



HAL
open science

Identification dans les sérums de mammifères de peptides (MW < 1000 DA) à activité mitogénique. Influence de ces peptides sur les activités biologiques des IGF1 et IGF2

Mahrou Sarem

► **To cite this version:**

Mahrou Sarem. Identification dans les sérums de mammifères de peptides (MW < 1000 DA) à activité mitogénique. Influence de ces peptides sur les activités biologiques des IGF1 et IGF2. Médecine humaine et pathologie. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2000. Français. NNT : 2000NAN10306 . tel-01746897

HAL Id: tel-01746897

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01746897>

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

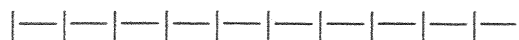
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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>

Ecole Doctorale : BIOLOGIE, SANTE et ENVIRONNEMENT



THÈSE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARE, NANCY I

Spécialité : GENIE BIOLOGIQUE ET MEDICAL

présentée et soutenue publiquement

par

Mahrou SAREM

le 21 Novembre 2000

***IDENTIFICATION DANS LES SERUMS DE MAMMIFERES
DE PEPTIDES (MW < 1 000 DA) À ACTIVITE MITOGENIQUE.
INFLUENCE DE CES PEPTIDES SUR LES ACTIVITES BIOLOGIQUES DES
IGF1 ET IGF2.***

Directeur de Thèse : Prof. P. NABET

MEMBRES DU JURY :

Mr le Prof. P. NABET, Laboratoire de Biochimie, NANCY, Président

Mr le Prof. J.C HENRY, Laboratoire de Biochimie, BESANCON

Mr le Prof. F.X. MAQUART, Laboratoire de Biochimie et Biol. moléculaire, REIMS

Mme le Dr B. DOUSSET, RIA, Hôpital Central, NANCY

Mme le Dr M.H. LAFAGE-PROUST, Laboratoire du tissu osseux, St ETIENNE

Mr le Dr A. CLEMENT, Laboratoire d'Eco-Physiologie, INRA, NANCY

A mon père,

*Parti trop tôt,
qui restera toujours un exemple d'honnêteté et d'intelligence.*

A ma mère,

pour ses sacrifices et son amour

A ma soeur et à mes frères,

Ainsi qu'à mes amis

qui ne m'ont pas laissée seule devant les multiples difficultés inhérentes à la vie.

Nous tenons tout d'abord à exprimer notre gratitude et profond respect à

Madame le Professeur Francine BELLEVILLE-NABET,

qui a dirigé ces recherches. Ces conseils judicieux, sa disponibilité et son suivi permanent avec beaucoup de patience et de rigueur scientifique, ont permis la réalisation de ce travail.

Monsieur le Professeur Pierre NABET.

Nous vous remercions d'avoir accepté d'être le Président du jury de cette thèse. Vous nous avez accueilli avec chaleur dans vos laboratoires que ce soit à la Faculté de Médecine, à l'Hôpital Central ou à Dommartin-les-Toul. Nous avons eu la chance d'apprécier votre compétence scientifique, vos grandes qualités humaines et votre gentillesse. Nous n'oublierons jamais toute l'aide que vous nous avez apportée.

Monsieur le Professeur HENRY

Qu'il me soit permise de vous témoigner ma gratitude d'avoir accepté de juger cette thèse et d'en être le rapporteur.

Monsieur le Professeur MAQUART

Vous me faites un grand honneur en acceptant de faire partie de notre jury de thèse et d'en être le rapporteur.

Madame le Docteur Brigitte DOUSSET

Nous vous sommes très reconnaissante d'avoir accepté de faire partie de ce jury. Vos qualités humaines, votre aide, vos conseils et votre compétence m'ont été très précieux tout au long de cette thèse. C'est un honneur et une grande chance de trouver aussi en vous une grande amie.

Madame le Docteur LAFAGE-PROUST

Nous vous sommes très reconnaissante d'avoir accepté de faire partie de ce jury et d'y consacrer un peu de temps.

Monsieur le Docteur CLEMENT

Nous vous remercions sincèrement d'avoir accepté de participer à notre jury de thèse. Nous vous remercions pour tous les conseils judicieux que vous nous avez prodigués et le temps que vous nous avez consacré.

Je remercie tout particulièrement **Madame Audrey ISCH** qui a assuré avec beaucoup de compétence et de patience la rédaction de ce manuscrit. Sa bonne humeur et sa gentillesse ont été de grandes sources d'énergie.

Je remercie également **Thierry FONTAINE** pour l'aide qu'il m'a apportée pendant les travaux expérimentaux et pour son soutien.

J'exprime ma plus grande gratitude à **Madame le Docteur Voichiya BUCUR** qui a suivi mes travaux de D.E.A. et ensuite ma thèse et que, sans sa gentillesse, son amabilité, son soutien et ses encouragements durant toutes ces années, ce travail ne pouvait pas voir la fin.

Je remercie

mon cher ami et collègue, **Michel Dzondo-Gadet**, qui m'a fait profiter de ses conseils et de son amitié.

mes amis et collègues de la **Faculté de Médecine**, de l'**INRA** de Champenoux, de l'**hôpital Jeanne d'Arc** de Dommartin-les-Toul ainsi que de l'**hôpital Central** de Nancy qui m'ont soutenue avec beaucoup de gentillesse.

SOMMAIRE

OBJECTIFS DU TRAVAIL	1
I- INTRODUCTION	3
II - MATERIEL ET METHODES	58
III - RESULTATS	91
IV - DISCUSSION	198
V- CONCLUSION ET PERSPECTIVES	228
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	233
PUBLICATIONS	265
ANNEXE	

Table des matières

OBJECTIFS DU TRAVAIL	1
I - INTRODUCTION	
I-1. IGF1, IGF2	3
I-1.1. Historique.	
I-1.2. Structure des IGFs et de leurs gènes.	3
I-1.2.1. Structure des IGFs.	3
I-1.2.2. Structure des gènes des IGFs.	6
I-1.3. Les protéines de liaison.	8
I-1.3.1. Caractéristiques des protéines de liaison.	8
I-1.3.2. Transport des IGFs.	8
I-1.3.3. Régulation des IGFBPs.	10
I-1.3.4. Protéines de liaison et régulation de l'activité IGFs.	13
I-1.4. Les récepteurs des IGFs.	13
I-1.4.1. Le récepteur de type I (IGF-RI).	13
I-1.4.2. Le récepteur de type II (IGF-RII).	13
I-1.5 La transduction du signal.	18
I-1.6 Rôles physiologiques.	18
I-1.6.1. IGFs et croissance.	21
I-1.6.2. IGFs et métabolisme général.	22
I-1.6.3. IGFs, prolifération, différenciation et mort cellulaire.	25
I-1.7. Essais thérapeutiques.	25
I-1.7.1. Volontaires sains.	26
I-1.7.2. Traitement par IGF1 des sujets déficitaires en récepteur d'hGH.	26
I-1.7.3. IGF1, résistance à l'insuline et diabète.	28
I-1.7.4. IGF1 et maladies dégénératives.	29
I-1.7.4.1. Chez les personnes âgées.	29
I-1.7.4.2. Dans les maladies neurodégénératives.	29

I-1.7.5. IGFI dans l'ostéoporose.	30
I-1.7.6. IGFI et insuffisance rénale.	32
I-1.7.7. Effets secondaires des IGF1.	32
I - 2. IGF1 et IGF2 chez les animaux.	34
I-2.1. Le porc.	35
I-2.2. Bovins et ovins.	37
I-2.3. Cheval.	39
I-2.4. Les rongeurs (lapins et rats).	39
I-2.5. Poulet.	41
I - 3. Les facteurs de croissance de petit poids moléculaire (FCPPM OU LMWGF).	42
I-3.1. Leur mise en évidence.	42
I-3.2. Propriétés physico-chimiques des FCPPM.	45
I-3.3. Propriétés biologiques.	46
I-3.3.1. Les FCPPM et activité de sulfatation des IGFs.	46
I-3.3.2. FCPPM et activité mitogénique.	46
I-3.4. Variations physiologiques et pathologiques.	47
I-3.5. Origine.	51
I-3.6. Purification.	51
I-3.7. Les FCPPM chez les animaux.	55
I-3.7.1. Activité de sulfatation.	55
I-3.7.2. Activité mitogénique.	56
II - MATERIEL ET METHODES	
II - 1. Préparation des échantillons à tester.	58
II - 2. Culture cellulaire.	58
II-2.1. Matériel utilisé.	58
II-2.2. Les lignées cellulaires.	59
II-2.3. Conditions de culture.	60
II-2.3.1. Milieu de culture de fibroblastes et d'hybridomes.	60

II-2.3.2. Milieu de culture des cellules MCF7.	60
II-2.4. Quelques techniques de base en culture cellulaire.	61
II-2.4.1. Culture et entretien des fibroblastes.	61
II-2.4.2. Culture et entretien des MCF7.	62
II-2.4.3. Congélation et décongélation.	62
II-2.4.4. Numération cellulaire.	63
II - 3. Dosage d'activité mitogénique.	63
II-3.1. Isolement des fibroblastes d'embryons de poulets.	63
II-3.2. Mesure de l'activité mitogénique.	64
II-3.3. Etude statistique.	67
II-3.4. Emploi d'inhibiteur de la PKC.	68
II-4. Recherche et quantification par tests immunologiques des FCPPM.	68
II-4.1. Fixation de l'antigène sur les microplaques (coating).	69
II-4.2. Saturation des sites restés libres.	69
II-4.3. Réaction antigène-anticorps.	69
II-4.4. Révélation du complexe antigène-anticorps.	70
II-5. Transports membranaires.	70
II-5.1. Transport du glucose.	70
II-5.1.1. Préparation des cellules.	70
II-5.1.2. Mode opératoire.	71
II-5.2. Transport des acides aminés.	72
II-5.2.1. Préparation des cellules.	72
II-5.2.2. Mode opératoire.	72
II-6. Etude des protéines.	73
II-6.1. Synthèse des protéines.	73
II-6.2. Cinétique de la synthèse protéique.	74
II-6.3. Phosphorylation des protéines.	76
II-6.4. Electrophorèse SDS-PAGE.	76
II-6.4.1. Préparation des gels.	76
II-6.4.1.1. Les solutions.	77
II-6.4.1.2. Les gels.	78

II-6.4.2. Mode opératoire.	79
II-6.5. Autoradiographie.	80
II-6.6. Recherche par immunoblot de la PKC.	81
II-6.6.1. Electrotransfert sur membrane de nitrocellulose.	81
II-6.6.1.1. Réactifs.	81
II-6.6.1.2. Mode opératoire.	81
II-6.6.2. Révélation de la PKC.	82
II-6.6.2.1. Réactifs.	82
II-6.6.2.2. Mode opératoire.	83
II-7. Cytométrie de flux.	83
II-7.1. Apoptose.	84
II-7.1.1. Cycle cellulaire.	85
II-7.1.1.1. Réactifs.	85
II-7.1.1.2. Mode opératoire.	85
II-7.1.2. Annexine V.	87
II-7.1.2.1. Réactifs.	87
II-7.1.2.2. Mode opératoire.	87

III - RESULTATS

III-1. Recherche des FCPPM dans différentes espèces animales.	91
III-1.1. Activité mitogénique.	91
III-1.1.1. Activité mitogénique des UF seuls.	91
III-1.1.2. Activité mitogénique des UF d'animaux en présence d'IGF1.	101
III-1.1.3. Activité mitogénique des UF d'animaux en présence d'IGF2.	110
III-1.2. Recherche par test ELISA de HWESAS dans des sérums d'animaux.	117
III-2. Activité biologique de différents peptides de synthèse.	120
III-2.1. Activité mitogénique.	120
III-2.1.1. Activité mitogénique des peptides seuls.	120
III-2.1.1.1. Fibroblastes d'embryons de poulets.	121
III-2.1.1.2. Cellules 3T6.	121
III-2.1.1.3. Mark 3.	126

III-2.1.1.4. MCF7.	126
III-2.1.2 Activité mitogénique des peptides de synthèse en présence d'IGF1.	132
III-2.1.2.1. Fibroblastes d'embryons de poulets.	132
III-2.1.2.2. MCF 7.	136
III-2.1.2.3. Fibroblastes humains transformés.	136
III-2.1.3. Activité mitogénique des peptides en combinaison avec IGF2.	141
III-2.1.3.1. Fibroblastes d'embryons de poulets.	141
III-2.1.3.2. Cellules MCF7.	145
III-2.1.4. Activité séquentielle de HWESAS et du peptide de 17 aa.	149
III-2.1.5 Utilisation d'inhibiteurs de la PKC.	153
III-2.2. Effet sur l'apoptose.	162
III-2.2.1. Mesure de la phase sub GO (cycle cellulaire).	162
III-2.2.2. Annexine-FITC.	163
III-2.3. Effet de HWESAS sur le transport membranaire.	173
III-2.3.1. Entrée du glucose dans les cellules.	173
III-2.3.2. Entrée des acides aminés.	175
III-2.4 Action de HWESAS sur la synthèse des protéines.	179
III-2.4.1. Quantification des protéines totales.	179
III-2.4.2. Mesure de l'incorporation d'acides aminés marqués.	182
III-2.4.3. Autoradiographie des protéines synthétisées.	185
III-2.4.4. Phosphorylation des protéines	190
III-2.4.4.1. Phosphorylation totale.	190
III-2.4.4.2. Autoradiographie des protéines phosphorylées.	196

IV- DISCUSSION

IV - I. Présence de FCPPM dans les sérums d'animaux.	198
IV- 1.1. Rappel des résultats obtenus avec UF et rétentats de sérums.	198
IV-1.2. Action des UF d'origine animale sur la prolifération cellulaire en présence d'IGF1 et d'IGF2.	199
IV-2. Activité mitogénique de HWESAS et de peptides ayant une relation structurale dans différentes lignées cellulaires.	204
IV-2.1. Etude sur différentes lignées cellulaires	204
VI-2.2. Les voies de transduction du signal.	206

IV-2.3. HWESAS est-il un facteur de compétence ?	209
IV-2.4. Rôle de la PKC dans la transduction du signal IGF et HWESAS.	210
IV-2.5. Activité mitogénique d'autres peptides ayant une relation structurale avec HWESAS.	215

IV - 3. Activités métaboliques de HWESAS 217

IV-3.1. Entrée du glucose dans la cellule.	219
IV-3.2 Entrée des acides aminés et synthèse protéique.	223
IV-3.3. Apoptose.	

V - CONCLUSION ET PERSPECTIVES

V-1. Activité mitogénique.	230
V-2. Transport transmembranaire et synthèse protéique.	231
V-3. Effet des peptides sur l'apoptose.	232

Liste des figures

Fig. 1 : Structure comparée de l'insuline, de la proinsuline et des IGFs.	5
Fig. 2 : Structure du gène d'IGF1 chez l'homme et les différents précurseurs de la molécule mature d'IGF1.	7
Fig. 3 : Structure du gène des IGF2 et des différents ARNm qui en sont issus.	7
Fig. 4 : Modifications fonctionnelles potentielles des IGFBPs par protéolyse.	11
Fig. 5 : Liaison de l'IGF1, IGF2 et insuline aux différents récepteurs de cette famille de facteurs de croissance.	14
Fig. 6 : Récepteur à IGF2 (IGF-RII).	17
Fig. 7 : Principales voies de transduction du signal IGFs se liant aux récepteurs IGF-RI.	20
Fig. 8 : Concentrations en IGF1 circulant en fonction de l'âge	23
Fig. 9 A : Séquence en acides aminés d'IGF1 de diverses espèces animales.	36
Fig. 9 B : Séquence en acides aminés d'IGF2 de diverses espèces animales.	36
Fig. 10 A : Activité de sulfatation de sérum entier, de rétentat lavé ramené au volume initial et du mélange R + UF seuil de coupure 1000.	44
Fig. 10 B : Effets de doses croissantes d'UF 1000 sur l'activité de sulfatation de fractions purifiées d'IGF (somatomédine SM).	44
Fig. 11 : Effets de rhIGF1 ou rhIGF2, seul ou en association avec les FCPPM, sur l'incorporation de L [³H]-sérine, D [³H]-glucosamine, [³⁵S]-Na₂SO₄ dans des cartilages pelviens d'embryons de poulets.	48
Fig. 12 : Effet mitogénique de l'UF sur des FEP, testé seul ou en présence de fractions partiellement purifiées d'IGF1 ou d'IGF2	49

Fig. 13 : Effets d'un ultrafiltrat et de fractions partiellement purifiées d'IGF1 et d'IGF2, sur l'incorporation de [³H]-thymidine par les lymphocytes humains activés par la phytohémagglutinine.	50
Fig. 14 A : Purification des FCPPM par chromatographie HPLC.	53
Fig. 14 B : HPLC analytique sur Vydac C18 de la fraction active précédemment obtenue.	53
Fig. 15 : Etude par spectrométrie de masse des pics 1 (A), 2 (B) et 3 (C) obtenus par chromatographie HPLC.	54
Fig. 16 : Représentation schématique du cycle cellulaire.	66
Fig. 17 : Dosage des protéines totales.	75
Fig. 18 : Présentation schématique des résultats obtenus par cytométrie en flux après le double marquage de l'annexine V-FITC et iodure de propidium (IP).	90
Fig. 19 : Activité mitogénique d'UF de sérums d'animaux.	93
Fig. 20 : Activité mitogénique d' UF de sérums d'animaux.	95
Fig. 21 : Activité mitogénique d' UF de sérums de lapin, souris et rat(exp 1)	98
Fig. 22 : Activité mitogénique d'UF de sérums de lapin, souris et rat (exp. 2).	100
Fig. 23 : Activité mitogénique d'UF des sérums d'animaux. Pour chaque espèce un Anova suivi d'un test de Student Newman Keuls (distribution normale) ou de Kruskal-Wallis suivi d'un test de Dunn ont été effectués.	102
Fig. 24 : Mesure de l'activité mitogénique d'IGF1.	103
Fig. 25 : Mesure de l'activité mitogénique de IGF1 et IGF1 associé aux UF de sérums d'animaux.	106
Fig. 26 : Mesure de l'activité mitogénique d'IGF1 et IGF1 associé aux UF de sérums de lapin, souris et rat.	108
Fig. 27 : Activité mitogénique d'IGF1 (15 ng/ml), d'UF 10 % et IGF1 associé à UF 10 %.	109
Fig. 28 : Mesure de l'activité mitogénique d'IGF2.	111
Fig. 29 : Mesure de l'activité mitogénique de IGF2 et IGF2 associé aux UF de sérums d'animaux.	113

Fig. 30 : Mesure de l'activité mitogénique d'IGF2 et IGF2 associé aux UF de sérum de lapin, souris et rat.	115
Fig. 31 : Activité mitogénique d'IGF2 (50 ng/ml), d'UF 10 % et IGF2 associé à UF 10 %.	116
Fig. 32 : Gammes d'étalonnage obtenues avec HWESAS fixé sur des microplaques et des dilutions différentes d'anticorps anti-HWESAS	118
Fig. 33 : Gammes d'étalonnage obtenues avec HWESAS. Agrandissement pour des faibles valeurs des courbes de la figure 32.	119
Fig. 34 : Mesure de l'activité mitogénique des peptides seuls mesurée dans des FEP.	123
Fig. 35 : Effet mitogénique de WGHE sur des fibroblastes de souris 3T6.	124
Fig. 36 : Effet mitogénique de HWESAS sur des fibroblastes de souris 3T6.	125
Fig. 37 : Effet mitogénique du peptide à 17 aa sur des fibroblastes de souris 3T6.	127
Fig. 38 : Mesure de l'activité mitogénique de HWESAS et du peptide de 17 aa sur des cellules Mark 3.	128
Fig. 39 : Mesure de l'activité mitogénique de HWESAS et du peptide de 17 aa sur des cellules MCF7.	130
Fig. 40 : Mesure de l'activité mitogénique des peptides en combinaison avec IGF1 dans des FEP.	134
Fig. 41 : Résultats de l'interaction des peptides et d'IGF. L'analyse statistique utilisée est l'analyse de variance ANOVA multifactorielle.	135
Fig. 42 : Activité mitogénique d'IGF1 et d'IGF1 + peptides mesurée sur des cellules MCF7.	138
Fig. 43: Mesure de l'activité mitogénique de HWESAS et du peptide de 17 aa en combinaison avec IGF1 (15 ng/ml) réalisées sur des fibroblastes humains transformés.	140
Fig. 44 : Mesure de l'activité mitogénique des peptides en combinaison avec IGF2	143
Fig. 45 : Résultats de l'interaction des peptides et d'IGF2. L'analyse statistique utilisée est l'analyse de variance ANOVA multifactorielle.	144
Fig. 46 : Mesure de l'activité mitogénique de HWESAS et du peptide de 17 aa en combinaison avec IGF2 sur des cellules MCF7.	147

Fig. 47 : Etude de l'activité mitogénique de HWESAS associé aux IGFs, lorsque ces composés sont ajoutés séquentiellement. 1 ^{er} exp.	150
Fig. 48 : Etude de l'activité mitogénique de HWESAS associé aux IGFs, lorsque ces composés sont ajoutés séquentiellement. 2 ^{ème} exp.	151
Fig. 49 : Etude de l'activité mitogénique du peptide de 17 aa associé aux IGFs, lorsque ces composés sont ajoutés séquentiellement.	152
Fig. 50 : Mise en évidence de la PKC par immunoblot dans des FEP traités par les facteurs de croissance.	154
Fig. 51 : Rôle de la PKC dans l'activité mitogénique d' IGF1 et d' IGF2 en combinaison avec HWESAS.	158
Fig. 52 : Rôle de l'inhibition de la PKC dans l'activité mitogénique : HWESAS, IGF1 et IGF1 + HWESAS, IGF2 et IGF2 + HWESAS.	161
Fig. 53 : Distribution des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire dans une culture de FEP en absence de SVF (T ⁻), en présence de SVF 10 % (T ⁺), en présence d'IGF1 (15 ng/ml), d'IGF2 (50 ng/ml) et d'HWESAS (P) à 7 ng/ml pendant 12 h , 24 h et 48 h .	165
Fig. 54 : Diagrammes mono et biparamétriques obtenus par cytométrie en flux après marquage par IP et annexine V.	167
Fig. 55 : Diagrammes mono et biparamétriques obtenus par cytométrie en flux après marquage par IP et annexine V.	168
Fig. 56: Pourcentage de cellules en apoptose par rapport aux cellules vivantes mesuré par la méthode à l'annexine-FITC après 24 h d'incubation.	170
Fig. 57 : Diagrammes mono et biparamétriques obtenus par cytométrie en flux après marquage par IP et annexine V.	171
Fig. 58 : Diagrammes mono et biparamétriques obtenus par cytométrie en flux après marquage par IP et annexine V.	172
Fig. 59 : Entrée du glucose dans des FEP.. Les résultats IGF1 + HWESAS est comparé à IGF1 seul.	174
Fig. 60 : Entrée du glucose dans des FEP. IGF2 + HWESAS est comparé à IGF2 seul.	176
Fig. 61 : Entrée des aa dans des FEP. Les essais (IGF1 + HWESAS) sont comparés à IGF1 seul.	177
Fig. 62 : Entrée des aa dans des FEP. Les essais (IGF2 + HWESAS) sont comparés à IGF2 seul.	178

Fig 63 : Action d'IGF1 et d'IGF2 seuls et en présence de HWESAS sur la synthèse des protéines intracellulaires.	181
Fig 64 : Electrophorèse SDS-PAGE (gel de polyacrylamide 13 %) des protéines intracellulaires.	183
Fig. 65 : Néosynthèse des protéines par mesure de l'incorporation de [³⁵ S]-cystéine et de [¹⁴ C]-proline	184
Fig. 66 : Mesure de l'incorporation de [³⁵ S]-cystéine.. IGF1 ou IGF2 + HWESAS sont comparés respectivement à IGF1 ou IGF2.	186
Fig. 67 : Mesure de l'incorporation de [¹⁴ C]-proline.. IGF1 ou IGF2 + HWESAS sont comparés respectivement à IGF1 ou IGF2	187
Fig 68 : Autoradiographie des protéines intracellulaires marquées à [³⁵ S]-cystéine	188
Fig 69 : Autoradiographie des protéines intracellulaires marquées à [¹⁴ C]-proline	189
Fig. 70 : Action d' IGF1, HWESAS et IGF1 + HWESAS sur la phosphorylation des protéines.	191
Fig. 71 : Action d'IGF1 et d'IGF1 + HWESAS sur la phosphorylation des protéines (cinétique).	194
Fig. 72 : Action d'IGF2 et d'IGF2 + HWESAS sur la phosphorylation des protéines (cinétique).	195
Fig 73 : Autoradiographie des protéines intracellulaires phosphorylées en présence de IGF1 et d'IGF2	197
Fig. 74 : Transduction du signal à travers IGF-RI faisant intervenir soit IRS-1 et Pi3 kinase soit la liaison directe de SHC aux récepteurs et activation de la voie des MAP kinase conduisant à la stimulation de l'activité mitogénique	207
Fig. 75 : Recrutement de différentes protéines par IRS activé	208
Fig. 76 : Structure des PKC et d'une PKC related kinase.	213
Fig. 77 : Structure des PKC et impact des différents inhibiteurs.	213
Fig. 78 : Schéma des voies apoptotiques.	225

