar P.P., Sapinoso L. M., Kern S. G., Behling C. A., Monk B. J., Lockhart D. J., Burger R. A. & Hampton G. M. (2001). Analysis of gene expression profiles in normal and neoplastic ovarian tissue samples identifies candidate molecular markers of epithelial ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 98:1176-1181
- Willnow T. E., Orth K. & Herz J. (1994). Molecular dissection of ligand binding sites on the low density lipoprotein receptor-related protein. *J Biol Chem* 269:15827-15832
- Willnow T. E., Rohmann 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
- Willnow T. E., Hammes A. & Eaton S. (2007). Lipoproteins and their receptors in embryonic development: more than cholesterol clearance. *Development*; 134:3239-3249
- World Health Organization. Prevention of diabetes mellitus. Technical Report Series no. 844. WHO; Geneva, 1994
- World Health Organisation. Deaths from non communicable diseases (2011). Geneva, Switzerland: http://www.who.int/gho/ncd/mortality_morbidity/ncd_total/en/index.html

WyneK L., Pathak R. K., Seabra M. C. Hobbs H. H. (1996). Expression of the VLDL Receptor in Endothelial Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*;16:407-415

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

Yasuda J., Whitmarsh A. J., Cavanagh J., Sharma M. & Davis R. J. (1999). The JIP group of mitogen-activated protein kinase scaffold proteins. *Mol Cell Biol*; 19:7245-7254

Yen F. T., MannC. J., GuermaniL. M., Hannouche N. F., Hubert N., HornickC. A., Bordeau V. N., Agnani G., & Bihain B. E. (1994). Identification of a lipolysis-stimulated receptor that is distinct from the ldl receptor and the ldl receptor-related protein? *Biochem*; 33:1172-1180

Yen F. T., Masson M., Clossais-Besnard N., Andre P., Grosset J. M., Bougueleret L., Dumas J. B., Guerassimenko O. & Bihain B. E. (1999). Molecular cloning of a lipolysis-stimulated remnant receptor expressed in the liver. *J Biol Chem*; 274:13390-13398

Yen F.T., Roitel O., Bonnard L., Notet V., Pratte D., Stenger C., Magueur E. & Bihain B.E. (2008). Lipolysis Stimulated Lipoprotein Receptor, a novel molecular link between hyperlipidemia weight gain and atherosclerosis in mice. *J BioChem*; 283:25650-25659

Yoshida S. (1989). Preparation of lactoferrin by hydrophobic interaction chromatography from milk acid whey. *J Dairy Sci*; 72:1446-1450

Yoshida S., Wei Z., Shinmura Y. & Fukunaga N. (2000). Séparation of lactoferrin-a and -b from bovine colostrum. *J Dairy Sci*; 53:2211-2215

Yusuf S., Hawken S., Ounpuu S., Dans T., Avezum A., Lanas F., McQueen M., Budaj A., Pais P. & Varigos J. (2004). Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet*; 364 :937-952

Zambon A., Hashimoto S. I. & Brunaell J. D. (1993). Analysis of techniques to obtain plasma for measurement of levels of free fatty acids. *J Lipid Res*; 34:1021-1028

Zambon A., Deeb S. S. & Pauletto P. (2003). Hepatic lipase: a marker for cardiovascular disease risk and response to therapy. *Curr Opin Lipidol*; 14:179-189

Zheng G., Bachinsky D. R., Stamenkovic I., Strickland D. K., Brown D., Andres G. & McCluskey R. T. (1994). Organ distribution in rats of two members of the low-density lipoprotein receptor gene family, gp330 and LRP/alpha 2MR, and the receptor-associated protein (RAP). *J Histochem Cytochem*; 42:531-542

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 GJ, Bijsterbosch MK, van Berkel TJ. (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

Websites

www.who.int

<http://expasy.org/>

www.phosphosite.org

<http://web.expasy.org/findpept/>

www.uniprot.org/uniprot/Q9WU74

<http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>

<http://www.uniprot.org/uniprot/P24627>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/proteins/>

http://www.morphology.dp.ua/_dict/?wid=770

http://web.expasy.org/cgi-bin/compute_pi/pi_tool

http://www.who.int/whr/2002/en/whr02_en.pdf

http://www.idf.org/webdata/docs/IDF_Meta_def_final.pdf

<http://themedicalbiochemistrypage.org/lipoproteins.html#uptake>

<http://www.oecd.org/els/healthpoliciesanddata/49716427.pdf>

http://www.insee.fr/fr/themes/document.asp?ref_id=ip1123®_id=0

ANNEXES

Annexe 1.