Liste des tableaux

Tableau I : Principales propriétés des IGFs.	9
Tableau II : Principales actions de l'IGF.	24
Tableau III : Effets de l'IGF1 dans le système nerveux central et périphérique.	31
Tableau IV : Traceurs utilisés pour suivre la synthèse des protéines dans les fibroblastes.	73
Tableau V : Activité mitogénique d'UF de sérums d'animaux mesurée par incorporation de [³H]-thymidine dans des FEP (expérience 1).	92
Tableau VI : Activité mitogénique d'UF de sérums d'animaux (expérience 2).	94
Tableau VII : Activité mitogénique d'UF de sérums de lapin, souris et rat (expérience 1).	97
Tableau VIII : Activité mitogénique d'UF de sérums de lapin, souris et rat (expérience 2).	99
Tableau IX : Comparaison de la puissance de l'activité mitogénique des différents UF d'animaux en prenant en compte les résultats de plusieurs expériences (3) et toutes concentrations confondues.	101
Tableau X : Mesure de l'activité mitogénique d'IGF1 (incorporation de [³H]-thymidine dans des FEP en fonction de quantités croissantes.	103
Tableau XI : Mesure de l'activité mitogénique d'IGF1 et d'IGF1 utilisé avec les UF de sérum d'animaux.	105
Tableau XII : Mesure de l'activité mitogénique des UF de lapin, souris et rat en combinaison avec IGF1.	107
Tableau XIII : Comparaison de la puissance des UF sur l'activité mitogénique d'IGF1.	109

Tableau XIV : Effet mitogénique d'IGF2 (mesure de l'incorporation de [³H]-thymidine dans des FEP en fonction de la concentration utilisée.	111
Tableau XV : Mesure de l'activité mitogénique d'IGF2 et d'IGF2 utilisé avec les UF de sérums d'animaux.	112
Tableau XVI : Mesure de l'activité mitogénique des UF de lapin, souris et rat en combinaison avec IGF2.	114
Tableau XVII : Comparaison de la puissance des UF sur l'activité mitogénique d'IGF2.	116
Tableau XVIII : Effet mitogénique de peptides seuls, mesuré par incorporation de [³H]-thymidine dans des FEP.	122
Tableau XIX : Effet mitogénique de peptides de synthèse mesuré par incorporation de [³H]-thymidine dans des fibroblastes de souris 3T6.	124
Tableau XX : Effet mitogénique de HWESAS mesuré par incorporation de [³H]-thymidine dans des fibroblastes de souris 3T6.	125
Tableau XXI : Effet mitogénique du peptide de synthèse de 17 aa mesuré par incorporation de [³H]-thymidine dans des fibroblastes de souris 3T6.	127
Tableau XXII : Activité mitogénique de HWESAS et du peptide de 17 aa mesurée sur des cellules hybridomes Mark 3.	128
Tableau XXIII : Activité mitogénique de HWESAS et du peptide de 17 aa mesurée sur des cellules MCF7.	129
Tableau XXIV : Tableau récapitulatif indiquant le rapport de stimulation maximum et la dose pour laquelle il est obtenu.	131
Tableau XXV : Activité mitogénique de peptides de synthèses testée en présence d'IGF1 dans des FEP.	133
Tableau XXVI : Activité mitogénique d'IGF1 et d'IGF1 + peptide, mesurées sur des cellules MCF7.	137
Tableau XXVII : Activité mitogénique de HWESAS et du peptide 17 aa, mesurée sur des fibroblastes humains transformés.	139
Tableau XXVIII : : Activité mitogénique de peptides de synthèses testée en présence d'IGF1 dans des FEP.	142
Tableau XXIX : Activité mitogénique d'IGF2 et d'IGF2 + peptide mesurées sur des cellules MCF7.	146

Tableau XXX : Effet mitogénique des peptides seuls et ajoutés à IGF1 ou IGF2 sur les FEP.	148
Tableau XXXI : Effet d'un inhibiteur de la PKC sur l'activité mitogénique d'IGF1 et d'IGF2 utilisé en présence d'HWESAS.	157
Tableau XXXII : Effet d'un inhibiteur de la PKC (bisindolylmaléimide) sur l'activité mitogénique de HWESAS, d'IGF1 et d'IGF1 + HWESAS.	159
Tableau XXXIII : Effet d'un inhibiteur de la PKC ((bisindolylmaléimide) sur l'activité mitogénique de HWESAS, IGF2 et IGF2 + HWESAS.	160
Tableau XXXIV : Etude du cycle cellulaire à 12 h, 24 h et 48 h d'incubation.	164
Tableau XXXV : Apoptose en présence d'IGF1 (15 ng/ml), IGF2 (50 ng/ml) et HWESAS (7 ng/ml).	169
Tableau XXXVI : Effet de l'IGF1 et de l'hexapeptide seuls et en combinaison sur le transport membranaire du glucose mesuré par l'incorporation de 2 désoxy [³H]-glucose.	174
Tableau XXXVII : Effet d'IGF2 et de l'hexapeptide seuls et en combinaison sur le transport membranaire du glucose mesuré par l'incorporation de 2 désoxy [³H]-glucose.	176
Tableau XXXVIII : Entrée des aa dans la cellule mesurée par l'incorporation d'AIB*. IGF1 et HWESAS ont été testés seuls et en combinaison.	177
Tableau XXXIX : Entrée des aa dans la cellule mesurée par l'incorporation d'AIB*. IGF2 et HWESAS ont été testés seuls et en combinaison.	178
Tableau XXXX : Effet d'HWESAS, d'IGF1 et d'IGF2 sur la synthèse protéique.	180
Tableau XXXXI : Néosynthèse de protéines. Mesure de l'incorporation d'acides aminés marqués dans des FEP.	184
Tableau XXXXII : Mesure de l'incorporation de [³⁵S]-cystéine dans des FEP.	186
Tableau XXXXIII : Mesure de l'incorporation de [¹⁴C]-proline dans des FEP Les résultats sont la moyenne de 4 réplifications.	187
Tableau XXXXIV : Phosphorylation des protéines sous l'action d'IGF1, HWESAS ou d'IGF1 + HWESAS.	191
Tableau XXXXV : Cinétique de phosphorylation des protéines sous l'action d'IGF1, IGF2, HWESAS, IGF1 + HWESAS et d'IGF2 + HWESAS. L'expérience a été faite sur des FEP (1^{ère} expérience).	192

Tableau XXXVI : Cinétique de phosphorylation des protéines sous l'action d'IGF1, IGF2, IGF1 + HWESAS et d'IGF2 + HWESAS. L'expérience a été faite sur des FEP (2^{ème} expérience).

19

Tableau XXXVII : RS de HWESAS seul ou en combinaison avec les IGF1 ou IGF2

20

Liste des publications

Capiaumont J., Jacob C., **Sarem M.**, Nabet P., Belleville F., Dousset B. (2000)
Assay of a seric human hexapeptide (HWESAS) using a monoclonal antibody and ELISA.
Clinica Chimica Acta, 293, 89-103.

Sarem M., Jacob C., Capiaumont J., Franck P., Nabet P., Dousset B. (2000)
Presence of seric low molecular mass substances with growth factor activity in serum of mammals.
J. Animal Science, (soumis)

Communications orales ou affichées

Dousset B., Hussenet F., **Sarem M.**, Nabet P.
Cytokines et fertilité masculine.
13^e Colloque CORATA, IX^e Symposium des CLCC, IAES workshop

Hussenet F., **Sarem M.**, Daudin M., Foliguet B., Nabet P., Dousset B.
Seminal cytokines and male infertility.
Eurobiologie, 9^e Colloque international de Pont-à-Mousson, France, 29 Sept-3 Oct. 1996

Dousset B., Hussenet F., **Sarem M.**, Hubert J., Nabet P., Kessler M.
Ratio free releasable to total IGF-I in chronic renal failure.
4th International Symposium on Insulin-Like Growth Factors, Tokio, Japon, 21-24th Oct. 1997

Sarem M., Dousset B., Handaj A., Nabet P., Belleville-Nabet F.
The mitogenic activity of IGF is modulated by fragments of third component of human complement.
33rd Annual Scientific Meeting of European Society for Clinical Investigation, Milan, Italy, 7-10th April 1999

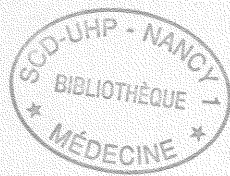
Gambier F., Borgniet N., **Sarem M.**, Dousset B., Nabet P.
Evaluation du dosage de l'insuline par l'automate immulite de DPC.
Colloque CORATA, Liège, Belgique.

LISTE DES ABREVIATIONS

aa	: acide aminé
ADN	: acide désoxyribonucléique
AIB	: acide α isobutyrique
AIF	: apoptosis inducing factor
ALS	: sous-unité acide labile
Apaf 1	: apoptosis protease activating factor 1
ARN	: acide ribonucléique
ATP	: adénosine triphosphate
BCA	: bicinchoninic acid
b FGF	: Basic Fibroblast growth Factor
BSA	: albumine sérique bovine
CABS	: tampon citrate trisodique pH 7,6
CEFA	: Chick embryo fibroblast assay
CEI	: chromatographie d'échange d'ions
CMF	: cytométrie en flux
Da	: dalton
DAB	: 3,3'-diaminobenzédine
DD	: death domain
2 déoxy [^3H]-G	: 2 déoxyglucose marqué au tritium
DISC	: death inducing signaling complex
DMSO	: diméthylsulfoxyde
DNAse	: désoxyribonucléase
DTT	: dithiothréitol
EDTA	: acide éthylène diamine tétraacétique
EGF	: Epidermal Growth Factor
ESI-MS	: Electrospray Ionization Mass Spectrometry
FADD	: Fas associated protein with DD
FCA	: Fat Cell Assay
FCPPM	: Facteurs de croissance de petit poids moléculaire
FEP	: Fibroblastes d'embryons de poulets
FITC	: isothiocyanate de fluorescéine (<i>fluoresceine isothiocyanate</i>)
FLS	: Forward Light Scatter
FPLC	: Fast Performance Liquide Chromatography

GBq	: Giga becquerel
GH	: Growth Hormone : hormone de croissance
Grb2	: Growth factor binding protein 2
HEPES	: 4-(2-hydroxyéthyl) piperazine-1-éthane sulfonic acid
HCG	: hormone choriogonadotrophine
HMG Co A	: β hydroxy β méthyl glutaryl coenzyme A
HPLC	: chromatographie liquide haute performance
ICE	: interleukine 1 β converting enzyme
IGF1	: Insulin-Like Growth Factor 1
IGF2	: Insulin-Like Growth Factor 2
IGFBP	: Insulin-Like Growth Factor binding protein
IGF-RI	: récepteur à IGF de type I
IGF-RII	: récepteur à IGF de type II
IGFs	: Insulin-Like Growth Factors
Il 6	: interleukine 6
IP	: iodure de propidium
IRC	: insuffisance rénale chronique
kDa	: kilo-dalton
MAPK ou (ERK I)	: Mitogen activated protein kinase, extracellular signal regulated kinase I.
MBq	: Méga becquerel
MEM	: milieu minimum de Eagle
MSA	: Multiplication Stimulating Activity
NIDDM	: diabète non insulino-dépendant
NSILA	: Non Suppressible Insulin-Like Activity
PAGE	: électrophorèse en gel de polyacrylamide
PBA	: Protein Binding Assay
PBS	: Phosphate Buffer Saline
PDGF	: Platelet Derived Growth Factor
PKD	: Phosphoinoside dependent kinase = Akt
PGE₂	: prostaglandine E ₂
PHA	: phytohémoglutinine
Pi3K	: Phosphatidylniositol 3 kinase
PKA	: protéine kinase A
PKC	: protéine kinase C
PMSF	: phényl-méthyl-sulfonyl fluoride
PS	: phosphatidylsérine
PSA	: Phosphate spécifique antigen

PTPC	: permability transition pore complex
R	: rétentat
RIA	: radioimmunoassay
RNAse	: ribonucléase
RPMI	: Roosevelt Park Medical Institute (milieu de culture du)
RRA	: Radioreceptor Assay
RS	: rapport de stimulation
SDS	: dodécyl-sulfate de sodium
SH₂	: Src homology 2
SIMPs	: soluble intermembranar proteins
SLA	: sclérose latérale amyotrophique
Sm-A	: somatomédine A
Sm-C	: somatomédine C
SoS	: facteur d'échange de la protéine Ras
SVF	: sérum de veau foetal
TBq	: Tera Becquerel
TCA	: acide trichloracétique
TFA	: acide trifluoacétique
TMB	: 3,5, 3', 5' tétraméthylbenzidine
TNF-R1	: récepteur au TNF α de type I
TRADD	: TNF-R associated protein wit DD
UF	: ultrafiltrat



I- INTRODUCTION

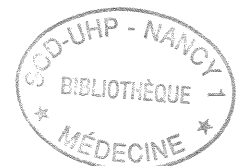
Depuis plusieurs années les travaux du laboratoire de Biochimie Médicale de la Faculté de Médecine portent sur les facteurs de croissance.

Les travaux ont d'abord porté sur la purification d'IGF1 et IGF2 (insulin-like growth factors 1 et 2) à partir de pâte IV de Cohn obtenu au cours du fractionnement du plasma humain. Il est rapidement apparu que plus les fractions étaient purifiées, moins elles présentaient d'activité biologique (incorporation de $^{35}\text{SO}_4$ dans des cartilages d'embryons de poulets) d'où l'hypothèse que, au cours de la purification, était perdu un (ou des) facteur(s) indispensable(s) à l'activité biologique des IGFs, hypothèse confortée par le fait que, lorsqu'on ultrafiltre un sérum humain, le rétentat perdait une grande partie de son activité IGF qui était restaurée par l'addition d'un ultrafiltrat à seuil de coupure 1 000. Les facteurs actifs contenus dans l'ultrafiltrat ont été appelés FCPPM (facteurs de croissance de petits poids moléculaire).

De nombreux travaux faits au laboratoire ont conduit à la conclusion que ce (ou ces) facteur(s) devaient être de nature peptidique. Et en effet à partir de sérum humain, deux peptides ont été isolés : HWESAS et WGHE.

Le but de notre travail a été double :

- Etude de sérum d'animaux. Vérifier si les sérums d'animaux présentaient les mêmes caractéristiques que le sérum humain en utilisant l'activité mitogénique des IGFs. Dans cette partie, nous avons testé la présence éventuelle de FCPPM dans le sérum de gros animaux (cheval, boeuf, veau foetal, porc mouton) et de petits animaux (lapin, rat, souris).



- La deuxième partie du travail a été focalisée sur un essai de compréhension de l'activité et du mode d'action des FCPPM (HWESAS, WGHE et autres peptides en relation avec eux).

Leur activité mitogénique mise en évidence sur des fibroblastes d'embryons de poulets s'exerce-t-elle aussi sur d'autres lignées cellulaires ?

L'activité mitogénique passe-t-elle par l'activation d'enzyme telle que la Protéine Kinase C ?

L'effet de HWESAS sur les IGFs nécessite-t-il que ces composés soient ensembles dans les milieux de culture ?

HWESAS modifie-t-il des activités connues des IGFs comme leur action sur l'entrée du glucose et des acides aminés dans les cellules, l'augmentation de la synthèse protéique ?

C'est à ces questions que nous avons essayé de répondre dans ce travail.

OBJECTIFS DU TRAVAIL

I-1. IGF 1, IGF 2

I-1.1. Historique.

Salmon et Daughaday (1957) en étudiant le mécanisme d'action de l'hormone de croissance hypophysaire (GH) mirent en évidence dans le sérum un facteur dont la présence était GH dépendante et qui *in vitro* stimulait l'incorporation de $^{35}\text{SO}_4$ dans le cartilage costal de rats hypophysectomisés. Ce facteur, appelé d'abord facteur de sulfatation, stimule également l'incorporation de [^3H]-thymidine dans l'ADN, de [^3H]-uridine dans l'ARN et de proline dans le collagène (Salmon et Du Vall, 1970 ; Froesch *et al.*, 1985). Daughaday (1972) préféra ensuite attribuer le terme de somatomedines (Sm) à ces facteurs.

Les premiers essais de purification ont conduit à l'isolement de quatre composés : Sm-A (Fryklund *et al.*, 1974), Sm-C (Van Wyck *et al.*, 1974), NSILA (non suppressible insulin-like activity) ou IGF1 (Rinderknecht et Humbel, 1976) et le MSA (Pierson et Temin, 1972) ; le séquençage de ces produits a permis de définir seulement deux molécules dans cette famille l'IGF1 (Sm-C, NSILA) et l'IGF2 (MSA). La Sm-A était un mélange d'IGF1 et d'IGF2.

I-1.2. Structure des IGFs et de leurs gènes.

I-1.2.1. Structure des IGFs.

Le Bouc (1996) a fait récemment une revue sur la biologie des IGFs. IGF1 et IGF2 ont été purifiés à partir de sérum humain (Rinderknecht et Humbel, 1978a et b). Les IGFs actuellement disponibles sont obtenus par génie génétique. IGF1 est un polypeptide de 70 aa tandis que IGF2 est composé de 67 aa. Ces deux composés présentent environ 50 % d'analogie avec la proinsuline, ils présentent à partir de l'extrémité NH_2 terminale 4 domaines B, C, A, D (Fig. 1). B et A ont

une homologie de 40 % avec les chaînes A et B de l'insuline mature, le domaine C persiste dans les IGFs alors qu'il est éliminé lors de la maturation de l'insuline. Le domaine D est spécifique aux IGFs. Le pré-pro IGF1 possède un peptide signal de 25 ou 48 aa en fonction du site d'initiation, la partie de 70 aa correspondant au peptide mature et une région carboxy-terminale (domaine E) dont la longueur et la séquence (35 ou 77 aa) dépendent d'un épissage alternatif. Il y a donc deux propeptides ; IGF1a de 153 aa et IGF1b de 195 aa. Dans le domaine 1 b, il y a un site de protéolyse. Le peptide libéré (IBE1) a une activité mitogénique (Siegfried *et al.*, 1992).

Le pré-pro IGF2 a un peptide signal de 24 aa, les 67 aa du peptide mature et un domaine E de 89 aa. Le peptide signal est excisé par une "signal peptidase" membranaire. le domaine E est également excisé au cours de la maturation. Actuellement on ne connaît aucune fonction pour le domaine E.

Les IGFs ont plusieurs variants : une forme tronquée d'IGF1, à laquelle il manque les trois premiers acides aminés (Gly-Pro-Glu) du côté du NH₂ terminal, a été isolée du colostrum bovin, de l'utérus de porc, du cerveau humain et de l'urine. Le Des (I-3) IGF1 est en général 10 fois plus actif en tant que mitogène qu'IGF1. C'est une conséquence de sa plus faible capacité de liaison aux IGFbps (Ballard *et al.*, 1990).

Des variants plus nombreux ont été identifiés pour IGF2. Un quart environ des IGF2 circulants ne possèdent pas d'alanine en position N-terminale (Rinderknecht et Humbel, 1978 a). Un IGF2 de haut poids moléculaire (9 kDa) a été extrait du liquide céphalo-rachidien humain, d'autres formes de haut poids moléculaire ont été trouvées dans le cerveau (Haselbacher *et al.*, 1985). Dans le sang deux molécules apparentées à IGF2 de 10 kDa (Zumstein *et al.*, 1985 ; Straczek *et al.*, 1990a) et 15 kDa (Gowan *et al.*, 1987) ont été mises en évidence. Un IGF2, variant du foie humain, possède 4 résidus (Arg-Leu-Pro-Gly) à la place de la sérine²⁹ (Jansen *et al.*, 1985).

Un variant d'IGF2, issu de l'ovaire humain, codé par un ARNm fœtal, qui présente 9 bp supplémentaires situées avant le triplet codant pour la sérine²⁹ dans l'ARNm d'IGF2 a été décrit par Yeh *et al.* (1991).

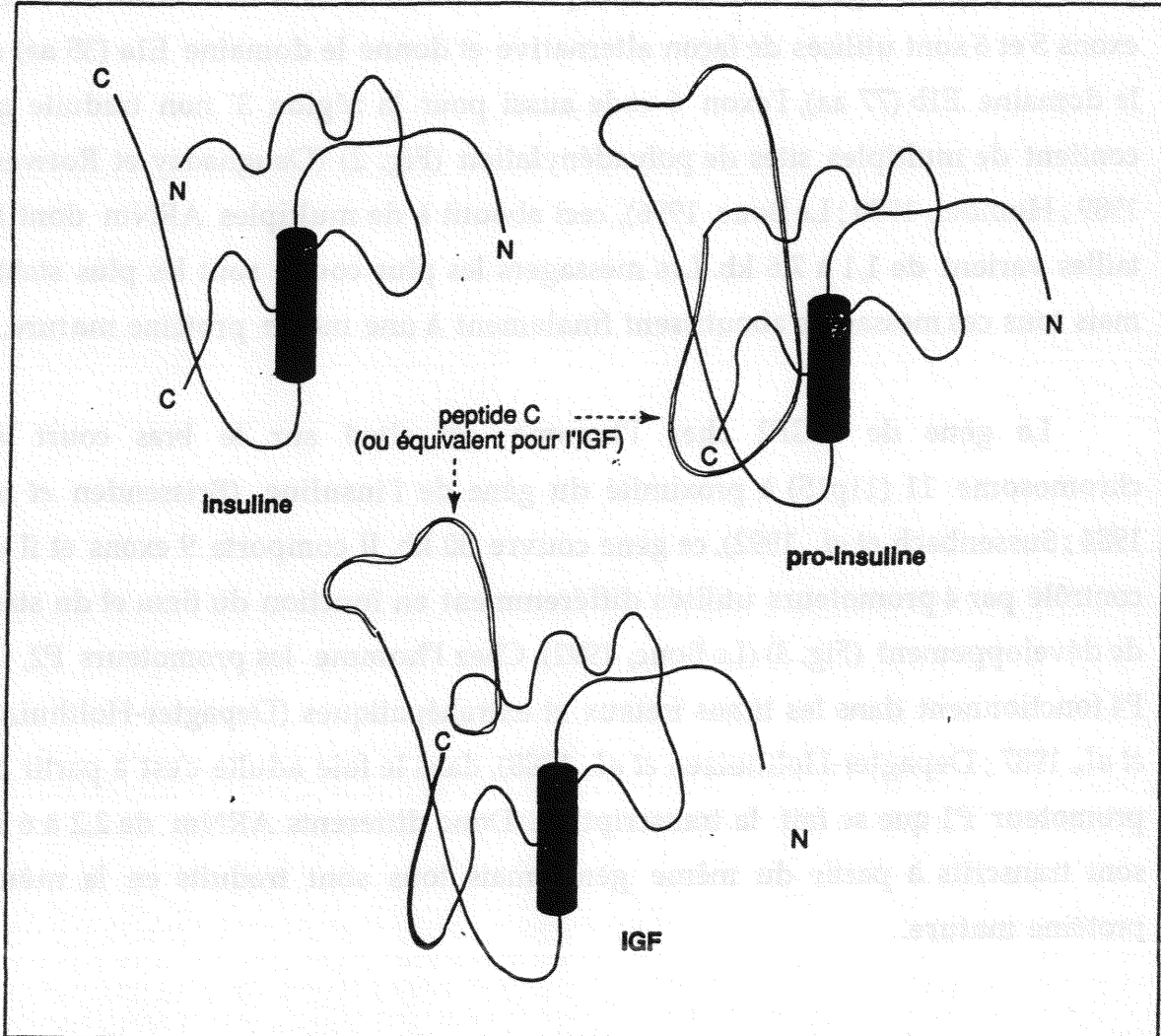


Fig. 1 : Structure comparée de l'insuline, de la proinsuline et des IGFs (Borel et al., 1997)

I-1.2.2. Structure des gènes des IGFs.

Le gène de l'IGF1 est situé sur le chromosome 12 (12q22-24-1), il couvre environ 100 kb, comporte 6 exons donnant par épissage alternatif plusieurs ARNm. Les exons 1 et 2 codent pour différentes régions 5' non traduites et une partie du peptide signal. L'exon 3 code pour la fin de B, C, A et le début de E. Les exons 5 et 6 sont utilisés de façon alternative et donne le domaine E1a (35 aa) ou le domaine E1b (77 aa), l'exon 6 code aussi pour la région 3' non traduite qui contient de multiples sites de polyadénylation (Fig. 2) (Daughaday et Rotwein, 1989 ; Humbel, 1990 ; Le Bouc, 1996), ceci aboutit à de multiples ARNm dont les tailles varient de 1,1 à 7,6 kb. Les messagers les plus courts sont les plus stables mais tous ces messagers aboutissent finalement à une même protéine mature.

Le gène de l'IGF2 chez l'homme est situé sur le bras court du chromosome 11 (11p15) à proximité du gène de l'insuline (Brissenden *et al.*, 1984 ; Sussenbach *et al.*, 1992), ce gène couvre 30 kb. Il comporte 9 exons et il est contrôlé par 4 promoteurs utilisés différemment en fonction du tissu et du stade de développement (Fig. 3) (Le Bouc, 1992). Chez l'homme les promoteurs P2, P3, P4 fonctionnent dans les tissus foetaux et extrahépatiques (Depagter-Holthuizen *et al.*, 1987 ; Depagter-Holthuizen *et al.*, 1988), dans le foie adulte c'est à partir du promoteur P1 que se fait la transcription. Donc différents ARNm de 2,2 à 6 kb sont transcrits à partir du même gène, mais tous sont traduits en la même protéine mature.