Détermination des masses moléculaires par FTICR-MS des fragments tryptiques de pp51 (d'après Poulet *et al.*, 2007)

#	Résidus	m/z	M_r (Exp)	M_r (Cal)	Séquence
1	285-296	660,84	1319,66	1319,66	R.SFQLFGSPPGQR.D
2	297-309	747,92	1493,82	1493,82	R.DLLFKDSALGFLR.I
3	310-329	742,42	2224,25	2224,25	R.IPSKVDSALYLGSRYLTTLK.N
4	330-341	708,38	1414,75	1414,75	K.NLRETAEEVKAR.Y
5	345-356	672,84	1343,65	1343,65	R.VVWCAVGPEEQK.K
6	387-404	914,44	1826,87	1826,87	K.GEADALNLDGGYIYTAGK.C
7	405-416	649,87	1297,72	1297,72	K.CGLVPVLAENRK.T
8	420-441	823,45	2467,31	2467,31	K.YSSLDCVLRPTGYLAVAVVK.A
9	442-455	802,43	1602,84	1602,84	K.ANEGLTWNSLKDKK.S
10	501-514	768,35	1534,68	1534,68	R.LCALCAGDDQGLDK.C
11	521-531	677,83	1353,63	1353,64	K.EKYYGYTGAFR.C
12	532-544	721,34	1440,66	1440,66	R.CLAEDVGDVAFVK.N
13	571-578	474,25	946,49	946,49	R.LLCLDGTR.K
14	604-620	630,03	1887,08	1887,08	R.AAHVKQVLLHQQUALFGK.N
15	609-623	840,98	1679,95	1679,95	K.QVLLHQQUALFGKNGK.N
16	624-633	664,81	1327,60	1327,61	K.NCPDKFCLFK.S
17	638-650	747,87	1493,72	1493,72	K.NLLFNDNTECLAK.L
18	651-674	896,14	2685,40	2685,40	K.LGGRPTYEEYLGTEYVTAIANLKK.C
19	675-689	863,42	1724,82	1724,82	K.CSTSPLLEACAFLTR.

M_r (Exp) : masse relative expérimentale, M_r (Cal) : masse relative calculée.

La séquence correspondante est indiquée en caractère gras et entourée des résidus précédent et suivant

pp51

284

 301 KDSALGFLRI PSKVDSALYL GSRYLTTLKN LRETAEEVKA RYTRVVWCAV
 351 GPEEQKKCQQ WSQQSGQNV CATASTTDDC IVLVLKGEAD ALNLDGGYIY
 401 TAGKCGLVPV LAENRKTSKY SSLDCVLRPT EGYLAVAVVK KANEGLTWNS
 451 LKDKKSCHTA VDRTAGWNIP MGLIVNQTGS CAFDEFFSQS CAPGRDPKSR
 501 LCAALCAGDDQ GLDKCVPNSK EKYYGYTGAF RCLAEDVDV AFVKNDTVWE
 551 NTNGESTADW AKNLNREDFR LLCLDGTRKP VTEAQSCHLA VAPNHAVVSR
 601 SDRAAHVQV LLHQQUALFGK NGKNCDFKFC LFKSETKNLL FNDNTECLAK
 651 LGGRPTYEEY LGTEYVTAIA NLKKCSTSPL LEACAFLTR

Taux de recouvrement de la séquence de pp51 analysée par spectrométrie de masse des peptides tryptiques (les peptides détectés et identifiés sont en rouge).

Annexe 2.

Détermination des masses moléculaires par FTICR-MS des fragments tryptiques de pp44 (d'après Poulet *et al.*, 2007)

#	Résidus	m/z	M_r (Exp)	M_r (Cal)	Séquence
1	345-357	765,39	1528,77	1528,77	R.VVWCAVGPEEQKK.C
2	387-404	914,44	1826,87	1826,87	K.GEADALNLDGGYIYTAGK.C
3	405-416	687,87	1373,72	1373,72	K.CGLVPVLAENRK.T
4	420-441	823,45	2467,31	2467,31	K.YSSLDCVLRPTEGYLAVAVVKK.A
5	442-455	802,43	1602,84	1602,84	K.ANEGLTWNSLKDKK.S
6	521-531	677,83	1353,63	1353,64	K.EKYYGYTGAFR.C
7	532-544	683,34	1364,66	1364,66	R.CLAEDVGDVAFVK.N
8	571-578	474,25	946,49	946,49	R.LLCLDGTR.K
9	579-600	579,31	2313,20	2313,20	R.KPVTEAQSCHLAVAPNHAVVSR.S
10	601-620	562,32	2245,24	2245,24	R.SDRAAHVKQVLLHQQALFGK.N
11	609-623	840,98	1679,95	1679,95	K.QVLLHQQALFGKNGK.N
12	624-633	664,81	1327,60	1327,61	K.NCPDKFCLFK.S
13	638-650	747,87	1493,72	1493,72	K.NLLFNDNTECLAK.L
14	651-674	896,14	2685,40	2685,40	K.LGGRPTYEEYLGTEYVTAIANLKK.C
15	675-689	863,42	1724,82	1724,82	K.CSTSPILLEACAFLTR