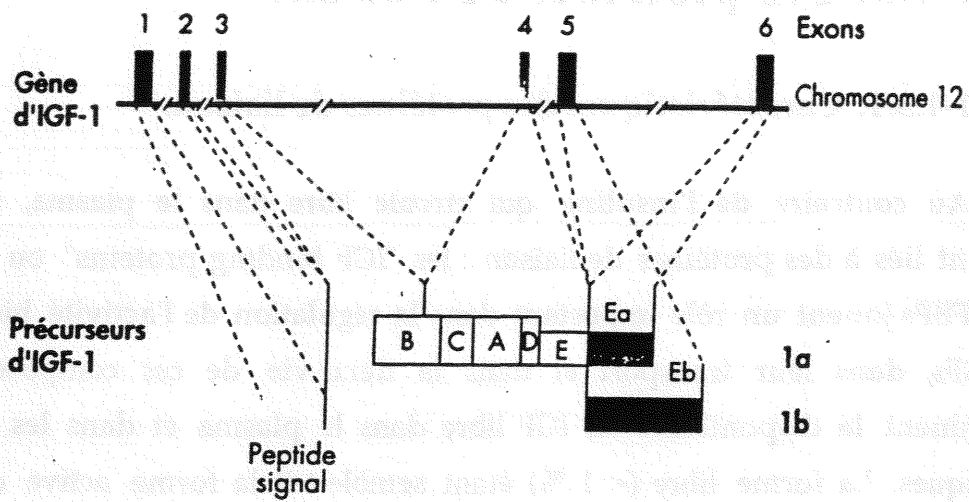


Fig. 2 : Structure du gène d' IGF1 chez l'homme et les différents précurseurs de la molécule mature d'IGF1 (Le Bouc, 1996).

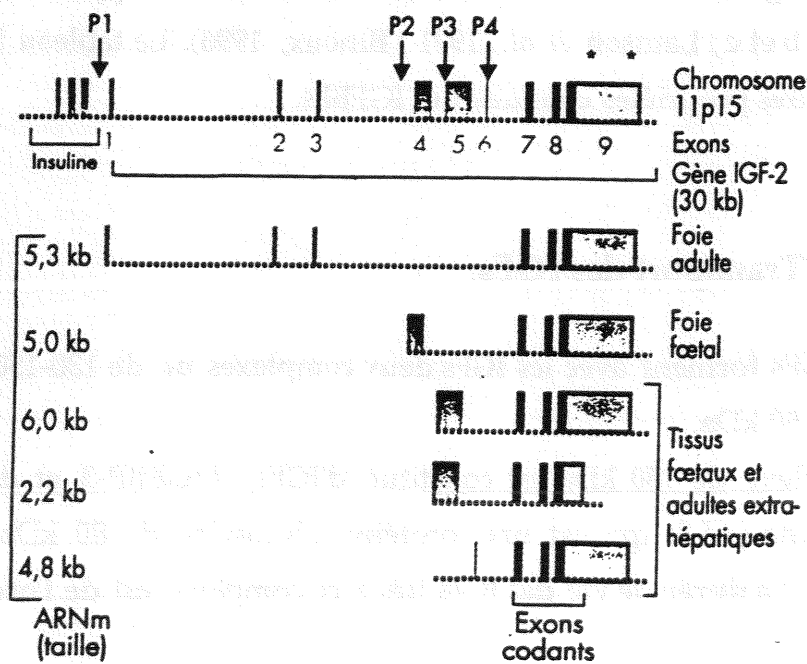


Fig. 3 : Structure du gène des IGF2 et des différents ARNm qui en sont issus (Le Bouc, 1992).

I-1.3. Les protéines de liaison.

I-1.3.1. Caractéristiques des protéines de liaison.

Au contraire de l'insuline qui circule libre dans le plasma, les IGFs circulent liés à des protéines de liaison : les "IGF binding proteins" ou IGFBPs. Ces IGFBPs jouent un rôle important dans la régulation de l'activité biologique des IGFs, dans leur transport et dans la demi-vie de ces composés. Elles déterminent la disponibilité en IGF libre dans le plasma et dans les liquides biologiques. La forme libre (< 1 %) étant semble-t-il la forme active des IGFs (Guler *et al.*, 1989 b). Le domaine de liaison des IGFBP aux IGFs n'a pas vraiment été identifié. A la fois les régions C et N-terminales semblent intervenir mais les acides aminés importants pour la liaison diffèrent d'une IGFBP à l'autre (Spencer et Chang, 1995 ; Hobba *et al.*, 1996)

Cette famille de protéines inclut au moins 6 membres dont le poids moléculaire est compris entre 25 et 40 kDa, elles présentent des homologies de structure, mais elles diffèrent par leur affinité pour les IGFs, leur lieu de synthèse, leur régulation et leurs actions (Binoux et Hossenlopp, 1988 ; Baxter et Martin, 1989 a, b et c ; Lamson *et al.*, 1991 ; Binoux, 1996). Le tableau I récapitule quelques unes des propriétés connues des IGFBPs.

I-1.3.2. Transport des IGFs.

Les IGFBPs forment avec les IGFs deux complexes un de 130-150 kDa et un second de 40 à 50 kDa.

Le complexe de 150 kDa est constitué d'IGFs, d'IGFBP-3 et d'une sous-unité labile acide (ALS) qui est une protéine glycosylée de 80 kDa (Baxter et Martin, 1989 b). La durée de vie des IGFs liés à ce complexe est de l'ordre de 12 à 15 h.

Ce complexe ne franchit pas l'endothélium, il représente la forme majeure des IGFs circulants chez l'adulte (80 %) (Kiess *et al.*, 1993) et une réserve d'IGFs. Ce complexe est régulé directement par la concentration plasma-

	IGFBP-1	IGFBP-2	IGFBP-3	IGFBP-4	IGFBP-5	IGFBP-6
Masse moléculaire	28 kDa	34 kDa	40-43 kDa	30 kDa	30 kDa	34 kDa
Acides aminés	234	289	264	237	252	216
Phosphorylation	+	-	+	-	+	
Protéolyse	-	+	+	+	+	
Glycosylation	-	+	+	+	+	+
Séquence RGD	+	+	-	-	-	-
Liaison à l'héparine	+		+	+	+	
Préférence pour IGF1/IGF2	IGF1/IGF2	IGF2	IGF1/IGF2	IGF1/IGF2	IGF2	IGF2
Déficit en GH	↗	↗	↘			↘
Localisation gène	7 p	2 q	7 p	17 q	5 q	
Demi-vie en min.	10	90	30-90			12

Tableau I : Principales propriétés des IGFBPs (Sara et Hall, 1990 ; Shimasaki et Ling, 1991 ; Chevenne et Porquet, 1995 ; Jones et Clemmons, 1995)

tique en GH et par l'état nutritionnel des sujets (Clemmons *et al.*, 1993). Le complexe de 40 à 50 kDa est formé d'IGFs et d'une des IGFBPs. La demi-vie des IGFs est alors de 20 à 30 min., en effet ce complexe franchit la barrière capillaire et transporte les IGFs jusqu'à leurs cellules cibles (Clemmons *et al.*, 1993).

I-1.3.3. Régulation des IGFBPs .

Les variations qualitatives (phosphorylation, glycosylation) ou quantitatives modulent la liaison des IGFBPs aux IGFs. Les régulations affectant la synthèse des IGFBP-1, IGFBP-2 et IGFBP-3 sont les mieux connues.

IGFBP-3 est la plus abondante des IGFBPs, elle est synthétisée de façon prédominante par les cellules endothéliales. Sa concentration sérique est équimolaire à celle d'IGF1 et IGF2, elle est un bon reflet de l'activité de l'axe somatotrope (GH et IGF1). IGFBP-3, comme les IGFs, ne présente pas de variation nyctémérale. Sa synthèse est sous la dépendance de la GH et des apports caloriques (Blum *et al.*, 1993). L'IGFBP-3 est dégradée par des protéases. Sa dégradation protéolytique est augmentée au cours de la grossesse, après chirurgie, et dans le diabète non insulino-dépendant (NIDDM) (Hossenlopp *et al.*, 1990 ; Cwyfan-Hughes *et al.*, 1992 ; Bang *et al.*, 1994). Cette protéolyse peut modifier le métabolisme et la fonctionnalité des IGFs, en particulier elle conduit à la formation de petits fragments protéiques qui diminuent la capacité des IGFs à se lier à leurs récepteurs (Suikkari et Baxter, 1991). Le schéma (Fig. 4) résume ces modifications. En réduisant la biodisponibilité des ligands pour leurs récepteurs, IGFBP3 induit l'apoptose, cela a été bien montré pour les cellules MCF7 (Nickerson *et al.*, 1997).

L'IGFBP-1 a la même affinité pour IGF1 et IGF2. Les taux circulants d'IGFBP-1 et son affinité pour IGF1 et IGF2 sont beaucoup moins importants que ceux d'IGFBP-3, ce qui fait que cette protéine de liaison n'est pas saturée par les

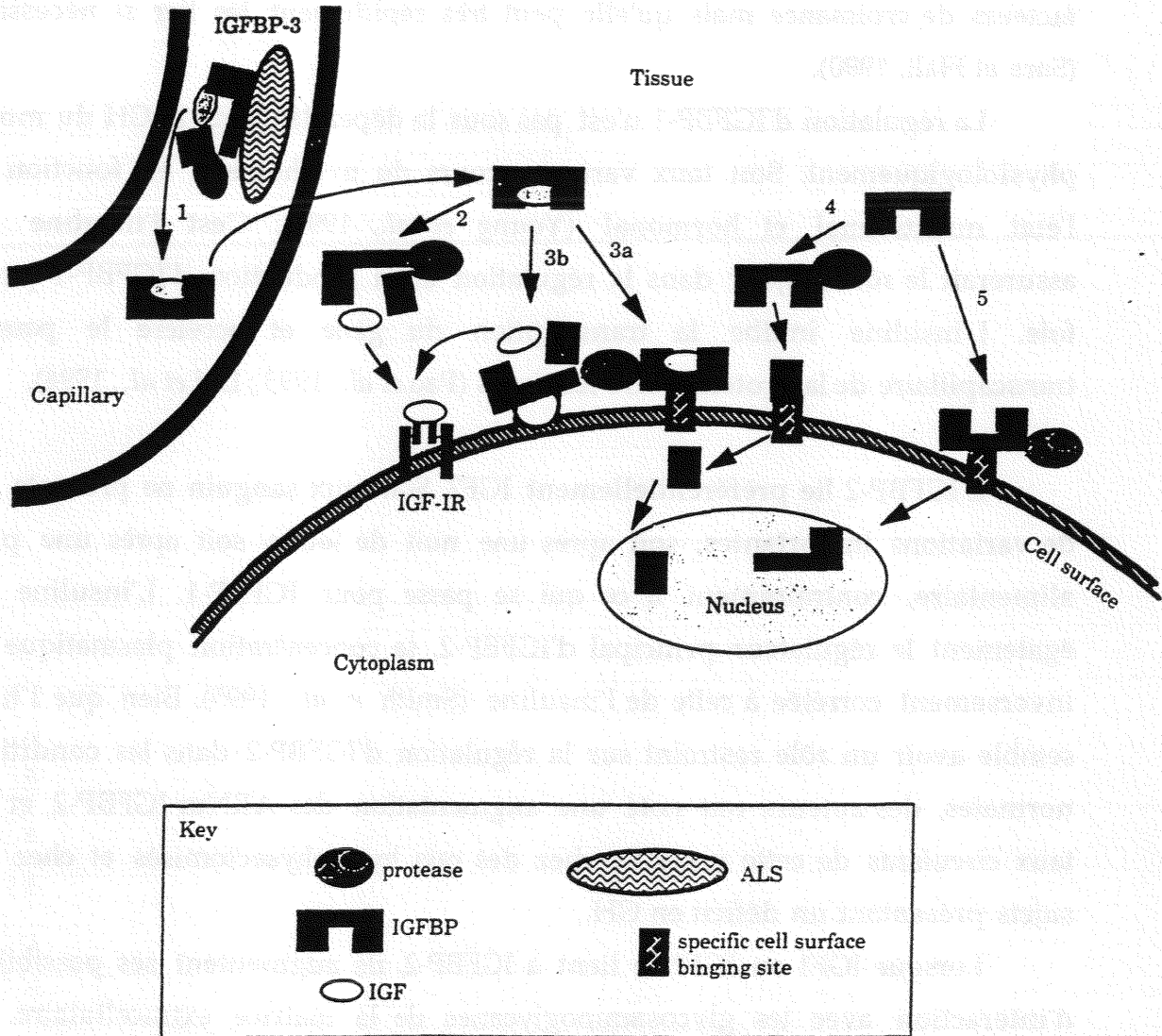


Fig. 4 : Modifications fonctionnelles potentielles des IGF-BPs par protéolyse.

Dans la circulation, la protéolyse d'IGFBP-3 diminue son affinité de liaison pour les IGFs sans désorganiser le complexe ternaire. Les IGFs peuvent alors se lier à d'autres IGFBPs formant un complexe binaire qui traverse plus aisément les capillaires et facilite l'entrée des IGFs dans les tissus (1).

La protéolyse des IGFBPs intervient aussi dans les liquides extravasculaires (2) ou à la surface cellulaire (3) ce qui rend les IGFs disponibles pour une liaison à leurs récepteurs.

Les IGFBP peuvent se localiser à la surface cellulaire en se liant à des sites spécifiques (3a) ou à des protéoglycans (3b).

La protéolyse des IGFBP dans les liquides extracellulaires (4) ou à la surface cellulaire (5) génère aussi des fragments peptidiques qui sont susceptibles d'avoir une activité propre (Maile et Holly, 1999).

facteurs de croissance mais qu'elle peut très rapidement les lier si nécessaire (Sara et Hall, 1990).

La régulation d'IGFBP-1 n'est pas sous la dépendance de la GH du moins physiologiquement. Son taux varie au cours du nyctémère, en fonction de l'état nutritionnel et hormonal (Young *et al.*, 1992). C'est l'insuline qui assurerait le rôle majeur dans la régulation de la production d'IGFBP-1 par le foie. L'insuline inhibe la transcription du gène et accélère le passage transcapillaire de la protéine vers les tissus (Pao *et al.*, 1993 ; Dai *et al.*, 1994).

L'IGFBP-2 lie préférentiellement IGF2. Son taux sanguin ne présente pas de variations importantes, soit après une nuit de jeûne soit après une prise alimentaire, contrairement à ce qui se passe pour IGFBP-1. L'insuline est également le régulateur principal d'IGFBP-2, sa concentration plasmatique est inversement corrélée à celle de l'insuline (Smith *et al.*, 1995). Bien que l'hGH semble avoir un rôle restreint sur la régulation d'IGFBP-2 dans les conditions normales, des auteurs ont noté une augmentation des ARNm-IGFBP-2 et des taux circulants de cette protéine chez des rats hypophysectomisés et chez des sujets présentant un déficit en GH.

Lorsque IGF1 ou IGF2 se lient à IGFBP-2, ils augmentent ses possibilités d'interaction avec les glycosaminoglycanes de la matrice extracellulaire. Ce mécanisme permettrait d'augmenter la concentration locale d'IGFs (Aray *et al.*, 1996).

La protéolyse des IGFBP-1 et IGFBP-2 comme celle de l'IGFBP-3 est également un mécanisme de régulation (Fig. 4). Ce sont des sérine-protéases calcium dépendantes qui interviendraient, elles seraient d'étroite spécificité (Jones et Clemmons, 1995), leurs concentrations plasmatiques varient en fonction de différents paramètres : apport de nourriture ou jeûne, âge, grossesse, etc... (Binoux, 1996).

La concentration d'IGFBP-4 augmente dans le sang en fonction de l'âge, elle est aussi augmentée chez les sujets présentant une ostéoporose IGFBP-4 *in vitro* inhibe la prolifération des ostéoblastes, il y aurait une boucle de régulation

les IGFs diminuant la concentration d'IGFBP-4. IGFBP-4 inhibe l'action mitogénique d'IGF1 sur d'autres cellules comme les fibroblastes, les cellules neuronales.

I-1.3.4. Protéines de liaison et régulation de l'activité IGFs.

Les protéines de liaison jouent un rôle important dans la régulation de l'activité biologique des IGFs, elles ont souvent un effet inhibiteur car elles modifient l'interaction des IGFs à leurs récepteurs par un mécanisme de compétition. Mais dans certains cas, elles potentialisent au contraire les effets des IGFs : l'adhérence des IGFBPs à la surface des cellules ou à la matrice extracellulaire pourraient placer les IGFs à portée de leurs récepteurs et les libérer de façon progressive ce qui éviterait la down régulation des récepteurs (Binoux, 1996 ; Le Bouc, 1996).

I-1.4. Les récepteurs des IGFs.

I-1.4.1. Le récepteur de type I (IGF-RI).

Il a une affinité pour IGF1 supérieure à celle pour IGF2 et une affinité pour l'insuline environ cent fois plus faible (Fig. 5). C'est un hétérotétramère composé de deux sous-unités α extracellulaires et de deux sous-unités β transmembranaires. Le récepteur est synthétisé sous forme d'une seule chaîne protéique de 1367 aa codée par un gène situé sur le chromosome 15 (15q25-q26). Après l'enlèvement du peptide signal, le précurseur est glycosylé et clivé pour générer les sous-unités α et β . Les différentes chaînes sont liées entre elles par des ponts disulfures pour constituer le récepteur mature (α_2, β_2) (Stewart et Rotwein, 1996 ; LeRoith, 1997). IGF-RI présente 50 % d'homologie avec le récepteur de l'insuline (Ullrich *et al.*, 1986).

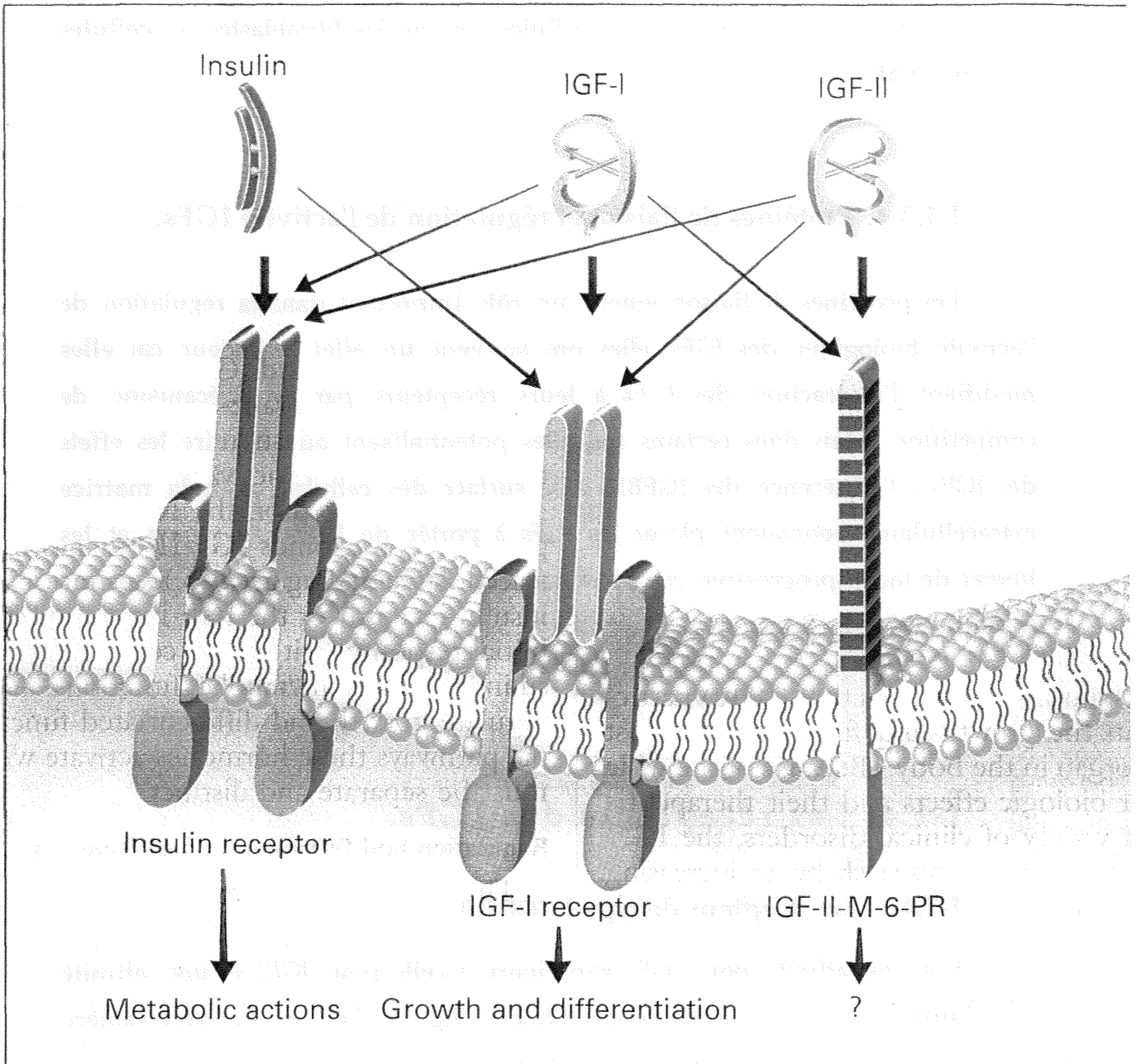


Fig. 5 : Liaison de l'IGF1, IGF2 et insuline aux différents récepteurs de cette famille de facteurs de croissance. Les récepteurs à insuline et IGF-RI sont structurellement homologues, ce sont des récepteurs à activité tyrosine kinase. L'épaisseur des flèches indique l'affinité respective du ligand pour le récepteur (LeRoith, 1997)

La sous-unité α comporte la région de liaison du ligand, la sous-unité β comporte un large domaine intracytoplasmique contenant un domaine tyrosine kinase et différents sites de phosphorylation sur des tyrosines et des sérines. La liaison du ligand à la chaîne α active le domaine tyrosine kinase, il y a autophosphorylation du récepteur ce qui est le début de la transduction du signal. Si la sous-unité α n'est pas liée à son ligand, elle se comporte comme un répresseur de l'activité tyrosine kinase (LeRoith *et al.*, 1995).

Il existe plusieurs variants de IGF-RI issus d'un épissage alternatif au niveau de l'exon 14 (chaîne β) se traduisant soit par la présence d'un résidu thr et gly ou arginine dans la portion extracellulaire de la chaîne β . L'endocytose de l'isoforme thr-gly est moindre ce qui induit une augmentation de l'autophosphorylation du récepteur (Yee *et al.*, 1989). Il existe également des différences dans la glycosylation des récepteurs selon les tissus dont la signification n'est pas très claire.

Des récepteurs hybrides IGF-RI et récepteur à insuline ont été également mis en évidence (LeRoith *et al.*, 1995) dans différents types cellulaires. Ces hybrides ont une haute affinité pour IGF1 et plus faible pour l'insuline (Soos *et al.*, 1993).

Le gène IGF-RI est régulé par le fibroblast growth factor (bFGF) qui augmente sa transcription tandis que l'IGF1 a un effet inhibiteur (Hernandez-Sanchez *et al.*, 1995).

I-1.4.2. Le récepteur de type II (IGF-RII).

C'est une chaîne protéique glycosylée de 2452 aa, c'est aussi le récepteur mannose 6P0₄ cation indépendant (Kornfeld, 1992). Le récepteur mature peut être divisé en 3 parties :

- un grand domaine extracellulaire de 2264 aa qui comprend 15 segments contigus contenant chacun 8 résidus cystéine, les motifs 1, 2, 3 et 7, 8, 9 lient des protéines possédant un mannose 6P₀, le motif 11 lie l'IGF2.

- un domaine intramembranaire de 23 aa

- un domaine intracytosolique de 164 aa (Morgan *et al.*, 1987 ; Stewart et Rotwein, 1996) (Fig. 6).

Le récepteur lie IGF2 avec une haute affinité (kd = 1 à 3 nM) mais il interagit peu avec IGF1 ou insuline.

L'IGF-RII est bien conservé au cours de l'évolution, chez l'homme son gène est situé sur le chromosome 6 (6q25-q27). Il existe aussi un récepteur soluble constitué par la partie extracellulaire de l'IGF-RII, libéré par protéolyse. Le récepteur soluble peut jouer un rôle dans le transport de l'IGF2 et dans le mécanisme d'élimination du récepteur (Clairmont et Czech, 1991). La forme soluble du récepteur est retrouvée dans le sérum et dans le liquide amniotique. La concentration de cette forme varie au cours de la gestation pour diminuer ensuite. Avant le terme une protéine de haut poids moléculaire GPC3 (appartenant à la famille des glypicanes) intervient aussi dans la liaison d'IGF2.

L'IGF-RII est impliqué dans le transport des enzymes lysosomiales, dans la clairance de l'IGF2 et dans l'activation du TGFβ (Feige, 1996). Il est impliqué dans le développement foetal ; des embryons de souris, dépourvus d'IGF-RII, ont un taux sérique élevé d'IGF2 et ont une croissance accélérée pendant la période foetale (Lau *et al.*, 1994). Actuellement on ne connaît pas les voies de transduction liées à ce récepteur. L'IGF-RII est caractérisé par des fonctions proches de celle du récepteur de l'acide rétinoïque. Dans une étude récente, Kang *et al.* (1997) ont démontré la liaison de l'acide rétinoïque à l'IGF-RII : liaison de forte affinité se faisant en un site différent de ceux liant le mannose 6 P et l'IGF2, et provoquant une suppression de la prolifération cellulaire et/ou l'induction de l'apoptose.