M_r (Exp) = masse relative expérimentale, M_r (Cal) = masse relative calculée.

pp44

345
↓

-----VVWCAV

351 GPEEQKKCQQ WSQQSGQNV CATASTTDDC IVLVLKGEAD ALNLDGGYIY

401 TAGKCGLVPV LAENRKTSKY SSLDCVLRPT EGYLAVAVVK KANEGLTWNS

451 LKDKKSCHTA VDRTAGWNIP MGLIVNQTS CAFDEFFSQS CAPGRDPKSR

501 LCA LCAGDDQ GLDKCVPNSK EKYYGYTGAF RCLAEDVDV AFVKNDTVWE

551 NTNGESTADW AKNLNREDFR LLCLDGTRKP VTEAQSCHLA VAPNHAVVSR

601 SDRAAHVQV LLHQQALFGK NGKNCPDKFC LFKSETKNLL FNDNTECLAK

651 LGGRPTYEEY LGTEYVTAIA NLKKCSTSPL LEACAFLTR

Taux de recouvrement de la séquence de pp44 analysée par spectrométrie de masse des peptides tryptiques (les peptides détectés et identifiés sont en rouge).

Annexe 3.

Détermination des masses moléculaires par FTICR-MS des fragments chymotrypsiques de pp34 (d'après Poulet *et al.*, 2007)

#	Résidus	m/z	M_r (Exp)	M_r (Cal)	Séquence
1	9-17	555,75	1109,49	1109,49	W.CTISQPEWF.K
2	30-41	639,34	1276,67	1276,67	L.GAPSITCVRRAF.A
3	42-59	639,03	1914,06	1914,06	F.ALECIRAIAEKKADAVTL.D
4	60-72	707,31	1412,60	1412,60	L.DGGMVFEAGRDPY.K
5	73-92	763,41	2287,20	2287,20	Y.KLRPVAAEIYGTKESPQTHY.Y
6	93-104	641,86	1281,71	1281,71	Y.YAVAVVKKGSNF.Q
7	105-119	870,95	1739,87	1739,87	F.QLDQLQGRKSCHTGL.G
8	107-125	705,35	2113,02	2113,02	L.DQLQGRKSCHTGLGRSAGW.V
9	126-135	579,84	1157,66	1157,66	W.VIPMGILRPY.L
10	139-152	745,40	1488,78	1488,78	W.TESLEPLQGAVAKF.F
11	193-208	793,37	1584,73	1584,72	Y.SGAFKCLQDGAGDVAF.V
12	197-215	695,68	2084,02	2084,02	F.KCLQDGAGDVAFVKETTVF.E
13	216-230	916,96	1831,89	1831,90	F.ENLPEKADRDQYELL.C
14	243-268	982,17	2943,50	2943,50	F.KECHLAQVPSHAVVARSVDGKEDLIW.K
15	269-278	596,36	1190,70	1190,70	W.KLLSKAQEKF.G

M_r (Exp) : masse relative expérimentale, M_r (Cal) : masse relative calculée.

pp34

1 APRKNVRWCT ISQPEWFKCR RWQWRMKKLG APSITCVRRA FALECIRAIA
 51 EKKADAVTLD GGMVFEAGRD PYKLRPVAAE IYGTKESPQT HYYAVAVVKK
 101 GSNFQLDQLQ GRKSCHTGLG RSAGWVIPMG ILRPYLSWTE SLEPLQGAVA
 151 KFFSASCVPC IDRQAYPNLC QLCKGEGENQ CACSSREPYF GYSGAFKCLQ
 201 DGAGDVAFVK ETTVFENLPE KADRDQYELL CLNNSRAPVD AFKECHLAQV
 251 PSHAVVARSV DGKEDLIWKL LSKAQEKFGK NKSR

Taux de recouvrement de la séquence de pp34 analysée par spectrométrie de masse des peptides chymotrypsiques (les peptides détectés et identifiés sont en rouge). Les sites potentiels d'hydrolyse par la trypsine (Lys et Arg) sont soulignés et les résidus C-terminaux probables sont soulignés et en italique.