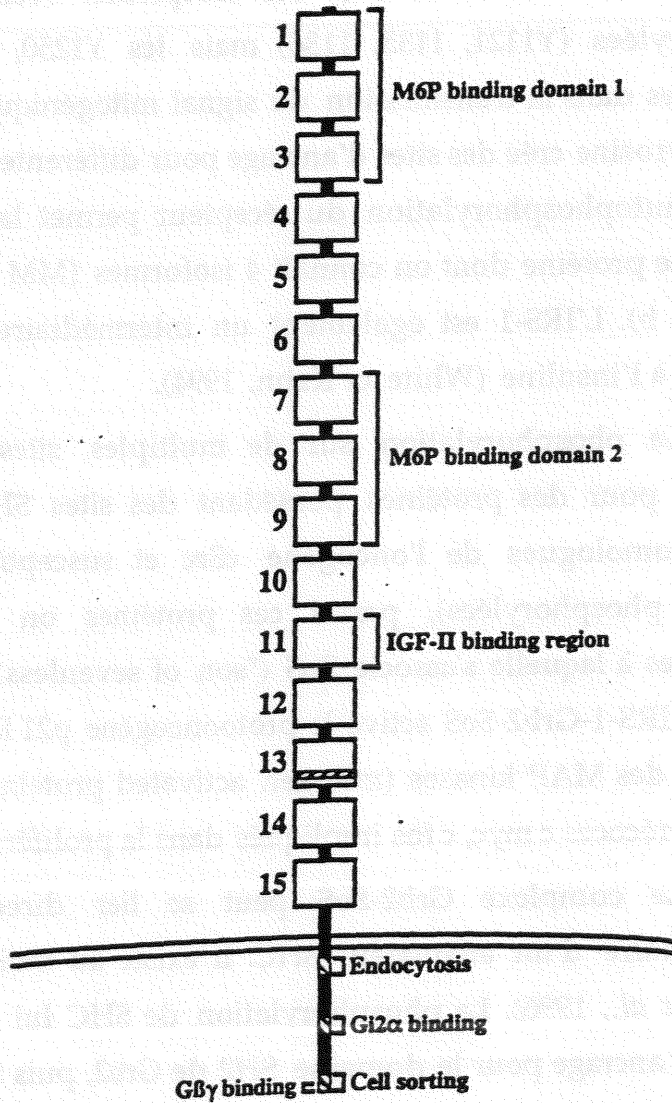


Fig. 6 : Récepteur à IGF2 (IGF-RII). Il est constitué d'une longue partie extracellulaire comportant 15 motifs répétés. Le motif 13 comprend en outre un élément fibronectine type II. Deux domaines de liaison du mannose 6P₀ et un domaine de liaison de l'IGF2 sont situés dans cette partie extracellulaire. Dans la partie intracellulaire on trouve un segment nécessaire à l'endocytose et un fragment qui peut-être se lie aux protéines G (Stewart et Rotwein, 1996).

I-1.5 La transduction du signal.

La liaison des ligands IGF1 ou IGF2 au récepteur IGF-R1 active le domaine tyrosine kinase des chaînes β des récepteurs. Trois tyrosines sont d'abord phosphorylées (Y1121, 1135, 1136) mais les Y1250, 1251 et 1316 sont aussi impliquées dans la transmission du signal mitogénique. La phosphorylation de résidus tyrosine crée des sites d'ancrage pour différentes protéines.

L'autophosphorylation du récepteur permet la liaison avec IRS-1. C'est une grosse protéine dont on connaît 4 isoformes (MM 60-160 kDa) (Lavan *et al.*, 1997 a et b). L'IRS-1 est également un intermédiaire lors de l'activation du récepteur à l'insuline (White et Kahn, 1994).

- La phosphorylation sur de multiples sites d'IRS-1 crée des sites d'ancrage pour des protéines possédant des sites SH2 (séquences d'environ 100 aa, homologues de l'oncogène cSrc et susceptibles de reconnaître des tyrosines phosphorylées), parmi ces protéines on trouve Grb2 (protéines adaptatrices à laquelle s'associe SoS ("son of sevenless") (Myers *et al.*, 1994). Le complexe IRS-1-Grb2-SoS active le protooncogène p21 RAS qui à son tour active la cascade des MAP kinases (mitogen activated protein) qui induit l'expression de gènes précoces c myc, c fos impliqués dans la prolifération cellulaire.

- Le complexe Grb2-SoS peut se lier directement à IGF-R1 par l'intermédiaire d'un adaptateur SHC. Il existe au moins 3 isoformes de SHC (Bonfini *et al.*, 1996). La phosphorylation de SHC lui permet de devenir une protéine d'ancrage pour le domaine SH2 de Grb2, puis SoS se lie à un domaine SH3 de Grb2. Ce complexe favorise l'échange GDP-GTP sur la protéine RAS ce qui active ensuite la voie Raf-1 et MAPK (Sasaoka *et al.*, 1996) et la prolifération cellulaire. La voie RAS est empruntée par d'autres facteurs de croissance comme PDGF, EGF (Coppola *et al.*, 1994).

- IRS-1 peut servir d'ancrage à la sous-unité p85 de la phosphatidyl inositol 3 kinase (PI3 kinase). De nombreux processus métaboliques sont semblent-ils réguler par cette voie tels que l'apoptose, le transport du glucose et son métabolisme, la synthèse des protéines, la mitose et la différenciation. Un

effecteur de l'activation de la PI3 kinase est une sérine / thréonine kinase (Akt). Cette voie est un médiateur important de l'effet apoptotique d'IGF1 (Kulik *et al.*, 1997).

PI3 kinase peut activer la voie Rac et Rho. Cette voie joue un rôle sur la mobilité des cellules et dans la mitogénèse (LeRoith *et al.*, 1998). PI3K peut également avoir indirectement comme effecteur des isoformes de la PKC. Ces dernières sont phosphorylées sur un premier site de phosphorylation par une « phosphoinositide dépendent kinase » (PDK) (Chou *et al.*, 1998 ; Dutil *et al.*, 1998 ; Le Good *et al.*, 1998).

- La liaison de IGF à son récepteur peut activer directement des protéines de la famille crk. Cette famille de protéines contient des domaines SH2 et SH3. Une fois phosphorylées, elles s'associent à SoS ou C3G qui sont des protéines permettant l'échange des nucléotides GDP-GTP. Elles activent ensuite la voie des MAP Kinases (LeRoith *et al.*, 1997). Elles sont aussi impliquées dans la signalisation des intégrines et les interactions avec la matrice extracellulaire (Matsuda *et al.*, 1994 ; Teng, 1995). Le schéma de la figure 7 pris dans Petley *et al.* (1999) résume ces différentes voies.

I-1.6 Rôles physiologiques.

Les IGFs interviennent dans le fonctionnement de pratiquement tous les organes, en effet de nombreux organes en synthétisent ainsi que les récepteurs correspondants. Le taux des IGFs circulants varient en fonction de l'âge (Fig. 8) relativement bas à la naissance, celui d'IGF1 augmente au cours de l'enfance pour présenter un pic à la puberté puis il diminue lentement avec l'âge (Juul *et al.*, 1994).

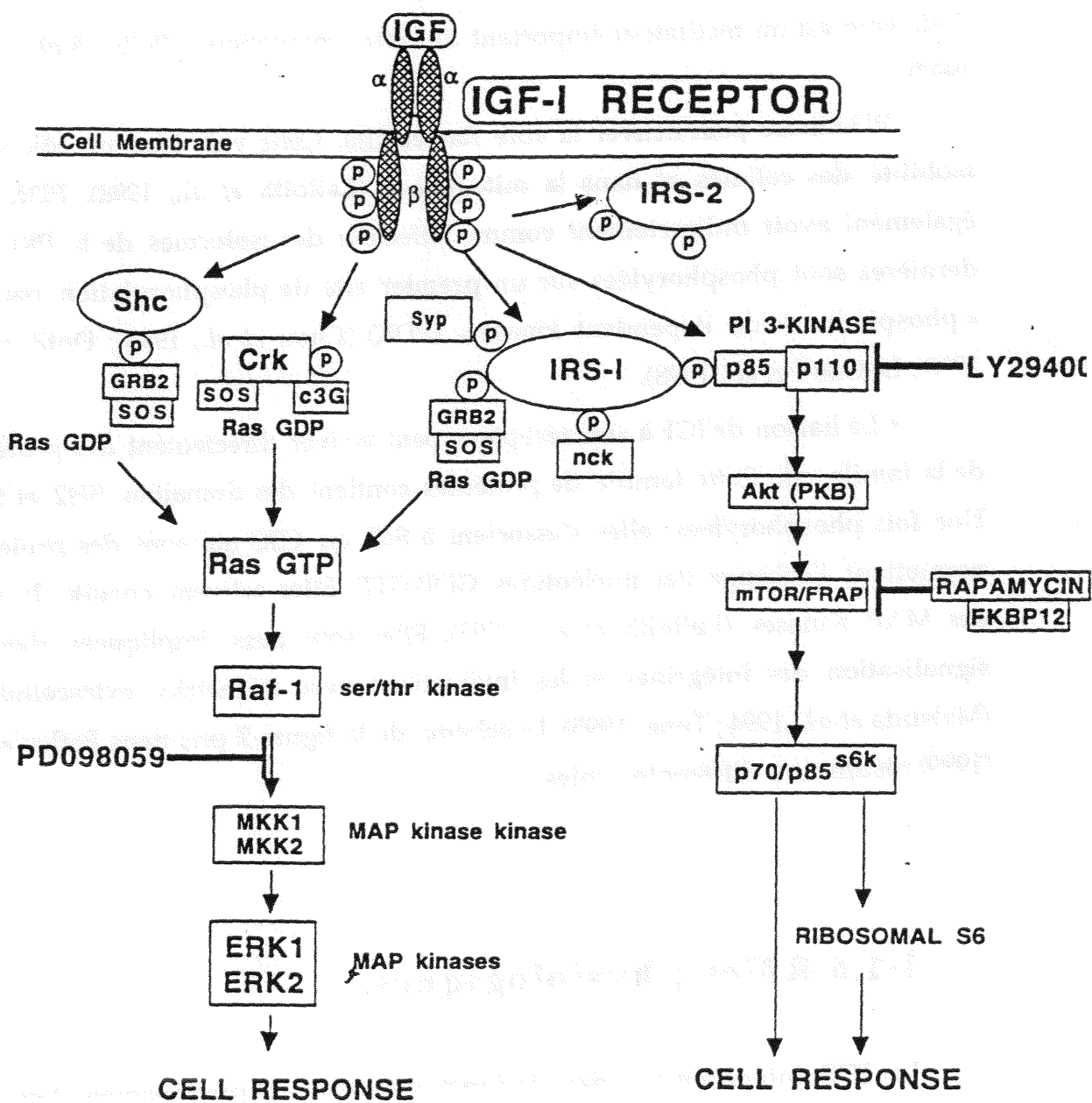


Fig. 7 : Principales voies de transduction du signal IGFs se liant aux récepteurs IGF-RI (Petley et al., 1999)

I-1.6.1. IGFs et croissance.

Les IGFs jouent un rôle important dans la croissance tant intra-utérine que postnatale. Les IGFs sont produits par de nombreux tissus et agissent sur un mode endocrine mais aussi paracrine et autocrine, ces deux derniers mécanismes interviennent dans la vie intra-utérine avant le développement de la circulation. En effet IGF2 et son récepteur sont détectables dès le stade de 2 cellules. IGF1 et son récepteur apparaissent dès le stade de 8 cellules (Baker *et al.*, 1993).

Pendant la période de préimplantation IGF2 paraît être le plus important facteur de croissance stimulant la synthèse protéique (Stewart et Rotwein, 1996), la prolifération et donc la croissance. Plus tard IGF1 prend le relais (LeRoith, 1995). IGF1 et son récepteur sont particulièrement importants pour le développement cérébral (Beck *et al.*, 1995 ; Guevara-Aguirre, 1996), il stimule le développement des neurones chez le fœtus mais IGF2 intervient également dans l'embryogénèse du cerveau (paragraphe I-1.7.). Les enfants présentant une mutation des récepteurs de l'hGH et donc une diminution de la synthèse d'IGF1 ont un poids à la naissance presque normal mais présentent des anomalies morphologiques (Rosenfield *et al.*, 1994).

De nombreux travaux ont permis de mettre en évidence le rôle d'IGF1 dans la croissance postnatale (Jones et Clemmons, 1995). Bien que la synthèse de IGF1 soit sous la dépendance de la GH et que IGF1 exerce un rétrocontrôle négatif sur la sécrétion de GH, l'action de ces deux composés ne se superpose pas totalement. Ils ont une action semblable sur la croissance des os longs, mais IGF1 stimule plus fortement la croissance des reins, de la rate, du thymus. Par contre, GH stimule aussi la synthèse d'IGFBP-3 et de la protéine labile acide permettant la formation du complexe circulant stable, donc elle exerce une action plus soutenue.

Le rôle des IGFs sur les cellules osseuses serait modulé par PGE2 qui stimule la synthèse d'IGF1 par l'intermédiaire de l'activation d'une protéine kinase A (PKA) ; dans les ostéoblastes l'activation de la PKC stimule la replication et la synthèse protéique des cellules périostées. De plus l'activation de la PKA augmente la liaison [¹²⁵I] IGF2 aux récepteurs de type II tandis que l'activation de la PKC augmente la fixation de [¹²⁵I] IGF1 aux récepteurs de type I (McCarthy *et al.*, 1998). L'interleukine 6 serait un inhibiteur de la production d'IGF1. Ceci pourrait expliquer les modifications de la croissance observée chez les enfants présentant une arthrite rhumatoïde, maladie inflammatoire dans laquelle la sécrétion IL6 est augmentée, dans cette pathologie il y a une corrélation négative entre IL6 et IGF1 circulants.

L'action de IGF1 sur la croissance a également été démontrée par l'utilisation d'animaux transgéniques qui avaient une taille supérieure à la normale (D'Ercole, 1993). Par contre les animaux surexprimant le gène d'IGF2 n'ont pas une croissance augmentée (Wolf *et al.*, 1994).

Le rôle d'IGF1 dans la croissance explique que l'on trouve un pic au moment de la puberté (Fig. 8).

I-1.6.2. IGFs et métabolisme général.

Les IGFs ont de nombreuses actions métaboliques, le tableau II en donne un résumé. L'action des IGFs sur le métabolisme glucidique et lipidique a été étudiée sur des cellules musculaires et des adipocytes. Dans les cellules musculaires, on a observé sous l'action des IGFs une augmentation du transport du glucose et des acides aminés, une augmentation de la synthèse du glycogène et de l'anabolisme protéique (Zapf *et al.*, 1984). Plus récemment après administration d'IGF chez l'homme, il a bien été confirmé que l'IGF1 stimule la synthèse protéique, il est hypoglycémiant, diminue la sécrétion d'insuline tout en augmentant la sensibilité tissulaire à cette dernière (Hussain *et al.*, 1994 ; Clemmons *et al.*, 1992). L'injection à des adultes sains de doses croissantes d'IGF1 provoque outre l'action sur le métabolisme du glucose, une diminution des acides gras et du β hydroxybutyrate de façon dose-dépendante (Turkalj *et al.*, 1992).

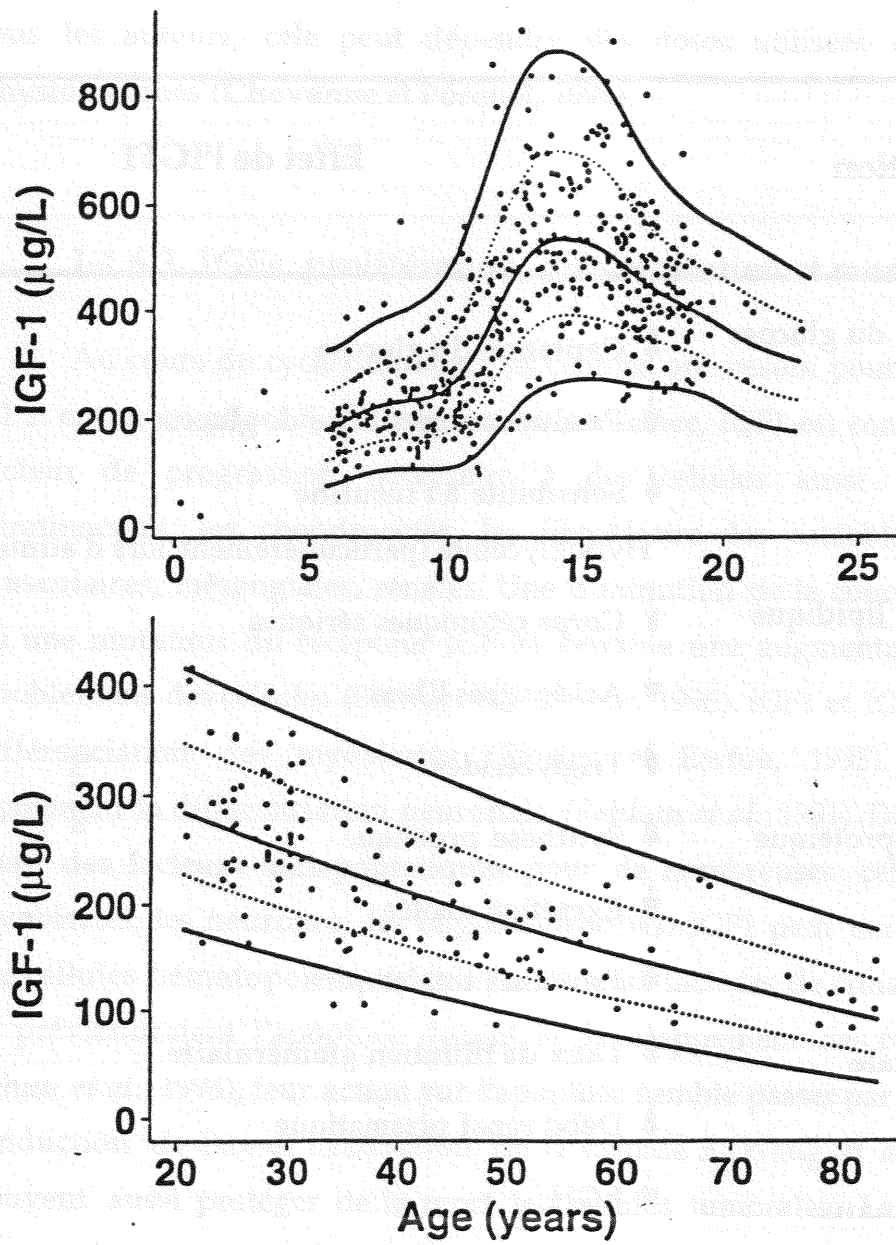


Fig. 8 : Concentrations en IGF1 circulant en fonction de l'âge (Juul, 1994).

Fonction	Effet de l'IGF1
Métabolisme du glucose	<ul style="list-style-type: none"> ▲ Captation du glucose ▼ Production hépatique de glucose ▲ Sensibilité à l'insuline Hypoglycémie (particulièrement lors d'administration)
Métabolisme lipidique	<ul style="list-style-type: none"> ▼ Corps cétoniques sériques ▼ Acides gras libres ▼ Triglycérides
Anabolisme protéique	<ul style="list-style-type: none"> ▲ Synthèse protéique ▼ Excrétion azotée ▲ Protéines totales
Fonction rénale	<ul style="list-style-type: none"> ▲ Taux de filtration glomérulaire ▲ Débit rénal plasmatique
Effets hormonaux	<ul style="list-style-type: none"> ▼ hGH ▼ Glucagon ▲ Catécholamines
Croissance linéaire	<ul style="list-style-type: none"> ▲ Chez les sujets ayant un déficit hypophysaire une insensibilité à l'hGH

Tableau II : Principales actions de l'IGF (Jones et Clemmons, 1995).

L'effet antilipolytique ou sur l'anabolisme des protéines n'est pas retrouvé par tous les auteurs, cela peut dépendre des doses utilisées et des conditions physiologiques (Chevenne et Porquet, 1995).

I-1.6.3. IGFs, prolifération, différenciation et mort cellulaire.

Au cours du cycle cellulaire, les cellules ont besoin pour franchir la phase G1 et entrer en phase S, de facteurs de croissance, IGF1 est considéré comme un facteur de progression nécessaire à des cellules aussi diverses que les kératinocytes, les chondrocytes, les fibroblastes, les ostéoblastes, les cellules musculaires, mésangiales, rénales. Une diminution de la concentration en IGF1 ou une mutation du récepteur IGF-RI entraîne une augmentation du temps de doublement des cellules (Stewart et Rotwein, 1996). IGF1 et IGF2 augmentent la différenciation des myoblastes (Florini et Ewton, 1995). IGF1 augmente également la différenciation neuronale (Pahlam *et al.*, 1991). De plus les IGF sont aussi des facteurs antiapoptotiques pour de nombreuses cellules comme les myoblastes, les neurones, les oligodendrocytes. IGF1 peut maintenir en survie des cellules hématopoïétiques privées de leurs facteurs de croissance spécifiques, ils préviendraient l'apoptose durant le développement des follicules ovariens (Chun *et al.*, 1994), leur action sur l'apoptose semble passer par la diminution de l'induction de Bax et l'activation de la caspase 3 (Wang *et al.*, 1998). Les IGF peuvent aussi protéger de la mort les cellules tumorales. Le rôle des IGFs au niveau du cerveau et dans la cancérogénèse seront développés dans le chapitre suivant.

I-1.7. Essais thérapeutiques.

Dans une revue, Rosenfield *et al.* (1995) rapportent différents essais d'administration d'IGF1 tant chez les volontaires sains que chez des sujets

déficients en récepteurs de GH (nanisme de Laron) ou présentant une insensibilité à la GH.

I-1.7.1. Volontaires sains.

La première expérience a été une injection intraveineuse de 100 µg/kg d'IGF1 à 8 volontaires mâles. Une hypoglycémie a été notée 15 min. après l'injection avec un retour à la normale à 120 min. L'hypoglycémie semble attribuable à l'augmentation de l'IGF1 libre (Guler *et al.*, 1987).

Une autre expérience a consisté à perfuser 20 µg/kg/h d'IGF1 pendant 6 jours à 2 sujets mâles adultes. La concentration sérique d'IGF1 s'élève de 150 à 700 ng/ml sans qu'apparaisse d'hypoglycémie. L'IGF1 injecté est bien actif puisque l'hGH n'est plus détectée dans le plasma, la clairance à la créatinine est diminuée de 30 %. L'urée plasmatique diminue sans augmentation de l'urée urinaire ce qui signifie qu'il y a une augmentation de la synthèse protéique (Guler *et al.*, 1987). 6 autres sujets ont reçu 100 µg/kg d'IGF1 en injection sous-cutanée et cela pendant 7 jours consécutifs. IGF1 s'élève de 250 % après la 1^{ère} injection et il y a une diminution du glucose sanguin 4 h post-injection sans qu'il y ait une hypoglycémie vraie (Takano *et al.*, 1991).

I-1.7.2. Traitement par IGF1 des sujets déficients en récepteur d'hGH.

Laron *et al.* (1988) ont injecté en I.V. 75 µg/kg d'IGF1 à 9 sujets à jeun ayant un nanisme de Laron. Le glucose plasmatique chute de 45 % dans les 30 min. suivant l'injection. Une élévation paradoxale de GH est observée, elle est peut-être le reflet de la stimulation par l'hypoglycémie mais la GH chez ces sujets ne peut réguler l'hypoglycémie. Les sujets manquant de récepteurs à la GH ont aussi une diminution de IGFBP-3 et l'injection intraveineuse d'IGF1

augmente la concentration de la forme libre de ce dernier expliquant l'hypoglycémie.

Lorsque les injections se font en sous-cutané (150 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{j}$) pendant 7 jours, on n'observe pas d'hypoglycémie (Laron *et al.*, 1991). D'autres auteurs ont préconisé des injections plus rapprochées (40 $\mu\text{g}/\text{kg}/12\text{ h}$) en sous-cutané chez des adultes présentant un syndrome de Laron. Ceci afin de diminuer la quantité d'IGF1 libre, dans ces conditions il n'y a pas d'hypoglycémie et l'IGF1 exerce un rétrocontrôle négatif sur la sécrétion de GH.

Des essais de traitement à plus long terme ont également été entrepris. Ainsi Laron *et al.* (1992) ont traité 5 enfants atteints de nanisme de Laron pendant 3 à 10 mois, à raison d'une injection quotidienne de 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$. La vitesse de croissance passe de 8,8 à 13,6 cm/an. Walker *et al.* (1992) traitent des enfants pendant 9 mois à raison de 120 $\mu\text{g}/\text{kg}/2$ fois par jour, ils constatent également une augmentation de la vitesse de croissance de 6,5 à 11,4 cm/an, avec un bilan azoté positif et sans modification de la glycémie. Wilton *et al* (1992) ont traité 30 sujets âgés de 3 à 23 ans par des injections sous-cutanées 2 fois par jour. Certains sujets répondent déjà à des doses de 40 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{inj}$. alors que pour d'autres, il faut augmenter la dose jusqu'à 120 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{inj}$. Les sujets les plus âgés répondent cependant assez mal alors que la vitesse de croissance est accélérée chez les plus jeunes. Au cours de cette étude, des effets secondaires sont observés : 17 sujets sur 30 ont fait des hypoglycémies, deux s'accompagnant de convulsions, 1 cas de maux de tête sévères avec vomissements, 1 enfant présente une hypotension.

En conclusion, ces travaux ont montré que l'IGF1 pouvait accélérer la croissance dans le nanisme de Laron. Les doses optimales à utiliser sont encore à déterminer car IGF1 apporté par injection ne semble pas augmenter la synthèse de IGFBP-3. Les traitements à long terme s'accompagnent d'effets secondaires qui généralement n'ont pas fait interrompre le traitement. Compte-tenu de l'action de IGF1 sur la glycémie, ce facteur de croissance a été préconisé dans le traitement du diabète.

I-1.7.3. IGF1, résistance à l'insuline et diabète.

Des patients présentant une résistance à l'insuline, par mutation des gènes du récepteur à l'insuline ou des gènes impliqués dans la transduction du signal, présentent des syndromes divers mais ils ont tous une hyperglycémie difficile à contrôler car par définition, l'insuline est inactive dans ces cas. L'IGF1 a été proposé pour traiter ces patients puisqu'il a un effet hypoglycémiant et un récepteur différent de celui de l'insuline (Taylor, 1992 ; LeRoith, 1997). Plusieurs études ont montré que dans ces cas sévères de résistance à l'insuline, l'injection intraveineuse d'IGF1 diminue la concentration d'insuline circulante, améliore la tolérance au glucose, diminue la concentration des triglycérides à jeun. (Quin *et al.*, 1990 ; Schoenle *et al.*, 1991).

Les adolescents ayant un diabète insulino-dépendant contrôlé, ont souvent un taux élevé de GH circulante ce qui entraîne une diminution de la concentration d'IGF1 circulant et une résistance plus ou moins grande à l'insuline. La perfusion la nuit ou une injection sc d'IGF1 (40 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{j}$) réduit le taux de GH, atténue les fluctuations du glucose et diminue les besoins en insuline (Hall *et al.*, 1989 ; Kuzuya *et al.*, 1993 ; Dunger *et al.*, 1995).

Plusieurs études rapportent les résultats de l'injection d'IGF1 dans le diabète non insulino-dépendant. On constate que l'injection d'IGF1 réduit le taux de glucose à jeun ainsi que celui des triglycérides, il diminue la concentration sérique d'insuline (Zenobi *et al.*, 1992a), il inhibe la sécrétion de glucagon, un stimulant puissant de la néoglucogénèse hépatique (Zenobi *et al.*, 1992b). Cependant, dans ces études, l'administration d'IGF1 aux doses utilisées (généralement 120 $\mu\text{g}/\text{kg}$, une ou deux fois par jour) s'accompagnent d'effets secondaires : hypophosphatémie, hypotension, augmentation de la pression intracrânienne (Malozowski et Stadel, 1994).

I-1.7.4. IGF1 et maladies dégénératives.

I-1.7.4.1. Chez les personnes âgées.

Le vieillissement s'accompagne d'une diminution de GH et d'IGF1 et il a été suggéré que les changements dégénératifs observés tels que fonte musculaire, ostéopénie pourraient être en relation avec un déficit en GH et IGF1. Les androgènes ne semblent pas influencer la sécrétion de GH et d'IGF1 tandis qu'à la ménopause, on note une diminution de ces deux paramètres (Romagnoli *et al.*, 1993) et d'IGFBP-3, tous ces composés réaugmentent par traitement par GH (Hoffman *et al.*, 1995). Des essais de supplémentation ont été faits soit avec hGH soit avec IGF1 soit avec les deux. Les effets anaboliques des deux composés sont augmentés de façon spécifique. Cependant les personnes âgées sont plus sensibles aux effets secondaires d'IGF1 (maux de tête, fatigue, arthralgie, ...).

I-1.7.4.2. Dans les maladies neurodégénératives.

Dans le cerveau, comme cela a été dit précédemment, on trouve une forme tronquée d'IGF1 ayant perdu trois acides aminés du côté NH₂. Dans le système nerveux central et périphérique, IGF1 est un facteur pléiotropique régulant la croissance et la survie de populations cellulaires neuronales et gliales. Le tableau III résume les activités de ce facteur de croissance au niveau du système nerveux. Compte-tenu de ses actions, l'idée de l'utiliser dans des maladies neurodégénératives a fait son chemin (Doré *et al.*, 1997) et de nombreuses expérimentations ont été réalisées sur cultures cellulaires ou chez l'animal. Mais pour l'instant les essais thérapeutiques chez l'homme sont relativement rares. Ainsi IGF1 a été testé dans la sclérose latérale amyotrophique (SLA) caractérisée par une perte progressive des neurones moteurs accompagnée d'une atrophie musculaire. L'effet bénéfique d'IGF1 a été montré chez la souris wobbler, modèle animal de dégénérescence des motoneurones (Hantain *et al.*, 1995). Des études ont été faites chez l'homme, la première a porté sur 449 sujets

atteints de SLA auxquels ont été injectés en sous-cutané 100 µg/kg/j d'IGF1. Une amélioration des symptômes a été rapportée (Murphy *et al.*, 1995) mais d'autres études n'ont pas été aussi concluantes (Yuen et Mobley, 1996). La sclérose en plaques caractérisée par une démyélinisation pourrait aussi bénéficier d'un traitement par IGF1 (Mc Morris et Kinnon, 1996), cependant à notre connaissance, aucune étude n'a été faite sur l'homme dans cette pathologie. La maladie d'Alzheimer pourrait être une autre indication du traitement par IGF1 (Crew *et al.*, 1992) mais il n'y a pas eu d'essai clinique effectué.

I-1.7.5. IGF1 dans l'ostéoporose.

Compte-tenu du rôle de l'IGF1 dans la croissance et sur le développement de l'os (Reginster et Zheng, 1996), des essais précliniques et cliniques de phase I ont été réalisés pour tester son utilisation dans le traitement de l'ostéoporose. En réalité ce sont essentiellement des mélanges IGF1-IGFBP-3 qui ont été utilisés (somatokine) ce qui permet, sans effet secondaire (hypoglycémie), d'injecter des doses d'IGF1 efficaces. Ainsi des doses correspondant à 7,5 mg/kg d'IGF1 ont été injectées chez des rates ovariectomisées ce qui a entraîné une diminution de la résorption osseuse et la stimulation de la formation osseuse (Nurasawa *et al.*, 1995).

Une étude de phase 1 a été entreprise chez des femmes de 55-70 ans qui ont reçu en sous-cutané pendant 7 jours rhIGF1/IGFBP-3 aux doses de 0 ; 0,5 ; 1 ; 2 mg/kg/j. Cette étude a permis de montrer que les meilleurs résultats sont obtenus pour la dose de 1 mg /kg/j. Les marqueurs du métabolisme osseux et du métabolisme du collagène sont augmentés quelques jours après le début de l'administration (Adam *et al.*, 1997 ; Adam *et al.*, 1998).

Dans le système nerveux central

- stimule la division, la différenciation, la maturation, assure la survie et peut réduire l'apoptose des *cellules neuronales* (bulbe olfactif, septum, cortex, hypothalamus, hippocampe, mésencéphale, tronc, cervelet), des *cellules gliales* (Schwann, oligodendrocytes, astrocytes)
- protège les neurones contre différents types de toxicité : fer, colchicine, déstabilisateur du Ca², β-amyloïde, amyline humaine, cytokines, H₂O₂, lésions mécaniques et chimiques
- module la libération de neurotransmetteurs : acétylcholine, dopamine, sérotonine, glutamate, neuropeptide Y, etc.
- entraîne la production des neurofilaments, de la tubuline et de la myéline agit sur le métabolisme du glucose

Dans la moelle épinière

- module l'activité de la choline acétyltransférase
- facilite le bourgeonnement des motoneurones
- induit la myélinisation et bloque la démyélinisation
- stimule la prolifération des cellules interstitielles
- réduit l'apoptose des motoneurones lors du développement normal, d'axotomie et de lésion de la moelle épinière
- protège les motoneurones faciaux contre des lésions
- démontre des propriétés chimiotactiques
- favorise la survie des cellules de Schwann
- augmente le taux de dégénérescence des neurones sensoriels et moteurs
- accélère le rétablissement après un écrasement ou une lésion du nerf sciatique
- protège des neuropathies périphériques provoquées par divers agents anticancéreux

Dans le muscle

- stimule l'agrégation des récepteurs nicotiniques
- augmente les fonctions neuromusculaires et la force du muscle
- réduit le tremblement chez la souris *wobbler*

Tableau III : Effets de l'IGF1 dans le système nerveux central et périphérique (Doré et al., 1997).

I-1.7.6. IGFI et insuffisance rénale.

Dans l'insuffisance rénale chronique (IRC), on observe souvent un retard de croissance et des anomalies complexes de la sécrétion et du métabolisme de la GH, de l'IGF1 et des IGFBPs (Schaefer, 1996). Généralement il n'existe pas de déficit en GH circulante (Santos *et al.*, 1991) et il n'y a pas de perte ou modifications du rétrocontrôle de la sécrétion de GH par IGF1 bien que les taux sériques d'IGF1 soient élevés d'où l'hypothèse d'une résistance à l'IGF1 qui serait peut-être en relation avec une réduction de l'activité tyrosine kinase du récepteur (Kopple *et al.*, 1995) ou en relation avec une protéolyse accrue des IGFBPs ce qui entraînerait la formation de peptides inhibiteurs de l'activité des IGFs comme nous l'avons précédemment évoqué. Dans l'IRC on note une diminution des rapports des concentration IGFs/IGFBPs (Hussenet *et al.*, 1996). A partir de ces constatations, des traitements par GH ou par IGF1 ont été préconisés chez des enfants ayant une IRC, l'injection d'hGH (1UI/kg/semaine) entraîne un bénéfice net en terme de gain statural et une augmentation de la concentration sérique d'IGF1, d'IGF2, d'IGFBP-3 sans modification de l'IGFBP-1. Cependant il n'existe aucune relation entre la vélocité de la croissance et les paramètres biologiques. L'administration d'IGF1 dans cette pathologie fait l'objet d'essais préliminaires (LeRoith, 1997).

I-1.7.7. Effets secondaires des IGF1.

Nous avons déjà cité quelques effets secondaires en particulier l'hypoglycémie et l'hypotension. On peut ajouter d'autres effets généraux comme l'apparition d'oedème, de dyspnée, de tachycardie, de douleurs musculaires et articulaires.

Se pose également la relation IGF-R, IGF et cancer et plusieurs faisceaux d'arguments sont en faveur d'une telle relation. IGF1 et IGF2 jouent un rôle

important dans la croissance et le développement de cellules gliales. Les cellules gliales en culture synthétisent les IGFs et leur récepteur et il a été montré que les cellules C6 provenant d'un glioblastome produisent de l'IGF1 et sont tumorigènes lorsqu'elles sont injectées à des rats. Par contre les cellules exprimant une ADNc IGF1 antisens non seulement ne forment pas de tumeurs mais de plus entraînent une régression de la tumeur préexistante (Trojan *et al.*, 1992).

Une publication récente (Chan *et al.*, 1998) fait état d'une étude prospective à long terme qui fait apparaître que les cancers de la prostate sont 4 fois plus fréquents chez les hommes ayant un taux d'IGF1 circulant dans la zone haute de la normalité (290-500 ng/ml). On sait que l'IGF1 stimule fortement la croissance des cellules normales et cancéreuses de la prostate (Barinaga, 1998) et il serait un meilleur marqueur du cancer de la prostate que le PSA (Prostate Specific Antigen) couramment utilisé actuellement (Brower, 1998). Ces travaux qui demandent confirmation ont cependant entraîné l'arrêt de certains essais cliniques effectués par les firmes qui ont investi dans la fabrication de l'IGF1 recombinant (Genetech et Chiron/Cephalon).

La surexpression de IGF-R dans des fibroblastes conduit également à la formation de tumeurs lorsque ces cellules sont injectées à des souris nude (Kaleto, 1990). La transformation est bloquée si le récepteur est tronqué ou est muté dans le domaine tyrosine kinase (Li *et al.*, 1994 ; Hernandez-Sanchez, 1995).

On constate que lorsque l'IGF1 est lié à l'IGFBP-3 son injection entraîne moins d'effets secondaires. L'IGFBP-3 aurait par ailleurs un effet inhibiteur sur la prolifération cellulaire. Le gène de IGFBP-3 situé sur le chromosome 7 (7p14-p12) pourrait être un gène suppresseur de tumeur (Stewart et Rotwein, 1996).

I - 2. IGF1 et IGF2 chez les animaux.

Après la découverte des IGFs chez l'homme, ces composés ont été recherchés dans le sang de différentes espèces animales, pour cela des techniques variées ont été utilisées :

- protein binding assay (PBA) qui utilise une protéine de liaison partiellement purifiée, de [¹²⁵I] IGF1 comme traceur et un mélange d'IGF1 et d'IGF2 comme standard (Zapf *et al.*, 1977). Cet essai mesure donc l'ensemble des IGFs.

- le radioreceptor assay (RRA) qui utilise des membranes de cellules hépatiques de rat. [¹²⁵I] IGF1 ou [¹²⁵I] IGF2 sont utilisés comme traceurs (Widmer *et al.*, 1982). Cet essai n'est pas non plus totalement spécifique pour l'un ou l'autre des IGF1.

- des radioimmunoassay (RIA) utilisant des anticorps polyclonaux ou monoclonaux souvent dirigés contre les IGFs humains (Owens *et al.*, 1994) ont été mis au point.

Parallèlement à ces techniques mesurant la quantité d'IGFs, des méthodes évaluant l'activité de ces molécules ont été développées comme par exemple le fat cell assay (FCA) (Zapf *et al.*, 1980) ou des tests mesurant l'activité mitogénique des IGFs par l'incorporation de [³H]-thymidine sur différentes lignées cellulaires. En effet une grande variété de cellules répondent à la présence d'IGF1 par une prolifération (Jones et Clemmons, 1995) et dans leurs premiers travaux, Morell et Froesch (1973) avaient utilisé des fibroblastes d'embryons de poulets.

Ces techniques ont permis de quantifier les taux circulants d'IGF1 et d'IGF2 dans le sang de différents animaux. Des injections d'IGF ont permis de préciser leur rôle dans différentes espèces. Des expériences de culture cellulaire ont par ailleurs montré que les sérums d'animaux contenant des facteurs de

croissance, dont les IGFs, étaient susceptibles de faire proliférer les cellules *in vitro*.

Le séquençage des IGF1 et IGF2 provenant de différentes espèces animales montrent une grande homologie en ce qui concerne ces facteurs de croissance chez les mammifères, les différences augmentent lorsqu'on descend dans l'échelle de l'évolution (Fig. 9).

I-2.1. Le porc.

Par RIA, IGF1 a été détecté dans le sang de porc. Les valeurs chez l'adulte sont comprises entre 140 et 170 $\mu\text{g/l}$ (Bauer et Parvizi, 1996). La même étude rapporte les taux d'IGF1 chez le fœtus, chez qui les valeurs sont largement plus élevées que celles trouvées chez leur mère, elles peuvent atteindre 300 $\mu\text{g/l}$. Elles fluctuent avec l'âge fœtal et elles subissent des fluctuations au cours du nyctémère. IGF2 a également été mis en évidence dans le sang de porc ainsi que l'IGFBP-2. Comme chez l'homme, IGF1 et IGF2 sont sensibles aux apports nutritionnels, la privation de nourriture diminue la concentration sérique de ces deux composés. Dans ces conditions, la diminution d'IGFBP-2 s'accompagne d'une augmentation de la protéolyse (Mc Custer *et al.*, 1991 ; Simmen *et al.*, 1998). D'autres protéines de liaison ont été identifiées, ainsi des cultures primaires de préadypocytes (Stroma vasculaire) synthétisent IGFBP-1, -2, -3, -4, les cellules fœtales sécrètent plus d'IGFBP-2 et-3 tandis que les cellules post-natales synthétisent de façon prédominante une protéine qui peut être assimilée à IGFBP-1 (Chen *et al.*, 1996). La régulation de IGFBP-3 est comme chez l'homme sous la dépendance de la GH.

L'état nutritionnel affecte la reproduction de la truie. La granulosa est un site majeur de sécrétion des IGF1 chez le porc. IGF1 stimule la réplication et la différenciation des cellules de la granulosa avec stimulation de la synthèse des gonadotrophines, de la progestérone, d'HCG. Le liquide folliculaire de porc contient des IGFBP-2, -3, -5 et -6, les IGFBP-2 et IGFBP-3 sont prédominantes

I - Introduction

IGF-I	1	10	20	30	40	50	60
Human	GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLREMYCA						PLKPAI
Cow
Rat	P.....	I.....T
Mouse	P.....	I.....T
ChickenS.....	LHK.....Q.....I..P
Xenopus	T.....S.....NN..	SHHR.....Q..F.....A...
Sea Bream	S.....	T.....	E.....	S.....	PNA..S..	R.....Q..E.....A..TS
Trout	T.....	E.....	S.....	P.....	SHNR.....Q..E.....V..SI
Salmon	T.....	E.....	S.....	P.....	SHNR.....Q..E.....V..SI
Carp	T.....S.....	P.....	SHNR.....Q..E.....V..I
Shark	S.....	A..R..V..	PHR.....	N.....Q.....KL.....KQRAI

Fig. 9 A : Séquence en acides aminés d'IGF1 de diverses espèces animales. Les traits représentent les acides aminés identiques à ceux de l'IGF1 humain.

IGF-II	1	10	20	30	40	50	60
Human	AYRPSETLCGGELVDTLQFVCGDRGFYF.SRPASRV.SRRS..RGIVEECCFRSCDLALLETYCAT..PA						
CowS..I.N.....
Rat	S.....S..A.N.....
Mouse	..G.G.....	S.....S..A.N.....
Chicken	..GTA.....VG.N.N..I.N.....K..SI
Trout	EVASA.....	A.....E.....T..SNS..	QN.....N..Q..K...
Salmon	EVASA.....	A.....E.....T..SNS..	QN.....N..Q..K...
Sea Bream	EVASA.....	A.....E.....T..GNN..	PQN.....N..Q..K...
Shark	EA..LE.....	S.....I..AE.....V..KVG..R.....	QN.....U.....V..

Fig. 9 B : Séquence en acides aminés d'IGF2 de diverses espèces animales. Les traits représentent les acides aminés identiques à ceux de l'IGF2 humain.

(Simmen *et al.*, 1998). Les cellules de Leydig et les cellules de Sertoli présentent des récepteurs à l'IGF1 et à l'IGF2 qui sont stimulés par l'HCG.

Le colostrum de truie contient des IGFs et des IGFBPs qui contribuent au développement de la glande mammaire et qui passent avec le premier lait (Simmen *et al.*, 1998).

L'IGF1 de porc comme l'IGF1 humain stimule la réplication cellulaire, des expériences le montrant ont été faites sur des préadypocytes de porc (Wright et Hausman, 1995).

Les cartilages, en particulier le cartilage costal de porcelet, ont été longtemps utilisés pour le dosage de l'activité somatomédine (Van den Brande et Ducaju, 1974 ; Phillips *et al.*, 1974).

I-2.2. Bovins et ovins.

Depuis longtemps des facteurs de croissance dont IGF1 et IGF2 ont été mis en évidence dans le colostrum et le lait bovin. Les concentrations trouvées dans le colostrum varient selon les auteurs : pour IGF1 de 300 à plus de 1 000 $\mu\text{g/l}$ (Francis *et al.*, 1986 ; Malven *et al.*, 1987 ; Ronge et Blum, 1988) et seraient d'environ 400 $\mu\text{g/l}$ pour IGF2, tandis qu'elles sont beaucoup plus faibles dans le lait : 6 à 8 $\mu\text{g/l}$ (Baxter *et al.*, 1984). L'IGF1 du colostrum et du lait serait le responsable de la stimulation de la synthèse protéique. IGF1 agirait sur le développement de l'intestin des veaux nouveau-nés et sur les récepteurs à IGF1 de ces tissus (Baumrucker *et al.*, 1994).

Les IGFs ont été identifiés et dosés dans le sang de bovins adultes par RIA. Zangler *et al.* (1987) déterminent des taux de 20 $\mu\text{g/l}$ pour IGF1 et de 10 $\mu\text{g/l}$ pour IGF2.

Comme chez l'homme, les IGFs régulent de nombreuses fonctions. IGF1 et IGF2 diminuent la prolifération et l'incorporation de [^3H]-thymidine dans des cellules musculaires lisses provenant de la coronaire lorsqu'elles sont cultivées

en présence de sérum de veau foetal (SVF) alors qu'ils augmentent l'expression de bFGF et du récepteur bFGF (Schriever *et al.*, 1996).

Comme chez la femme on trouve de l'IGF1, de l'IGFBP-2 et -3 dans l'utérus, les ovaires et l'oviducte où ils joueraient un rôle important dans la reproduction (Kirby *et al.*, 1996) ; Robinson *et al.*, 2000). Dans les cellules bovines de la granulosa et de la thèque, l'IGF1 stimule l'HMG COA réductase, enzyme clef de la synthèse du cholestérol précurseur des hormones stéroïdes (Spicer *et al.*, 1996).

L'IGF1 et l'IGF2 ont également été déterminés dans le sang de chèvre et de mouton. Chez les premiers, la concentration est de 22 $\mu\text{g/l}$ et 9 $\mu\text{g/l}$ pour IGF1 et IGF2 respectivement ; chez les seconds IGF2 n'est pas mesurable alors que 119 $\mu\text{g/l}$ d'IGF1 ont été trouvés (Zangler *et al.*, 1987). Chez le mouton adulte, le foie est la source principale d'IGF1 circulant alors que, chez le fœtus, les muscles en sont également une source importante. La régulation de l'expression du gène d'IGF1 est différente dans le foie où une injection d'IGF1 réduit la synthèse des ARNm d'IGF1 et IGF2 et dans le muscle où l'injection d'IGF1 est sans effet (Kind *et al.*, 1996).

Comme chez les autres espèces, les IGFs sont liés aux IGFBPs. Leur concentration est régulée par les apports nutritionnels, la concentration d'IGFBP-2 est plus importante chez les animaux privés de nourriture. IGFBP-3 est régulée par IGF1, elle augmente après injection d'IGF1 (Oddy et Owens, 1996).

Chez la brebis, les IGFs et leurs protéines de liaison semblent aussi jouer un rôle dans la reproduction. Les IGFBP-1 sont produites par les ovaires en culture. Durant le développement du follicule, on observe une augmentation d'IGFBP-3 et une diminution d'IGFBP-2 et 4. Dans les cultures de cellules thécales, IGFBP-4 augmente lorsque les cellules sont exposées à la LH, dans les mêmes conditions IGFBP-2 diminue (Armstrong *et al.*, 1996). Dans l'oviducte de brebis, l'IGF1 ARNm a un profil cyclique avec une augmentation à la fin de la phase folliculaire. Les ARNm d'IGF2 ne varient pas en fonction du cycle. Les ARNm de IGF-RI augmentent aussi pendant la phase folliculaire et présentent

un pic au début de la phase lutéale. Les ARNm de IGFBP-2 sont indétectables mais les ARNm d'IGFBP-3 ont un pic en fin de phase folliculaire. Toutes ces modifications doivent préparer un environnement propice à la conception et au début de la croissance embryonnaire (Stevensen et Wathes, 1996).

I-2.3. Cheval.

Selon les auteurs, les taux d'IGFs circulants varient, Zangler *et al.* (1987) donnent des valeurs de 115 $\mu\text{g/l}$ pour IGF1, IGF2 est inférieur à 10 $\mu\text{g/l}$. Buonoma *et al.* (1996) utilisant aussi un radioimmunoassay trouvent des concentrations chez les juments allant de 200 à 400 $\mu\text{g/l}$. Pour ces auteurs, les concentrations plasmatiques d'IGF1 sont significativement plus élevées chez les mâles que chez les femelles. Comme dans d'autres espèces la concentration d'IGF1 circulant est régulée positivement par l'hormone de croissance. Dans le sérum de cheval ont aussi été identifiées des protéines de liaison des IGFs correspondant à l'IGFBP-1, -2, -3 et -4, semblables aux protéines identifiées chez l'homme, les bovins, les porcs. IGFBP-1, -3 et -4 sont augmentés après traitement par la GH (Buonoma *et al.*, 1996) alors que les concentrations d'IGFBP-2 ne sont pas modifiées et que la GH inhibe la synthèse de cette protéine chez le veau ou le porc (Cohick *et al.*, 1992). De plus une protéine de 96 kDa liant IGF1 et IGF2 a été identifiée dans le sérum de cheval, elle n'existe pas chez les bovins (Prosser et Mc Laren, 1992).

Comme dans beaucoup d'espèces, l'IGF2 est exprimé de façon plus importante que l'IGF1 dans les tissus fœtaux où des ARNm d'IGF2 ont été identifiés dans pratiquement tous les tissus (Lennard *et al.*, 1995).

I-2.4. Les rongeurs (lapins et rats).

Les IGFs ont d'abord été identifiés chez le lapin par des dosages biologiques. Ainsi par PBA, FCA et CEFA Zangler *et al.* (1987) trouvent

respectivement 97 mU/l, 63 mU/l et 15 mU/l d'IGFs ; par dosage spécifique RIA, ils détectent 10 µg/l d'IGF1 tandis que IGF2 n'est pas mesurable.

Des modèles expérimentaux ont été développés à partir de cartilage ou de chondrocytes de lapin pour évaluer la croissance et le métabolisme du cartilage dans le cadre de l'étude et du traitement des maladies rhumatismales. Dans ces modèles, on observe une production d'IGF1 et IGF2 dans les milieux de culture, la production d'IGF2 est environ 5 fois plus importante que celle d'IGF1. IGF1 et IGF2 sont mitogéniques pour ces cellules, IGF1 est plus actif que IGF2 à la même concentration.

Les chondrocytes de lapin sécrètent des IGFBPs qui sont très semblables aux IGFBPs circulantes. Ces IGFBPs présentent des analogies avec les IGFBPs humaines, cependant la bande de 34 kDa trouvée chez l'homme n'est pas présente chez le lapin (Froger-Gaillard *et al.*, 1989).

Des cartilages de lapin (Bala *et al.*, 1975) ou des chondrocytes de lapin (Corvol *et al.*, 1978) ont été utilisés pour doser l'activité biologique des IGFs.