Annexe 4.

Détermination des masses moléculaires par FTICR-MS des fragments tryptiques de pp24 (d'après Poulet *et al.*, 2007)

#	Résidus	m/z	M_r (Exp)	M_r (Cal)	Séquence
1	126-135	579,84	1157,66	1157,66	W.VIPMGILRPY.L
2	139-152	745,40	1488,78	1488,78	W.TESLEPLQGAVAKF.F
3	193-208	793,37	1584,72	1584,72	Y.SGAFKCLQDGAGDVAF.V
4	197-215	695,68	2084,02	2084,02	F.KCLQDGAGDVAFVKETTVE.E
5	216-230	916,96	1831,90	1831,90	F.ENLPEKADRDQYELL.C
6	269-278	596,36	1190,70	1190,70	W.KLLSKAQEKFG

M_r (Exp) : masse relative expérimentale, M_r (Cal) : masse relative calculée.

pp24

122
↓

 151 KFFSASCVPC IDRQAYPNLC **QLCKGEGENQ** CACSSREPYF GY**SGAFKCLQ**
 201 **DGAGDVAFVK** ETTVFENLPE **KADRDQYELL** CLNNSRAPVD AF**KECHLAQV**
 251 **PSHAVVARSV** **DGKEDLIWKL** **LSKAQEKFGK** **NKSR**

Taux de recouvrement de la séquence de pp24 analysée par spectrométrie de masse des peptides chymotrypsiques (les peptides détectés et identifiés sont en rouge). Les sites potentiels d'hydrolyse par la trypsine (Lys et Arg) sont soulignés et les résidus C-terminaux probables sont soulignés et en italique.

Annexe 5.

Analyse par spectrométrie de masse des peptides présents dans le double hydrolysats

RT (min)	M_r (expérimental)	M_r (calculée)	Séquence	Résidus
13,52 (*)	959,5 (+57)	959,427 (+57)	CAVGPEEQK (+57)	348-356
15.19	721.5	721.33	RPTEGY	428-433
15.30	649.4	649.32	GGRPTY	652-657
15.35	344.2	344.14	YY	523-524
15.80	585.6	585.37	AVAVVK	435-440
17.70	204.2	204.09	W	n.d.
17.89	702.5	702.34	KGEADAL	386-392
18.12	581.4	581.27	LGTEY	661-665
18.48	637.3	637.27	NLDGGY	393-398
18.89	2726.0	860.44 (aglycoform)	VKNDTVW (9 Man + 2 GlcNAc)	543-549
19.00	2564.0	860.44 (aglycoform)	VKNDTVW (8 Man + 2 GlcNAc)	543-549
19.23	800.4	800.32	PTYEEY	655-660
19.27	2402.0	860.44 (aglycoform)	VKNDTVW (7 Man + 2 GlcNAc)	543-549
19.49	2240.0	860.44 (aglycoform)	VKNDTVW (6 Man + 2 GlcNAc)	543-550
20.38	419.2	419.18	SAGW	122-125
20.79	746.5	746.40	APVDAFK	237-243
20.80	1222.5	1222.47	ENTNGESTADW	550-560
21.57	666.4	666.32	VDSALY	314-319
22.73	674.3	674.43	RMKKL	25-29
23.30	878.4	878.38	QDGAGDVAF	200-208
23.68	595.3	595.28	ETTVF	211-215
25.13	787.4	787.40	TESLEPL	139-145
26.73	402.3	402.23	VVW	345-347
27.12	404.2	404.19	LSW	136-138
27.50	802.5	802.45	LSKAQEK	271-277
28.28	779.3	779.37	DQYELL	225-230
31.41	1060.4	1060.51	SWTESLEPL	137-145
32.90	674.3	674.33	EDLIW	264-268

Les valeurs de M_r values correspondent aux masses monoisotopiques. RT : temps de rétention ; nd : non déterminé ; Man : mannose ; GlcNAc : N-acetylglucosamine.

* : peptide identifié comme contenant un résidu Cys après réduction et alkylation par l'iodoacétamide et également observé sous sa forme monoprotée alkylée $[M+57+H]^+$.

Annexe 6.