La mise en évidence du facteur de sulfation qui deviendra plus tard les IGFs a été faite par Salmon et Daughaday (1957) en étudiant l'incorporation de sulfate dans des cartilages costaux de rats hypophysectomisés sous l'action de la GH. Plus tard, les IGFs ont été identifiés dans le sérum de rat et Zangler *et al.* (1987), par dosages biologiques, trouvent 80 mU/ml (PBA), 30 mU /l (FCA) et 207 µg/l (CEFA) mais leurs dosages radioimmunologiques donnent des valeurs plus faibles : 10 µg/l pour IGF1 et < à 10 µg/l pour IGF2. Par contre Reber et Liske (1976) utilisant un autre immunsérum détectent entre 130 et 200 µg/l d'IGF1. Les faibles concentrations en IGF2 dans le sang des rats adultes ont été confirmées par Moses *et al.* (1980).

Tous les auteurs s'accordent pour dire que le taux d'IGF1 est toujours supérieur à celui d'IGF2 chez les rats adultes (Conlon *et al.*, 1995), chez le fœtus les concentrations en IGF2 sont plus élevées (Moses *et al.*, 1980). Le taux circulant d'IGF1 comme dans d'autres espèces est régulé par les apports alimentaires. Ainsi Monaco et Donavon (1997) montrent que chez les rates allaitantes, la restriction alimentaire fait chuter le taux circulant d'IGF1 de

244 $\mu\text{g/l}$ à 119 $\mu\text{g/l}$ en 20 jours. Parallèlement le taux de GH augmente et le profil des IGFs se modifie. IGF-1, -2, -4 diminuent, la concentration d'IGF-3 reste stable. D'autres auteurs montrent que la diminution de l'apport en protéines augmente l'expression des gènes de l'IGF-2 dans le foie de jeunes rats (Straus et Takemoto, 1990). Dans le sérum de rat, il y aurait un récepteur soluble de type II (Kiess *et al.*, 1987).

Bien qu'il contienne des IGFs et plus particulièrement de l'IGF1, le plasma de rat inhibe l'activité mitogénique et de sulfatation mesurées sur des fibroblastes d'embryons de poulets (Gmira, 1991). Cette activité inhibitrice a été imputée à un facteur glycoprotéique de faible poids moléculaire (Boffa *et al.*, 1985).

Les cartilages de rats ont été également très utilisés pour le dosage biologique des IGFs (Salmon et Daughaday, 1957).

I-2.5. Poulet.

Chez le poulet, on trouve de l'IGF1 polypeptide de 70 aa dont seulement 8 aa sont différents de ceux de l'IGF1 humain (Ballard *et al.*, 1990), l'IGF2 est constitué de 66 aa ou 67 aa puisqu'il semble exister deux variants (Upton *et al.*, 1995 ; Dawe *et al.*, 1988 ; Kallincos *et al.*, 1990).

Comme chez l'homme et les mammifères, les IGF1 interviennent sur la croissance et la différenciation (Girbau *et al.*, 1997 ; Oesterle *et al.*, 1997).

Les premières mesures faites par Zangler *et al.* (1987) par PBA donnait une concentration plasmatique d'IGF1 et IGF2 de 24 mU/l, par la même technique les résultats obtenus chez l'homme étaient de 313 mU/l. Plus récemment et avec un dosage RIA utilisant des anticorps polyclonaux contre IGF1 humain et un anticorps monoclonal anti IGF2 de rat, Kita *et al.* (1996) évaluent les concentrations d'IGF1 circulant à environ 15 $\mu\text{g/l}$ et celles d'IGF2 à environ 12 $\mu\text{g/l}$. Les concentrations d'IGF1 varient en fonction de l'âge et présentent un pic au moment de la maturité sexuelle (Mc Guinness et Cogburn, 1990).

Le taux d'IGF1 circulant, comme chez l'homme, est sous la dépendance des apports alimentaires, la restriction alimentaire le fait chuter de 30 % (Kita *et*

al., 1996) à 60 % (Ballard *et al.*, 1990). Le taux d'IGF2 circulant ne semble pas affecter par les apports nutritionnels (Kita *et al.*, 1996). La protéine majeure de liaison des IGFs dans le sang circulant du poulet est une protéine de 30 kDa qui est synthétisée plus intensément lorsque les animaux sont sous restriction alimentaire et qui diminue au cours de la renutrition. Lorsque [¹²⁵I]IGF2 est utilisé comme sonde, une seconde protéine de 75 kDa est révélée, cette bande diminue avec l'âge ce qui pourrait être en relation avec le rôle de IGF2 au cours du développement embryonnaire. Sa concentration n'est pas modifiée par l'état nutritionnel (Kita *et al.*, 1996). Il faut préciser que chez le poulet, les récepteurs de type II n'ont pas été mis en évidence.

Le sérum de poulet n'est pas couramment utilisé en culture cellulaire pour l'apport de facteurs de croissance. Par contre, les cartilages de poulets ont été souvent utilisés pour le dosage biologique des IGFs (Hall, 1970 ; Donnadiou *et al.*, 1980 ; Heulin *et al.*, 1984).

I-3. LES FACTEURS DE CROISSANCE DE PETIT POIDS MOLECULAIRE (FCPPM OU LMW GF).

Depuis de nombreuses années, le laboratoire travaille à l'identification, la caractérisation et la purification de ces facteurs.

I-3.1. Leur mise en évidence.

Le laboratoire, dans sa thématique facteurs de croissance, était passé de l'étude de la GH à celle des IGFs et pour ce faire avait entrepris de purifier les IGFs à partir de la fraction IV de Cohn provenant de plasma humain (Stoltz *et al.*, 1985, Straczek *et al.*, 1989 ; Straczek *et al.*, 1990 b). Pour suivre cette

purification, avait été utilisé un dosage biologique. Parmi les dosages biologiques, seuls alors disponibles, avait été choisi le dosage sur cartilage d'embryons de poulets (Heulin *et al.*, 1984) qui consiste à mesurer l'incorporation de $^{35}\text{SO}_4$ dans les cartilages pelviens d'embryons de poulets de 11 jours en présence et en absence des fractions de purification à tester. Contrairement au sérum qui donne des réponses parfaitement linéaires, des fractions semi-purifiées de somatomédine donnent des réponses paradoxales (soit pas de réponse, soit des courbes dose-réponses négatives). Ces anomalies avaient déjà été décrites par Bala *et al.*, (1975) dans un dosage biologique de somatomédine utilisant des cartilages de rats hypophysectomisés ou par Steverstsson *et al.*, (1974) qui mesuraient l'incorporation de $^{35}\text{SO}_4$ dans des cartilages d'embryons de poulets.

Devant ces résultats, l'hypothèse de la perte d'un cofacteur au cours de la purification a été émise ; hypothèse s'appuyant sur les travaux de Froesch *et al.*, (1976) qui avaient suggéré qu'un facteur de nature inconnue était nécessaire à l'activité des somatomédines. Heulin dans une première série d'expériences a ultrafiltré des sérums humains contenant une activité IGFs avec des membranes à seuil de coupure 1000 Da : l'ultrafiltration est arrêtée lorsqu'il y a 2/3 d'ultrafiltrat (UF 1000) et 1/3 de rétentat (R). Comme attendu le sérum entier a une activité de sulfatation ; après ultrafiltration à seuil de coupure 1000 Da, cette activité est presque totalement perdue dans le rétentat et elle est retrouvée plus ou moins totalement après addition de l'ultrafiltrat au rétentat (Fig. 10A) (Heulin *et al.*, 1981 a ; Heulin *et al.*, 1981 b ; Heulin *et al.*, 1982).

Dans une deuxième série d'expériences, l'activité de sulfatation des fractions partiellement purifiées d'IGF a été mesurée en présence et en absence d'ultrafiltrat qui contient les substances de masse moléculaire inférieure à 1000 Da (UF 1000). L'UF 1000 seul n'a pas d'activité de sulfatation, la fraction d'IGF partiellement purifiée a une activité faible, par contre, l'addition de 5 % d'UF 1000 augmente de façon synergique l'activité de sulfatation (Heulin, 1982). Cette augmentation est UF 1000 dose-dépendante (Fig. 10B).

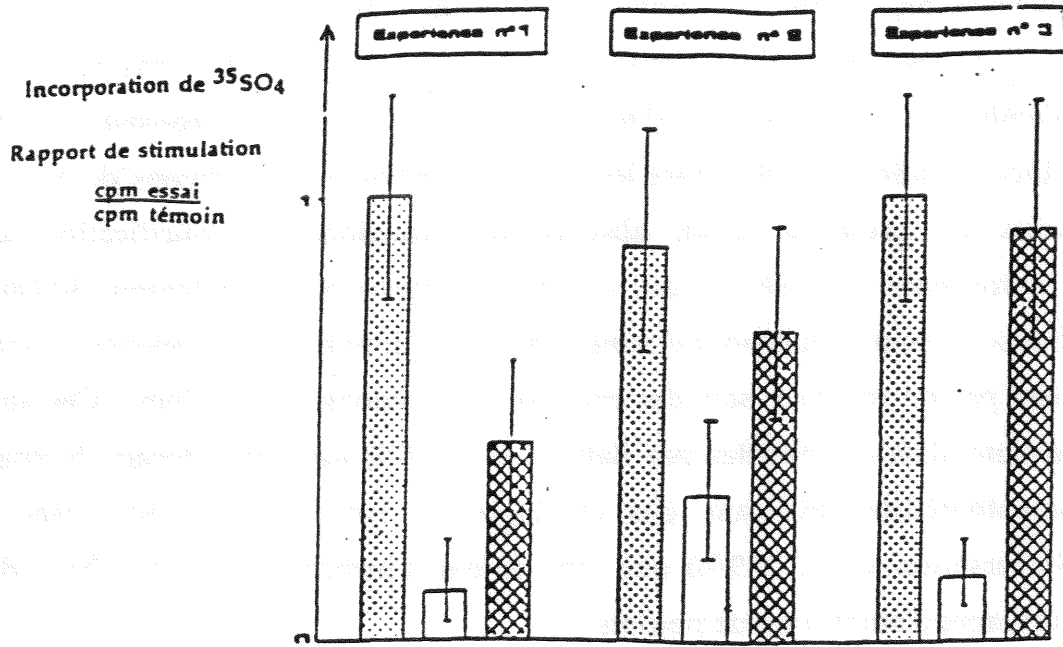


Fig. 10 A : Activité de sulfatation de sérum entier ; de rétentat lavé ramené au volume initial (R) ; et du mélange R + UF seuil de coupure 1000

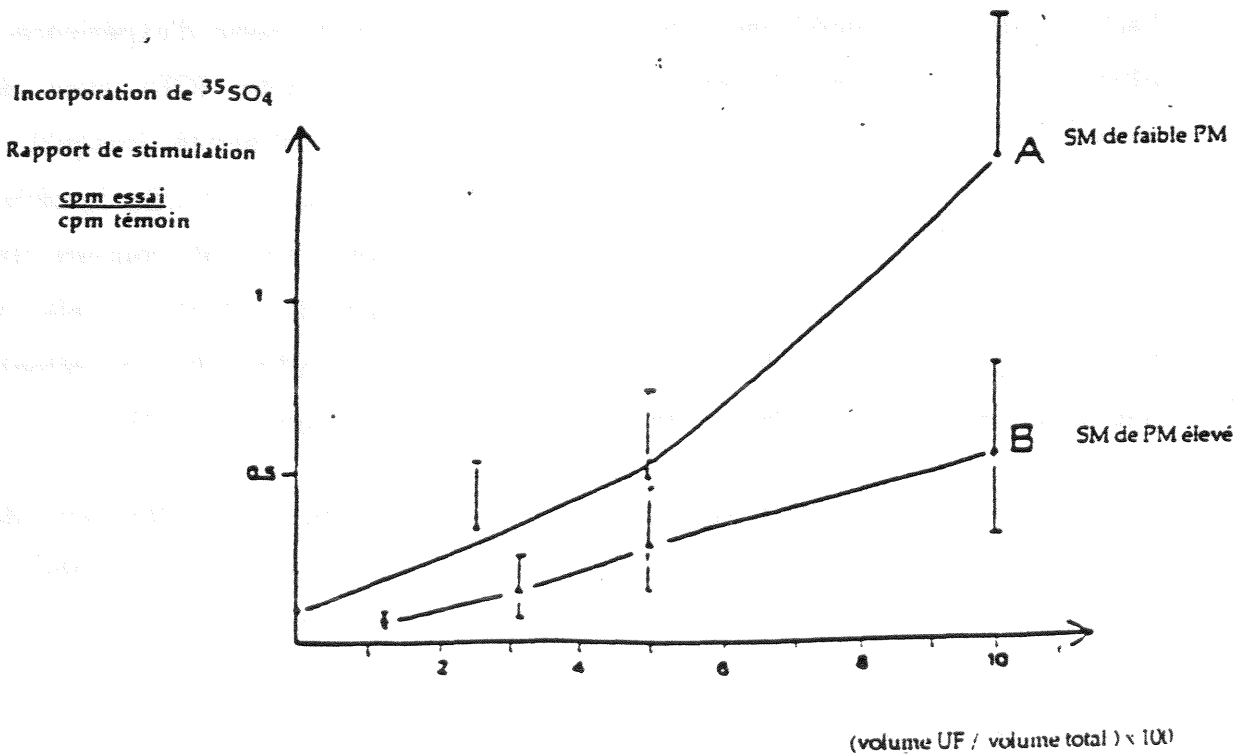


Fig. 10 B : Effets de doses croissantes d'UF 1000 sur l'activité de sulfatation de fractions purifiées d'IGF (somatomédine SM). A) SM de faible poids moléculaire (environ 7 kDa), B) SM liée aux protéines porteuses (Heulin, 1981).

I-3.2. Propriétés physico-chimiques des FCPPM.

Comme nous avons rencontré de grandes difficultés pour purifier les FCPPM, nous avons, avant de connaître leur structure, déterminé un certain nombre de leurs propriétés. La masse moléculaire des composés actifs avait été évaluée à environ 500 kDa par ultrafiltration et entre 350 et 700 Da par chromatographie sur gel (Biogel P2).

Ces composés semblent circuler sous forme libre dans le sang puisqu'on les retrouve dans l'ultrafiltrat obtenu avec des membranes à seuil de coupure 1000 sans traitement préalable du sérum.

Ils se conservent environ une année dans les UF 1000 congelés à -20°C ou -80°C . Ils résistent à un chauffage à 100°C pendant 90 min. à pH neutre, ils sont détruits par chauffage en milieu HCl 6N à 110°C pendant 24 h.

Les FCPPM sont hydrophiles. En effet, après traitement des UF 1000 par le chloroforme, la totalité de l'activité est retrouvée dans la phase aqueuse.

Les FCPPM sont résistants à la destruction par les enzymes. Les endopeptidases (pepsine, pronase, papaïne, trypsine, protéinase K) sont sans action. Il en est de même pour une exopeptidase : l'aminocyclase 1. Par contre, la carboxy-peptidase Y détruit l'activité de ces molécules (Heulin *et al.*, 1987). Les endoglycosidases (N glycanase, O glycanase), comme les exoglycosidases (α glucosidase, β glucosidase, α galactosidase, α mamnosidase) ne dégradent pas l'activité (El Farricha, 1991).

A partir de ces résultats, l'hypothèse que les FCPPM étaient des peptides a été émise, hypothèse renforcée par le fait que de nombreuses petites molécules connues pour leur activité éventuelle sur la croissance ne reproduisaient pas l'activité des FCPPM. Dousset a récapitulé dans sa thèse les molécules testées (Dousset, 1997).

I-3.3. Propriétés biologiques.

I-3.3.1. Les FCPPM et activité de sulfatation des IGFs.

Les FCPPM sont indispensables à l'expression de l'activité de sulfatation des IGFs lorsque cette dernière est mesurée par le test d'incorporation de [³⁵S] SO₄ dans des cartilages d'embryons de poulets. C'est d'ailleurs cette propriété qui nous a permis de les mettre en évidence et de suivre leur purification.

Comme l'a montré Maachi *et al.* (1995) les FCPPM n'ont pas la même action vis-à-vis d'IGF1 et IGF2. IGF1 et IGF2 stimulent la synthèse des protéoglycanes (Froesch *et al.*, 1985), synthèse qui comporte la formation de la "core protein", de l'allongement des chaînes glycaniques et finalement la sulfatation de ces chaînes (Inoue *et al.*, 1986). Les FCPPM sont sans action par eux-mêmes sur l'étape de sulfatation, IGF1 seul est également sans action, par contre l'addition simultanée d'IGF1 et de FCPPM stimule très fortement l'incorporation de sulfate. Il en est de même pour la sérine (synthèse de la core protein). L'incorporation de glucosamine (allongement des chaînes glycaniques) est importante en présence d'IGF1, l'addition des FCPPM n'améliore pas cette étape. En présence d'IGF2 les FCPPM augmentent seulement l'incorporation de sérine (Fig. 11).

I-3.3.2. FCPPM et activité mitogénique.

L'activité mitogénique des FCPPM a également été testée sur des fibroblastes d'embryons de poulets (Artur *et al.*, 1987 ; Heulin *et al.*, 1987). Les cartilages pelviens d'embryons de poulets de 11 jours subissent un traitement enzymatique (trypsine : 2,5 % et collagénase : 0,5 %) puis les fibroblastes obtenus sont mis en culture. L'expérience est réalisée après synchronisation des cellules en phase G₀/G₁. L'UF 1000 seul a une activité mitogénique contrairement à ce qui avait été observé pour l'activité de sulfatation et, de plus, il stimule l'activité

mitogénique des IGFs dans ce modèle cellulaire (Fig. 12). Des expériences ont aussi été réalisées sur des fibroblastes humains : des fibroblastes pulmonaires embryonnaires (Biomérieux 8400B), des fibroblastes de peau prélevés chez des enfants, des fibroblastes de prépuce d'enfants. Les résultats sont semblables à ceux obtenus sur fibroblastes de poulets.

L'activité mitogénique a été testée sur des lymphocytes humains activés par la phytohémagglutinine A (PHA) (Heulin *et al.*, 1982 ; Heulin *et al.*, 1987 ; Rajoelina, 1987). Les lymphocytes sont isolés sur Ficoll-paque, puis répartis dans des plaques de 96 puits à raison de 2×10^5 cellules par puits. Ils sont activés par la PHA et mis en présence des produits à tester pendant 72 heures. La [3 H]-thymidine est ajoutée pendant les 18 dernières heures de culture. La figure 13 donne les résultats obtenus avec un UF de sérum, en présence d'IGF1 et d'IGF2 partiellement purifiés. Sur ces cellules, les FCPPM stimulent également l'activité mitogénique des IGF1 et IGF2.

I-3.4. Variations physiologiques et pathologiques.

Les variations de l'activité des FCPPM ont été évaluées par dosage biologique (incorporation de $^{35}\text{SO}_4$ dans les cartilages d'embryons de poulets).

Il apparaît que l'activité FCPPM est indépendante de l'âge et du sexe contrairement à ce qui est observé pour les IGFs (Widmer *et al.*, 1983 ; El Farricha, 1991 ; Juul *et al.*, 1994).

L'activité FCPPM contrairement à IGF1 n'est pas sous la dépendance de l'hormone de croissance. Elle n'est pas diminuée dans les hypopituitarismes, elle n'est pas augmentée sous traitement à la GH (Dousset, 1997).

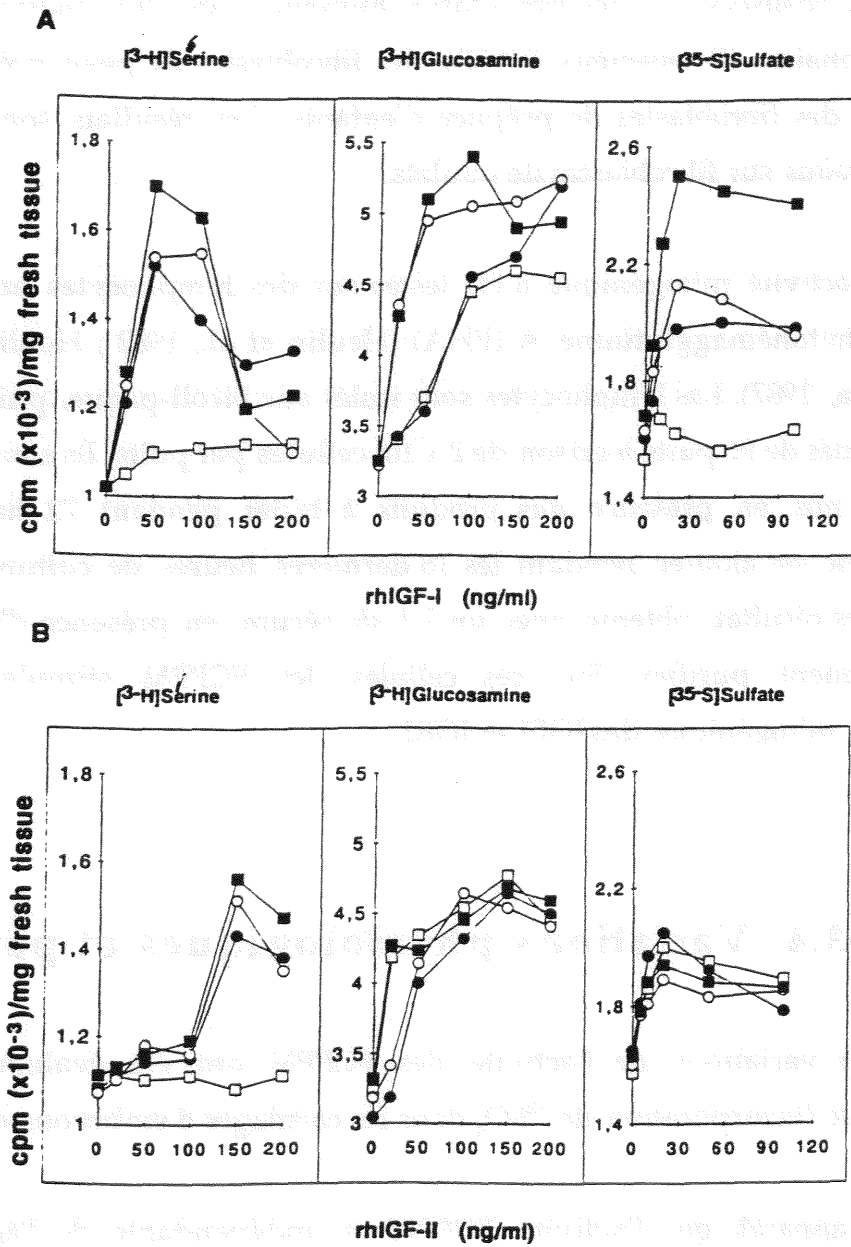


Fig. 11 : Effets de rhIGF1 ou rhIGF2, seul ou en association avec les FCPPM, sur l'incorporation de L [3 H]-sérine, D [3 H]-glucosamine, [35 S]-Na $_2$ SO $_4$ dans des cartilages pelviens d'embryons de poulets (Maachi et al., 1995).

rIGFs seuls □ rIGFs + 7,5 ng/ml FCPPM ● ●
 rIGFs + 15 ng/ml FCPPM ○ ○ rIGFs + 30 ng/ml FCPPM ■

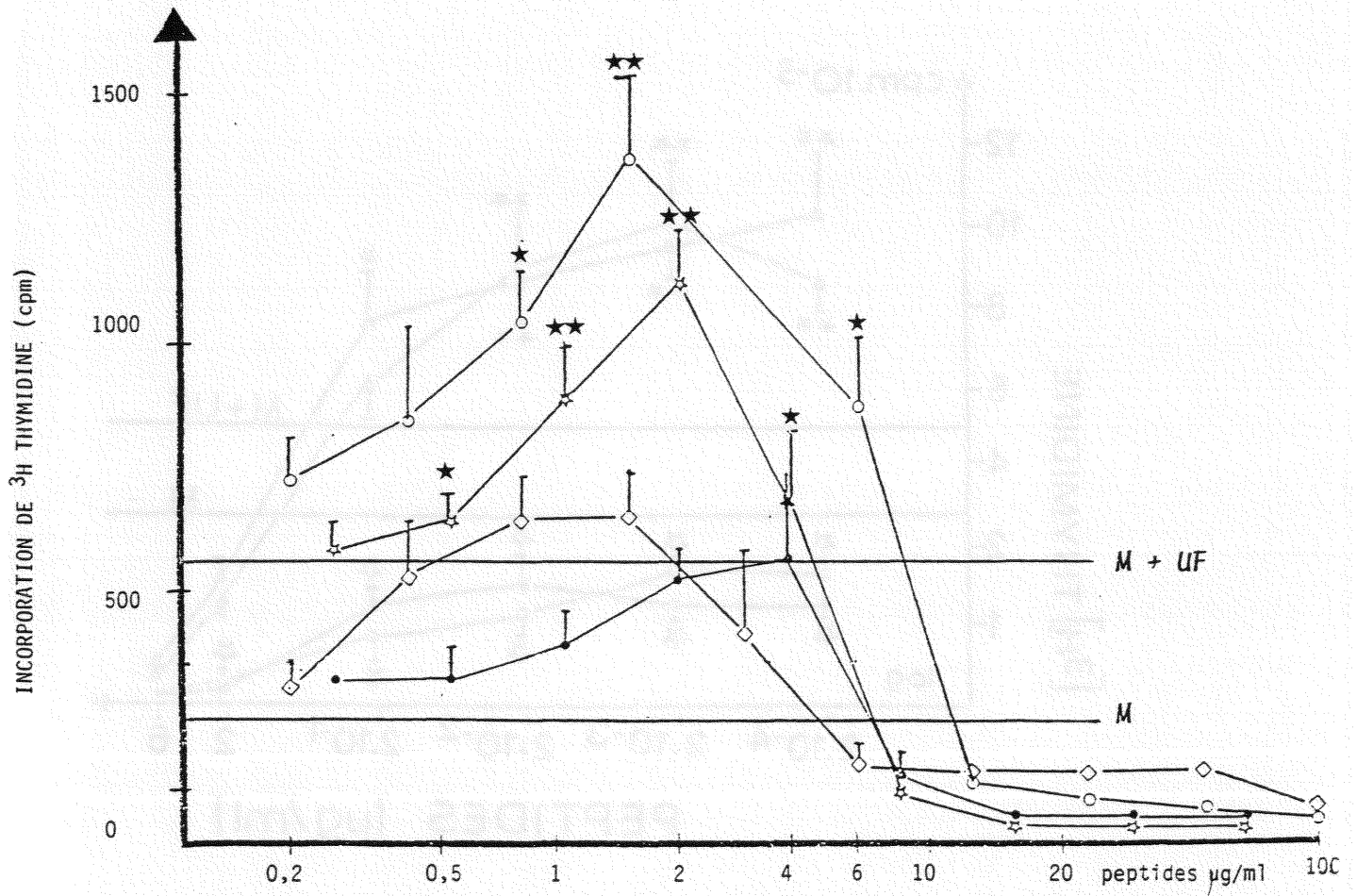


Fig. 12 : Effet mitogénique de l'UF 1000 (mesuré par incorporation de [³H]-thymidine) sur des fibroblastes d'embryons de poulets, testé seul ou en présence de fractions partiellement purifiées d'IGF1 ou d'IGF2 (Rajoelina, 1987).

IGF1 seul ●—● IGF2 seul ◇—◇
 IGF1s + 10 % UF 1000 ☆—☆ IGF2 + 10 % UF 1000 ○—○
 (★ p < 0,05 ★★ p < 0,01)

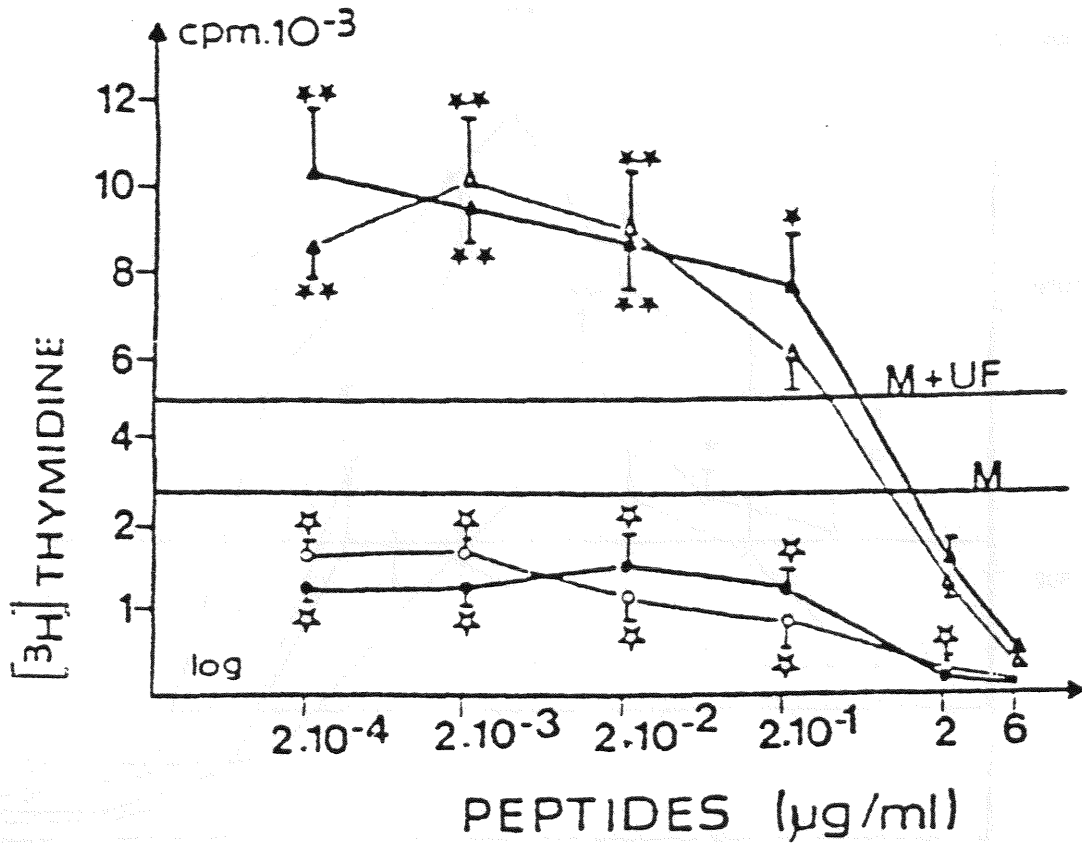


Fig. 13 : Effets d'un ultrafiltrat et de fractions partiellement purifiées d'IGF1 et d'IGF2, sur l'incorporation de [³H]-thymidine par les lymphocytes humains activés par la phytohémagglutinine (Rajoelina, 1987).

○—○ fraction d' IGF1 ●—● fraction d' IGF2 testées seules
 △—△ fraction d' IGF1 ▲—▲ fraction d' IGF2 testées en présence de 10 % d'ultrafiltrat.
 Effet significativement inhibiteur par rapport au milieu ☆ p < 0,05. Effets synergiques de l'ultrafiltrat et des fractions d'IGF1 ou d'IGF2 par rapport aux fractions d'IGF1 ou d'IGF2 seuls (* p < 0,05 ** p < 0,01).

Les FCPPM étant une molécule de faible poids moléculaire, on a émis l'hypothèse qu'ils pouvaient s'accumuler dans l'insuffisance rénale comme d'autres petites molécules. Cette hypothèse s'est avérée complètement fautive, à l'inverse on a observé que l'insuffisance rénale s'accompagne d'une perte totale de l'activité FCPPM et cette activité réapparaît après transplantation rénale réussie. La mesure de l'activité FCPPM serait un bon marqueur du rejet de greffe (Jacob *et al.*, 1993). Ces résultats ont été confirmés chez le porc : dans les quelques heures qui suivent une néphrectomie, on observe une diminution de l'activité FCPPM, la réimplantation d'un rein entraîne rapidement la réapparition de l'activité FCPPM (Jacob *et al.*, 1995).

I-3.5. Origine.

Le rein semble jouer un rôle important dans la synthèse ou la libération des FCPPM. D'autres origines possibles ont été recherchées. Contrairement à ce qui se passe pour les IGFs, le foie ne semble jouer aucun rôle dans la formation de ces composés. La même activité de sulfatation est trouvée dans les veines sus et sous hépatiques (El Farricha, 1991). L'activité FCPPM n'est pas générée au cours de la coagulation ni sous l'action d'enzymes protéolytiques sur les protéines plasmatiques. Les plaquettes ne semblent pas impliquées dans leur libération.

I-3.6. Purification.

Parallèlement à tous ces travaux qui essayaient d'apporter des informations sur la nature, l'origine, les activités biologiques des FCPPM, leurs variations en pathologie, différents protocoles de purification ont été élaborés. Ils se heurtaient à un certain nombre de difficultés :

- Le dosage biologique, seul utilisable, est lourd, consomme beaucoup de produits, et sensible à de nombreux inhibiteurs.

- L'obtention de quantité suffisante de FCPM. La plupart des protocoles utilisaient comme produit de départ 1 l de sérum humain. Ces protocoles ont cependant permis d'obtenir une fraction purifiée appelée S4-2 qui, à faible concentration (30 ng/ml), reproduisait les activités de sulfatation et mitogénique des UF 1000 (Rajoalina, 1987 ; El Farricha, 1991).

Plus récemment en partant de 15 l de sérum humain, 2 peptides ont été purifiés et isolés : un hexapeptide et un tétrapeptide. Dans le sérum humain, nous avons aussi identifié un tripeptide n'ayant qu'une faible activité biologique.

Ce protocole de purification a comporté à partir de 15 l de sérum humain :

- une ultrafiltration à seuil de coupure 1000 Da,
- une chromatographie sur Biogel P2 avec récupération des fractions comprises entre un K_a de 0.45 et 0.65,
- une chromatographie HPLC préparative sur phase inverse (Colonne Vydac C 18, 250 x 10 mm) en utilisant une solution aqueuse à 0,1 % d'acide trifluoracétique (TFA) et un gradient d'acétonitrile (Fig. 14A).

Les pics actifs sont réinjectés sur une colonne HPLC analytique (Vydac C18, 250 x 4,6 mm, 300 Å) (Fig. 14B). Les pics ainsi séparés ont été analysés par spectrométrie de masse (Fig. 15) et séquençage. Le pic 2 contient majoritairement un composé ayant une masse de 528,6 Da dont la séquence est WGHE (Trp-Gly-His-Glu) de masse théorique 527,2 (Douset *et al.*, 1998). Le pic 1 comprend un composé majoritaire de 716,7 Da dont le séquençage a donné la structure HWESAS (His-Trp-Glu-Ser-Al-Ser) de masse théorique 715,78 (Straczek *et al.*, 1995). La deuxième masse 558,5 peut correspondre au tétrapeptide HWES de masse 557,6. En effet en séquençage un seul peptide a pu être identifié. Dans le pic 1, la masse majoritaire est 471,6 Da et le séquençage a donné la structure HWE de masse théorique 470,51 et qui pourrait être un produit de dégradation de HWESAS.

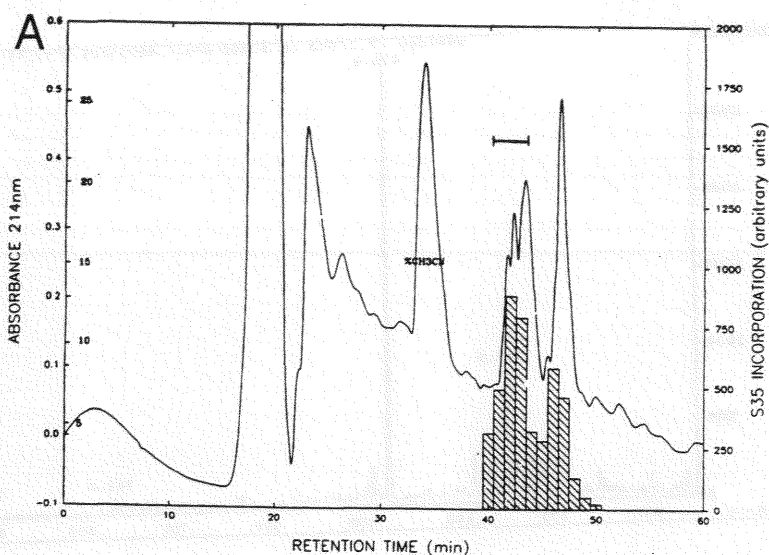


Fig. 14 A : Purification des FCPPM par chromatographie HPLC phase inverse Vydac C18 semi-préparative en utilisant un gradient linéaire d'acétonitrile dans 0,1 % de TFA. La fraction collectée entre 39 et 44 min. (ligne horizontale au-dessus du pic) est purifiée.

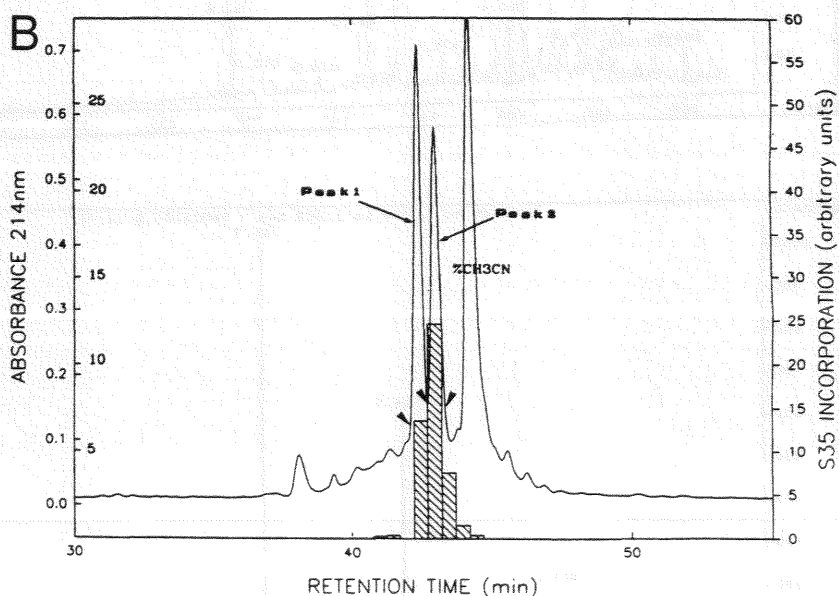


Fig. 14 B : HPLC analytique sur Vydac C18 de la fraction active précédemment obtenue. L'élution est faite avec un gradient d'acétonitrile dans 0,08 % de TFA. Les fractions correspondant aux pics 1, 2, et 3 après purification ultérieure, sont collectées pour l'analyse en spectrométrie de masse et le séquençage.

I - Introduction

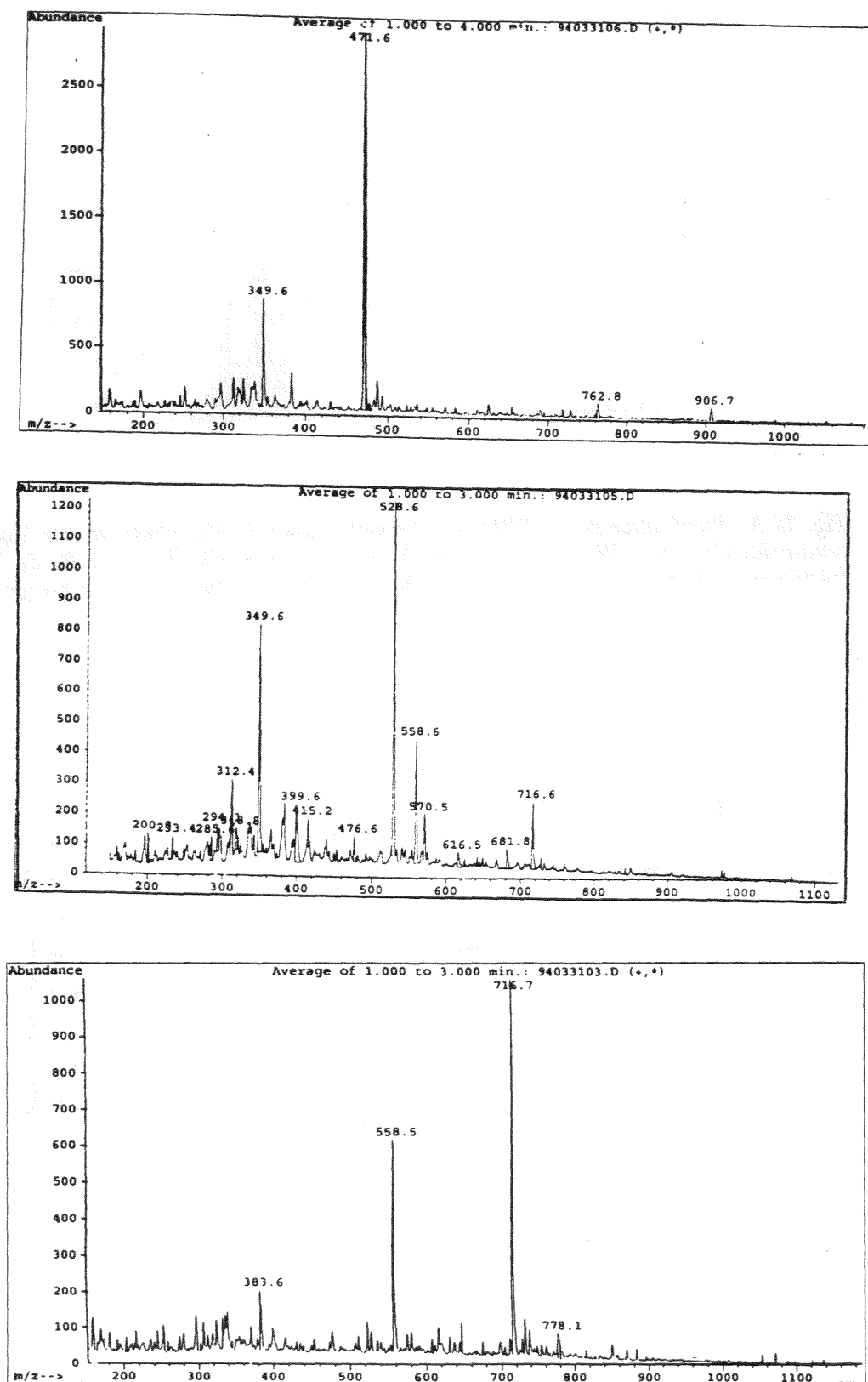


Fig. 15 : Etude par spectrométrie de masse des pics 1 (A), 2 (B) et 3 (C) obtenus par chromatographie HPLC.

Ces composés ont été synthétisés : l'hexapeptide HWESAS et le tétrapeptide WGHE présentent la même activité que les produits extraits. HWE est environ 100 fois moins actif.

Des anticorps dirigés contre les peptides ont été préparés. Un dosage immunologique, capable de remplacer le dosage biologique et plus sensible, est en cours d'élaboration (Capiaumont *et al.*, 1999 ; Capiaumont *et al.*, 2000).

I-3.7. Les FCPPM chez les animaux.

Lorsque les travaux sur les FCPPM ont commencé, la seule source pour la purification de ces facteurs était le plasma humain où ils avaient été identifiés. Le plasma humain étant difficile à se procurer, les FCPPM ont été recherchés dans des sérums d'animaux plus ou moins facilement disponibles.

Les FCPPM ont été recherchés par les tests dont nous disposions à l'époque, c'est-à-dire par le test de sulfatation utilisant l'incorporation de $^{35}\text{SO}_4$ dans des cartilages pelviens d'embryons de poulets et le test mitogénique basé sur l'incorporation de ^3H -thymidine dans des fibroblastes d'embryons de poulets. Ces travaux ont constitué une partie de la thèse de Gmira (1991). Les sérums d'animaux ont été traités comme les sérums humains : ils ont été ultrafiltrés à 1000 Da (UF 1000), le rétentat et le sérum entier ont été testés.

I-3.7.1. Activité de sulfatation.

Les sérums testés (cheval, boeuf, veau foetal, porc) ont une activité de sulfatation. Les rétentats (contenant les IGFs) augmentent significativement l'incorporation de $^{35}\text{SO}_4$. L'augmentation est de 1,22 à 1,42 pour le rétentat de cheval, 1,5 pour le sérum de boeuf, 1,3 à 1,5 pour le sérum de veau foetal et de porc. Ces résultats recourent ceux obtenus par d'autres auteurs comme nous l'avons décrit précédemment. Le rétentat de lapin est sans effet. Les rétentats de

sérums humains augmentaient de 1,23 à 1,36 l'incorporation de sulfate par rapport à l'activité basale.

L'étude des UF 1000 montre que les UF de cheval et de veau foetal augmentent significativement l'incorporation de sulfate de 1,17 à 1,36 par rapport au milieu de base. Les UF 1000 de boeuf, de porc et de lapin n'ont pas d'activité de sulfatation. L'UF 1000 de rat non seulement n'a pas d'activité de sulfatation mais au contraire provoque une inhibition de l'incorporation de $^{35}\text{SO}_4$.

I-3.7.2. Activité mitogénique.

On a déjà montré que le rétentat humain à toutes les concentrations testées (2,5; 5 et 10 % V/V) stimule l'incorporation de [^3H]-thymidine, le rapport de stimulation est de 4 à 20 fois celui du milieu de base. De la même manière, le rétentat de sérum de cheval, de boeuf, de porc, de veau foetal et de lapin stimule l'activité mitogénique des FEP. Le rapport de stimulation est de 4 à 12 pour le sérum de cheval, 3,5 à 8,5 pour le sérum de boeuf, 2,4 à 2,7 pour le sérum de porc, de 15 à 18 pour le sérum de veau foetal et de 2,2 à 2,5 pour le sérum de lapin.

Le rétentat de sérum de rat seul à faible dose (2,5 % V/V) stimule l'incorporation de thymidine tritiée mais plus la dose augmente (5 et 10 %) plus l'effet stimulateur diminue. Ainsi la concentration de 10 % de rétentat présente une stimulation qui n'est pas significativement différente de celle du milieu de base.

L'addition de l'ultrafiltrat humain à des concentrations de 2,5; 5 et 10 % V/V au milieu de base détermine une augmentation significative (1,5 à 11,7 fois) de l'incorporation de thymidine tritiée dans les fibroblastes d'embryons de poulets. Dans les mêmes conditions l'ultrafiltrat de sérum de cheval stimule l'activité mitogénique des FEP de 1,2 à 4,8 fois et l'ultrafiltrat du sérum de porc de 1,4 à 1,6 fois celui du milieu de base. Par contre l'ultrafiltrat du sérum de

boeuf, de veau fœtal et de lapin n'ont pas d'action propre. Par ailleurs, l'ultrafiltrat du sérum de rat provoque une baisse d'activité mitogénique du milieu de base, donc il est inhibiteur.

Ces différents résultats laissent supposer que des sérums d'animaux contiennent des peptides identiques (ou à activité équivalente) à ceux trouvés dans le sérum humain.

II - MATERIEL ET METHODES

II - 1. Préparation des échantillons à tester.

Le sang humain provient d'un pool de 100 donneurs mâles en bonne santé (volontaires) âgés de 20 à 30 ans. Il nous a été fourni par l'établissement de Transfusion Sanguine de Lorraine (directeur, Professeur Janot). Les prélèvements effectués sur des tubes secs ont été centrifugés pendant 10 min. à 1 000 g, dans un premier temps ils ont été pré-filtrés pour enlever les fragments de fibrine et ont subi ensuite deux filtrations à 0,8 et 0,22 μm .

Les sangs d'animaux ont été prélevés à l'abattoir de Mirecourt. Le sang de cheval provient d'animaux âgés d'environ 4 ans, celui de boeuf d'animaux de 2 ans, de porc et de mouton d'animaux âgés de 6 à 8 mois. Les prélèvements, non héparinés, sont également centrifugés et filtrés comme précédemment. Le sang de lapin est prélevé à l'oreille, celui des souris et rat par cardiocentèse.

Les sérums de veau foetal a été acheté chez Boehringer (Mannheim, Allemagne). Les sérums de lapins (animaux âgés de 6 mois), rats et souris (âgés d'environ 2 mois) ont été prélevés chez des animaux élevés au laboratoire.

Les sérums sont ensuite ultrafiltrés à froid (+ 4° C) sous pression d'azote de 3 bars, dans une cellule Amicon (modèle 402) au travers d'une membrane (PTAC membrane Millipore Bedford MA-USA) à seuil de coupure 1 000 Da. L'ultrafiltration est arrêtée quand les volumes du rétentat et de l'ultrafiltrat sont respectivement 1/3 et 2/3 du volume initial. L'ultrafiltrat ainsi obtenu peut être utilisé tel quel ou réparti en aliquotes congelés à - 80° C, il peut être aussi lyophilisé pour être conservé ou pour subir les étapes de purification.

II - 2. Culture cellulaire.

II-2.1. Matériel utilisé.

Les cultures sont effectuées dans des pièces traitées au préalable aux rayons ultraviolets et sous des hottes à flux laminaire horizontal (UF A60 Belaure flow

laboratories "Class 100" horizontal). Le matériel de culture cellulaire est stérile, il est soit à usage unique, soit autoclavé 20 min. à 121° C avant chaque utilisation. Les cellules sont cultivées dans une étuve Jouan réglée à 37° C, dans une atmosphère à 5 % de CO₂ et 95 % d'air, 95 % d'humidité. Les cultures sont observées chaque jour au microscope (Nikon).

II-2.2. Les lignées cellulaires.

Les expériences sont faites sur des fibroblastes. Ce sont des cellules adhérentes qui proviennent du tissu conjonctif et dont l'aspect est fusiforme ou étoilé. L'inhibition de contact qui astreint les fibroblastes en culture à ne former qu'une monocouche cellulaire est une caractéristique des lignées fibroblastiques normales. S'il y a perte de ce caractère, cela implique qu'il y a eu transformation.

Nous avons utilisé :

- des fibroblastes de cartilages pelviens d'embryons de poulets de 11 jours (FEP)
- des fibroblastes humains transformés (European collection of animal cultures). Cette lignée a une durée de vie illimitée, elle a reçu une plasmide pSV3.gtp exprimant l'antigène T du virus SV40.
- 3T6 fibroblastes transformés d'embryons de souris swiss.

Les résultats de l'activité mitogénique des peptides de synthèse ont été confirmés sur des hybridomes et sur des cellules MCF7.

- Mark 3. Lignée cellulaire sécrétant un anticorps monoclonal IgG1 antichaîne Kappa d'immunoglobuline de rat, aimablement fournie par le Professeur Bazin (Université de Bruxelles).

- MCF7. Cellules humaines issues de métastase de cancer du sein. Elles ont un temps de doublement d'environ 36 h, temps plus long que pour les autres cellules employées dans nos expérimentations (24 h).

II-2.3. Conditions de culture.

Les besoins des cellules en culture sont couverts par les milieux de culture qui ont pour but de reproduire aussi fidèlement que possible *in vitro*, les conditions d'environnement que les cellules trouvent *in vivo*.

In vitro, nous avons utilisé un milieu de culture complet composé :

- d'un milieu de base satisfaisant les besoins élémentaires des cellules en nutriments,
- d'une série de suppléments qui rendent possible la croissance des cellules dans le milieu de base.

II-2.3.1. Milieu de culture de fibroblastes et d'hybridomes.