Masse moléculaire apparente, nombre de glycanes et pH isoélectrique de la lactoferrine (Lf) et de ses fragments

Protéine Fragment	Masse apparente (kDa)	Masse théorique (kDa) ^a	Chaînes de glycanes ^a	pHi théorique ^b	pHi expérimental ^c
Lf	80	76,10	5	8,67	8,9
pp51 (C-lobe)	51	44,30	3	7,98	–
pp44 (C-lobe)	44	37,52	3	6,64	6,2 – 6,5
pp34 (N-lobe)	34	31,79	1	9,08	–
pp24 (N-lobe)	24	18,03	1	6,48	–

^aSelon Wei et al. (2000 ; 2002).

^bDonnées concernant la forme apoprotéique est calculé en utilisant à l'aide du logiciel, disponible sur le site suivant ; http://web.expasy.org/compute_pi/.

^cDéterminé par isoélectrofocalisation (IEF) (Jameson et al., 1998 ; Shimazaki et al., 1993).

Title: Postprandial lipemia and lactoferrin: the *Lipolysis Stimulated Receptor* as a potential target.

Abstract. Postprandial lipemia is characterized by an increase in plasma triglyceride-rich lipoproteins after the ingestion of meal, and is important towards determining the bioavailability of dietary lipids amongst the peripheral tissues. Indeed, elevated postprandial lipemia is often observed with obesity and dyslipidemia, two disorders that can lead to health complications including diabetes and cardiovascular diseases. Lactoferrin (Lf) has been shown to inhibit hepatic chylomicron remnant removal, resulting in increased postprandial lipemia, for which the molecular mechanisms remain unclear. The lipolysis stimulated lipoprotein receptor (LSR) has been shown to contribute to the removal of triglycerides-rich lipoproteins during the postprandial phase. The aim was to determine if there was interaction between Lf and LSR. Both Lf and LSR were purified with purities upper to 95% and characterized. Cell culture studies demonstrated that while Lf does not have any significant effect on LSR protein levels in mouse Hepa1-6 cells, it co-localizes with LSR in cells, but only in the presence of oleate, which is needed to obtain LSR in its active form. Ligand blotting using purified LSR revealed that Lf binds directly to the receptor in the presence of oleate and prevents the binding of triglycerides-rich lipoproteins. Both C- and N-lobes of Lf, and a mixture of peptides derived from its tryptic and chymotryptic double hydrolysis retained the ability to bind LSR. We propose that the elevated postprandial lipemia observed upon Lf treatment *in vivo* is mediated by its direct interaction with LSR, thus preventing clearance of chylomicrons and their remnants through the LSR pathway.

Key words: postprandial lipemia, chylomicrons, triglycerides, peptides, enzymatic hydrolysis, fatty acid

Titre : Lipémie postprandiale et lactoferrine : le *Lipolysis Stimulated Receptor* comme cible potentielle.

Résumé. La lipémie postprandiale se caractérise par une augmentation des lipoprotéines riches en triglycérides après un repas, et joue un rôle important dans la biodisponibilité des lipides alimentaires pour les tissus périphériques. En effet, une lipémie postprandiale élevée est souvent associée à l'obésité et à une dyslipidémie, deux composantes du syndrome métabolique qui peuvent engendrer des complications médicales, incluant diabète et maladies cardiovasculaires. La lactoferrine (Lf) inhibe l'épuration hépatique des chylomicrons, conduisant à une élévation de la lipémie postprandiale par des mécanismes moléculaires non élucidés. Il est aussi établi que le *Lipolysis Stimulated Receptor* (LSR) contribuait à l'épuration des lipoprotéines riches en triglycérides pendant la phase postprandiale. L'objectif était de déterminer s'il existait une interaction entre la Lf et le LSR. Les études de cultures cellulaires ont montré que si la Lf n'affectait pas le taux d'expression du LSR dans des cellules Hepa 1-6 de souris, elle co-localisait avec le LSR en présence d'oléate, un composé requis pour l'activation du récepteur. Des expériences de *ligand-blotting* ont également montré que la Lf se fixait sur le LSR purifié et inhibait la fixation de lipoprotéines riches en triglycérides. Les domaines N et C-terminaux isolés de cette protéine, ainsi qu'un mélange de peptides obtenu après double hydrolyse de la Lf par la trypsine et la chymotrypsine, conservent cette propriété. Nous proposons que l'élévation de la lipémie postprandiale observée *in vivo* suite à un traitement par la Lf soit médiée par son interaction avec le LSR, inhibant ainsi l'épuration des chylomicrons et de leurs remnants.

Mots clefs : lipémie postprandiale, chylomicrons, triglycérides, peptides, hydrolyse enzymatique, acide gras.