Nous avons utilisé le milieu MEM (Gibco) enrichi de sels de Earle et supplémenté avec 2 mM de L-glutamine, 1 mM d'acides aminés non essentiels (Gibco), 100 UI/ml de pénicilline et 80 µg/ml de streptomycine. Pour assurer la multiplication, la prolifération et l'expression, il faut apporter des facteurs mitogènes. Du sérum de veau fœtal (Jacques Boy, Reims, France) est donc ajouté au milieu MEM à raison de 10 % (v/v). Au moment de l'emploi, le sérum de veau conservé à -20° C est décongelé puis porté à 56° C pendant 45 min. pour inactiver certains inhibiteurs potentiels de croissance.

II-2.3.2. Milieu de culture des cellules MCF7.

Nous avons utilisé le milieu RPMI 164 (Gibco) sans L-Glutamine et sans rouge de phénol. Ce milieu est supplémenté avec 2 mM de L-Glutamine. Comme pour les fibroblastes et hybridomes, le sérum de veau fœtal est ajouté à 10 % (v/v) au milieu RPMI.

II-2.4. Quelques techniques de base en culture cellulaire

II-2.4.1. Culture et entretien des fibroblastes.

Repiquage des cellules. Les fibroblastes sont cultivés dans des flacons en plastique à bouchon filtrant (NUNC, référence 00178891 A et 00136196 B), de 25 et 80 cm² à 37° C, dans une atmosphère de 5 % de CO₂, 95 % d'air. Lorsqu'ils sont à confluence, c'est-à-dire lorsqu'ils forment un tapis cellulaire et que l'inhibition de contact les empêche de proliférer davantage, nous procédons à un repiquage (passage) qui permet d'augmenter la surface de support disponible pour chaque cellule. Cela consiste à décoller les cellules du fond de la boîte par une méthode enzymatique à la trypsine. Pour une boîte de 80 cm², on opère de la façon suivante :

- Eliminer le surnageant, ajouter 10 ml de trypsine (Boehringer) à 0,25 % après dilution dans du tampon salin phosphate (PBS) sans Ca²⁺ ni Mg²⁺,
- Placer la boîte à l'étuve thermostatée à 37° C pendant 5 min. pour permettre à la trypsine d'agir,
- Ajouter 1 ml de SVF afin de stopper l'action de la trypsine, puis centrifuger la suspension cellulaire (5 min. à 800 g),
- Ajouter au culot 40 ml de milieu MEM contenant 10 % de SVF, bien homogénéiser par aspiration et refoulement.
- Transférer les 40 ml de la suspension cellulaire dans deux nouvelles boîtes de 80 cm² puis les mettre en culture.

Renouvellement du milieu. Dans le cas où les cellules en cours de culture ne tapissent pas entièrement la boîte mais si le milieu est épuisé (coloration jaune), il suffit alors de l'éliminer et de le remplacer par un nouveau milieu complet. Un repiquage ou un renouvellement se fait tous les 3 jours de culture au maximum.

II-2.4.2. Culture et entretien des MCF7.

Repiquage des cellules. Comme pour les fibroblastes, les MCF7 sont cultivés dans des boîtes de 25 et 80 cm² à 37° C, dans une atmosphère de 5 % de CO₂, 95 % d'air. Une fois à confluence, le repiquage s'effectue de la façon suivante :

- Elimination de surnageant et ajout de 10 ml de trypsine à 0,25 % diluée dans du tampon salin phosphate (PBS) sans Ca²⁺ ni Mg²⁺,
- Après quelques minutes de contact lorsque les cellules se décollent, ajouter 10 ml de milieu de culture et 10 % de SVF pour bloquer l'action de la trypsine, puis centrifuger la suspension cellulaire (5 min. à 800 g),
- Eliminer le surnageant et reprendre le culot dans RPMI + 10 % de SVF.
- Faire un comptage cellulaire avec la cellule de Thoma et ajouter le RPMI + 10 % de SVF pour ensemercer à une concentration de 10⁴ cellules/ml.

Renouvellement de milieu. Après quelques jours de culture si les cellules ne tapissent pas entièrement la boîte mais si le milieu est épuisé, on l'élimine et le remplace par un nouveau milieu complet.

Un repiquage ou un renouvellement se fait tous les 7 jours.

II-2.4.3. Congélation et décongélation.

La congélation doit être effectuée dans des conditions bien particulières afin de ne pas détruire la structure cellulaire des cellules. Les cultures trypsinées sont centrifugées et le culot cellulaire est repris avec du milieu de congélation (Gibco, référence 11101011) contenant du SVF (80 %) et du diméthyl-sulfoxyde (DMSO 20 %) comme cryoprotecteur. La suspension cellulaire (10⁷ cellules/ml à 5.10⁶ cellules/ml) est répartie dans des cryotubes (Sarstedt, référence 72694006), placés dans une boîte spéciale Cryofreeze (Polylabo, référence 22470) contenant de l'isopropanol. La boîte est mise dans un congélateur (-20° C) pendant 24 - 48 h. L'isopropanol va servir de régulateur d'abaissement de température (1° C/minute). La boîte est ensuite placée à - 80° C pendant quelques heures puis les

cryotubes sont transférés à - 196° C dans un container d'azote liquide où ils peuvent être conservés durant plusieurs années.

La décongélation doit être effectuée le plus rapidement possible car le DMSO devient cytotoxique à température ambiante. Les cryotubes conservés dans l'azote liquide ou à - 80° C sont plongés immédiatement dans un bain-marie à 37° C jusqu'à complète décongélation. Les traces de DMSO sont éliminées par deux lavages successifs avec 20 ml de milieu MEM supplémenté comme précédemment. Après une nouvelle centrifugation, le culot cellulaire est récupéré et resuspendu dans 20 ml de milieu de culture MEM contenant 20 % de SVF et il est utilisé pour ensemercer une boîte de 80 cm² placée à l'étuve à 37° C, 5 % de CO₂, 95 % d'air, 95 % d'humidité. Pour les cellules MCF7, on utilise du RPMI.

N.B. : Les fibroblastes d'embryons de poulets, qui sont des cultures primaires, ne sont pas congelés car la culture ne repart pas après décongélation.

II-2.4.4. Numération cellulaire.

Pour chaque culture, nous effectuons des numérations cellulaires à l'hématimètre de Thoma, ce qui permet de déterminer la concentration cellulaire dans la suspension à partir de laquelle les dilutions adéquates seront réalisées pour chaque test.

II - 3. Dosage d'activité mitogénique.

II-3.1. Isolement des fibroblastes d'embryons de poulets.

La réplication de DNA, qui peut être considérée comme un reflet de la multiplication cellulaire, est mesurée par l'incorporation de [³H]-thymidine. Elle est mesurée sur des fibroblastes d'embryons de poulets qui sont isolés de la façon suivante :

- les cartilages pelviens d'embryons de poulets sont déposés dans un tube conique de 50 ml contenant de la trypsine (0,25 %) et de la collagénase (0,2 mg/ml) dans du PBS.

- Un volume égal de MEM est ajouté à cette solution d'enzymes.

- Les cartilages sont ensuite incubés à 37° C sous agitation pendant 2 h puis le tube contenant les fibroblastes et les tissus cartilagineux est laissé au repos pendant 30 secondes. Les morceaux de cartilage digérés tombent au fond du tube.

Le surnageant contenant les fibroblastes est centrifugé 10 min. à 900 g. Le culot cellulaire obtenu est resuspendu dans du MEM / Hepses pH 7,2 supplémenté par 5 % de glutamine (200 mM) ; 5 % d'acides aminés non essentiels ; 100 µg/ml de streptomycine ; 100 U/ml de pénicilline et 10 % de sérum de veau fœtal chauffé préalablement à 56° C pendant 45 min. La densité cellulaire est déterminée en utilisant l'hématimètre de Thoma. Dix millilitres de la suspension cellulaire, contenant environ 4×10^4 cellules/ml, sont distribués dans des boîtes stériles de 80 cm². Les boîtes de culture sont placées dans une étuve à atmosphère humide avec 5 % de CO₂, 95 % d'air et à 37° C. Les fibroblastes d'embryons de poulets sont maintenus 3 jours dans le même milieu. Si la densité cellulaire est faible le milieu contenant 10 % de SVF est renouvelé. Si les fibroblastes sont à confluence, ils sont trypsinés comme précédemment décrit et subissent un premier passage.

II-3.2. Mesure de l'activité mitogénique.

Pour réaliser les tests d'activité mitogénique, les fibroblastes d'embryons de poulets sont utilisés entre le 4^{ème} et le 9^{ème} passages, avant ils sont trop jeunes, après ils commencent à être sénescents. Les fibroblastes, détachés et dissociés, sont répartis dans des plaques de 96 puits (les fibroblastes humains transformés et les cellules MCF7 sont également répartis dans des plaques de 96 puits). Un volume de 200 µl de MEM, supplémenté avec 10 % de SVF, contenant 4×10^4 cellules/ml est distribué dans chaque puits. Les plaques sont laissées 24 h à 37° C

dans une atmosphère à 5 % de CO₂, 95 % d'air pour que les fibroblastes se fixent et se divisent. S'ils ne sont pas assez nombreux, l'incubation peut être prolongée jusqu'à 36 h. Les puits de chaque plaque sont ensuite lavés deux fois avec du milieu seul pour éliminer le SVF puis les fibroblastes sont incubés en présence de 200 µl de milieu sans SVF pendant 48 h. Au cours de cette étape, la privation de SVF permet la synchronisation des cellules en phase G₀/G₁ (Fig. 16). Toutes les cellules ayant moins de 4 h (mesuré comme étant le temps écoulé après la dernière mitose) au moment du changement du milieu, n'atteignent pas la mitose suivante en absence de sérum. Au contraire, toutes celles qui ont dépassé ce stade terminent leur cycle mitotique, sont arrêtées à la nouvelle phase G₁ et entrent en phase G₀ à la suite de l'épuisement du milieu en sérum.

Pour démarrer le test, les puits sont à nouveau lavés deux fois avec du milieu seul. Les produits à tester dont les peptides, IGF1 et IGF2 (IGF1 et IGF2 recombinants humains, Bachem) sont solubilisés dans du milieu sans SVF (les concentrations finales sont indiquées dans les résultats) et distribués dans chaque puits sous un volume de 200 µl, pour chaque essai on fait 6 puits. Les plaques sont alors placées à l'étuve pendant 24 heures. Après ce temps, 50 µl d'une solution comportant 45 µl de milieu seul et 5 µl d'une solution de [³H]-thymidine (1,59 TBq mmol, Amersham) à une concentration de 0,037 MBq/puits (1 µci/puits) sont ajoutés dans chaque puits. L'incubation se poursuit pendant 6 heures à 37° C.

Deux lavages sont effectués avec du milieu seul pour éliminer la [³H]-thymidine non incorporée. Dans chaque puits 100 µl de trypsine à 0,25 % sont ajoutés afin de faciliter la récupération des fibroblastes. Le tapis cellulaire est alors décollé et les fibroblastes sont récupérés sur des fibres de verre (Mash II) avec un récupérateur semi-automatique. Des lavages (n=10) sont réalisés avec du NaCl à 0,15 M pour récupérer la totalité des cellules.

Après avoir réparti les filtres dans des fioles de comptage, 1 ml de liquide scintillant (Ultimagold, Packard) est ajouté. La radioactivité est alors comptée dans un compteur β à scintillation liquide (Packard 2000 A). Les résultats sont

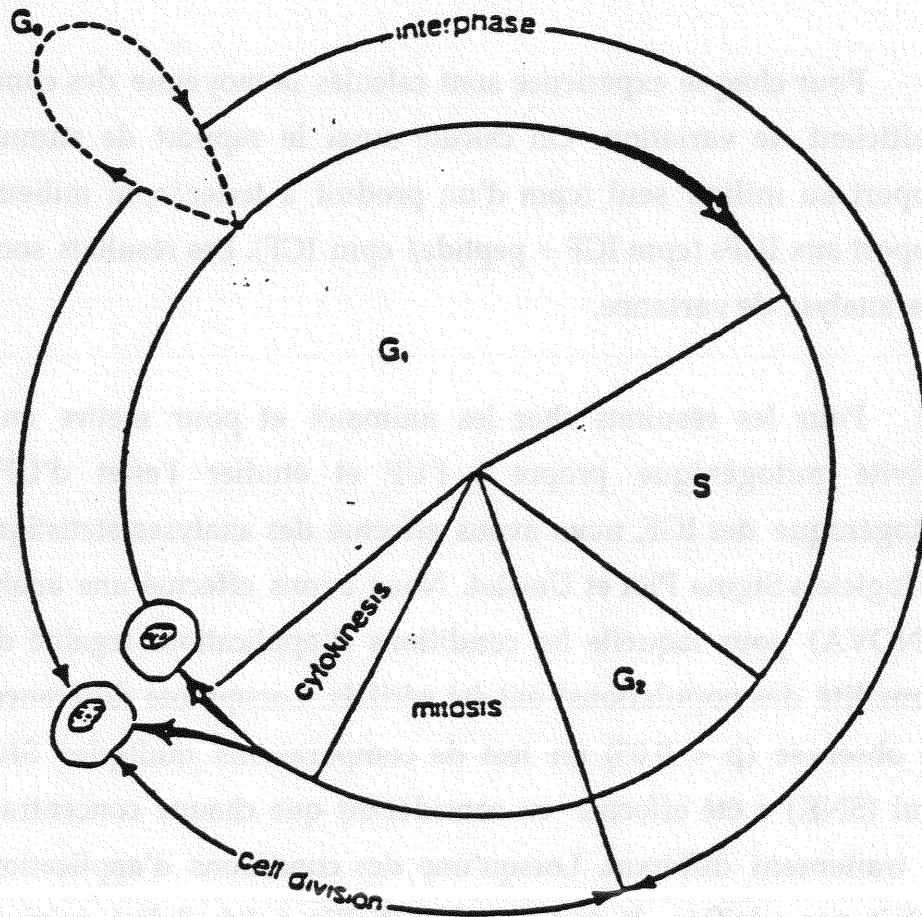


Fig. 16 : Représentation schématique du cycle cellulaire. Les cellules sont synchronisées en phase G₀/G₁ par élimination du sérum de veau fœtal dans le milieu de culture. L'incorporation de [³H]-thymidine a lieu pendant la phase de réplication de l'ADN (phase S).

exprimés en cpm/ nombre de cellules. La moyenne écart-type et le coefficient de variation de 8 réplifications sont calculés. Les résultats sont aussi exprimés en rapport de stimulation c'est-à-dire cpm essai/cpm contrôle.

II-3.3. Etude statistique.

Pour chaque expérience sont calculés la moyenne des cpm, l'écart-type, le coefficient de variation. On calcule aussi le rapport de stimulation soit par rapport au milieu seul (cpm d'un produit à tester/cpm milieu seul) soit par rapport aux IGFs (cpm IGF + peptide/ cpm IGF). Les résultats sont comparés par une analyse de variance.

Pour les résultats chez les animaux et pour mettre en évidence une activité mitogénique propre à l'UF et étudier l'effet d'UF sur l'activité mitogénique des IGF, nous avons effectué des analyses statistiques en utilisant les logiciels Sigma Plot et Unistat. Nous avons effectué une analyse de variance (ANOVA) pour laquelle les conditions d'applications (égalité des variances et normalité des populations) ont été vérifiées. Lorsqu'une différence significative a été observée ($p < 0,05$) un test de comparaisons multiples Student-Newman Keul (SNK) a été effectué en considérant que chaque concentration représente un traitement différent. Lorsqu'une des conditions d'application de l'ANOVA n'était pas vérifiée, le test Kruskal-Wallis a été réalisé suivi du Dunn's test lorsque la différence était significative.

Cette analyse statistique a été effectuée pour chacune des espèces animales dont provenait l'UF. Les différentes concentrations d'UF ont été comparées entre elles ainsi que les différentes associations de UF avec IGF1 et IGF2.

Pour étudier l'influence des peptides sur l'activité mitogénique d'IGF1 et IGF2, une analyse de variance (ANOVA) à deux facteurs a été effectuée (logiciel BMDP statistical Software). Ce test effectué pour les différentes concentrations de chaque peptide compare l'activité mitogénique d'association d'IGF + peptide avec celle du peptide seul et IGF seul.

Les valeurs de p obtenu montre l'existence ou pas d'interactions entre les peptides et IGF.

II-3.4. Emploi d'inhibiteur de la PKC.

Pour chercher à savoir si l'activité mitogénique observée pouvait passer par l'activation de la PKC (protéine kinase C), nous avons utilisé le bisindolylmaléimide (Boehringer, Mannheim) à des concentrations croissantes dans nos cultures. Cette molécule est un inhibiteur spécifique des 4 isoformes de la PKC (α , β I, β II et γ) qui sont prédominantes dans les fibroblastes.

Le bisindolylmaléimide est reconstitué en ajoutant 960 μ l de DMSO à 2 mg de produit en poudre. Cette solution mère a une concentration de 5 mmoles/l. Elle est aliquotée en fractions de 50 μ l puis conservée à l'abri de la lumière à - 20° C jusqu'à utilisation. Nous avons testé des concentrations de 0,1 à 2 μ moles/l de l'inhibition en présence de IGF1 (15 ng/ml), IGF2 (50 ng/ml) et HWESAS (6 ng/ml). Le test biologique utilisé est la mesure de l'activité mitogénique sur des FEP.

II-4. Recherche et quantification par tests immunologiques des FCPPM.

Des anticorps monoclonaux ont été préparés contre le peptide HWESAS (Capiaumont *et al.*, 2000) et ont été utilisés pour la recherche de ce peptide dans des sérums d'animaux par test ELISA.

Le test est réalisé avec des plaques Costar (Réf. 002505) prétraitées par du N oxysuccimide qui diminue l'absorption passive des biomolécules et permet la fixation de molécules comme les acides aminés ou les peptides. Le nombre des sites actifs est de l'ordre de 10^{14} /cm². Ces plaques permettent de fixer directement les peptides natifs.

II-4.1. Fixation de l'antigène sur les microplaques (coating).

L'antigène sera soit :

- du peptide HWESAS à différentes concentrations 4 ; 2 ; 1 ; 0,5 ; 0,25 et 0,125 μg dans du tampon $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{—NaHCO}_2$ pH 9 pour établir la gamme d'étalonnage.

- l'ultrafiltrat de sérums d'animaux.

Les sérums d'animaux sont ultrafiltrés avec des centricons 3 (Amicon, Beverley, USA) seuil de coupure 3 000.

- du PBS pour le témoin négatif.

L'antigène déposé dans un volume de 100 μl /puits est incubé une nuit à 4° C. La plaque est lavée 3 fois avec du PBS pH 7,3 afin d'éliminer l'antigène non fixé.

II-4.2. Saturation des sites restés libres.

100 μl de BSA à 2 % dans du PBS sont déposés dans les puits et laissés en contact 1 h à température ambiante puis éliminés par retournement de la plaque.

II-4.3. Réaction antigène-anticorps.

100 μl d'anticorps monoclonal anti-HWESAS (16,7 $\mu\text{g}/\text{ml}$) sont déposés dans les puits et laissés en contact 2 h à température ambiante puis lavés 5 fois par du PBS-Tween 1 %.

100 μl d'immunoglobulines de chèvre anti-immunoglobulines de souris, marquées à la peroxydase (Immunotech) et diluées au 1/5000^{ème} dans du PBS sont déposés et incubés 1 h à température ambiante. Les microplaques sont alors lavées 5 fois avec du PBS-Tween et 1 fois avec un tampon acétate de sodium 0,23 M/ acide acétique 0,35 M, pH 6.

II-4.4. Révélation du complexe antigène-anticorps.

1 mg de TMB (3, 5, 3', 5', tétraméthylbenzidine), substrat de la peroxydase, est dilué dans 100 μ l de DMSO. Cette solution est ensuite rediluée dans 10 ml de tampon pH6 et 4 μ l de H₂O₂ à 110 volumes sont ajoutés.

100 μ l de ce mélange sont alors déposés dans les puits pendant 10 min. puis la réaction est bloquée par un ajout de 25 μ l de H₂SO₄ 9N.

La lecture des absorbances se fait sur un lecteur de microplaques (Molecular Devices) à 450 nm. La limite de détection de cette méthode est de 0,2 mg/l.

II-5. Transports membranaires.

II-5.1. Transport du glucose.

L'augmentation du transport transmembranaire du glucose est une modification métabolique précoce observée pour la plupart des facteurs de croissance. Nous avons donc voulu vérifier si les peptides de petits poids moléculaire agissent à ce niveau et modifient l'action des IGF1 et des IGF2.

Le glucose entre dans la cellule par l'intermédiaire de transporteurs membranaires. Pour mesurer l'entrée du glucose, un analogue radiomarqué, non métabolisable, est utilisé : le 2-déoxy³H]-glucose (2-déoxy³H]-G). Nous avons donc utilisé le protocole suivant.

II-5.1.1. Préparation des cellules.

Après trypsination, les fibroblastes d'embryons de poulets sont ensemencés dans des plaques de 6 puits (Falcon) à raison de 1 ml contenant 4 x 10⁴ cellules/ml. Après 24 h d'incubation à l'étuve à 5 % de CO₂ et à 37° C, les

cellules sont privées de SVF pendant 48 h comme pour le test d'incorporation de thymidine tritiée. Pendant les dernières 24 h, le milieu MEM est enrichi en glucose froid à la concentration finale de 25 mM (Standaert, 1984).

II-5.1.2. Mode opératoire.

Les cellules synchronisées en phase G₀/G₁ sont lavées 3 fois avec du PBS (Ca²⁺, Mg²⁺) (Gibco) à 37° C pour éliminer le glucose froid. La mesure du transport du glucose est réalisée selon la technique de Cynober *et al.* (1985). Les produits à tester sont ajoutés à des concentrations qui seront précisées dans les résultats ; les plaques sont incubées 1 h à 37° C dans du PBS (Ca²⁺, Mg²⁺).

Les produits sont ensuite éliminés par deux lavages avec du PBS (Ca²⁺, Mg²⁺) à 37° C. 1 ml de la solution contenant 0,037 MBq/ml de 2-déoxy[³H]-glucose (352 GBq/mmol, Amersham) est alors déposée dans les puits dans du PBS (Ca²⁺, Mg²⁺) à 37° C. Les plaques sont incubées 10 min. à 37° C et la réaction est stoppée en plaçant les plaques sur un lit de glace et la solution marquée contenue dans chaque puits est aspirée, 3 lavages sont effectués avec du PBS (Ca²⁺, Mg²⁺) glacé pour éliminer la radioactivité non incorporée.

A ce stade les cellules peuvent être mises à sécher pendant toute la nuit et conservées à -20° C pendant 48 h (Inman et Colowick, 1987). Cependant, d'une façon générale, nous les avons préparées immédiatement pour le comptage. 1 ml de trypsine à 2,5 % est distribué dans chaque puits. Les cellules décollées sont réparties dans des fioles de comptage et 500 µl de solvène sont ajoutés. Les fioles sont incubées une nuit à 37° C. 15 ml de liquide scintillant (Pico 40, Packard) sont ajoutés et la radioactivité est comptée dans un compteur à scintillation, après incubation des fioles 1 h à l'obscurité à 4° C.

II-5.2. Transport des acides aminés.

L'augmentation de l'entrée des acides aminés est aussi un mécanisme précoce de l'action des mitogènes. Ce test permettra de déterminer si les FCPPM influencent ce mécanisme. Pour cela, un acide aminé non métabolisable dans la cellule est utilisé : l'acide [1-¹⁴C]-alpha-amino-isobutyrique (AIB*). Nous avons établi le protocole suivant.

II-5.2.1. Préparation des cellules.

Comme pour le test d'entrée du 2-déoxy[³H]-glucose, les FEP sont cultivés dans des plaques de 6 puits à raison de 1 ml à 4×10^4 cellules/ml pendant 36 h. Les cellules sont alors privées de SVF durant 48 h.

I-5.2.2. Mode opératoire.

Toutes les fractions à tester ainsi que la solution marquée sont préparées dans du PBS (Ca^{2+} , Mg^{2+}).

Juste avant le test, les cellules synchronisées en phase G₀/G₁ sont lavées 3 fois avec du PBS à 37° C. La mesure de l'entrée d'AIB* est réalisée selon la technique décrite par Cynober *et al.* (1985). Les fractions à tester sont réparties dans les puits et sont incubées 120 min. à 37° C.

Après cette 1^{ère} incubation, les cellules sont lavées 3 fois avec du PBS et 1 ml de solution marquée contenant 0,0047 MBq/ml d'acide [1-¹⁴C]-alpha-amino-iso-butyrique (2,15 GBq/mmol, Amersham) est ajouté dans chaque puits. Les plaques sont incubées 10 min. à 37° C.

A la fin de cette seconde incubation, les plaques sont placées sur la glace et les cellules sont lavées 3 fois avec du PBS glacé pour stopper la réaction et éliminer la radioactivité non incorporée dans les cellules.

Les FEP sont décollés et dissous comme dans le test au 2-déoxy[³H]-glucose, et la radioactivité est comptée dans un compteur à scintillation

II-6. Etude des protéines.

Nous avons étudié l'effet des petits peptides seuls ou en combinaison avec les IGFs sur la synthèse des protéines dans les cellules. Deux types d'expériences ont été faites. Nous avons mesuré à l'aide d'acides aminés marqués la néosynthèse des protéines après 24 h de contact avec les produits à tester. Dans d'autres expériences, nous avons évalué la concentration en protéines totales en fonction du temps et en fonction des produits à tester.

II-6.1. Synthèse des protéines.

Pour suivre les modifications de la synthèse des protéines sous l'action des facteurs de croissance, nous avons utilisé deux acides aminés marqués: la [³⁵S]-cystéine et la [¹⁴C]-proline aux concentrations données dans le tableau IV. La cystéine marque l'ensemble des protéines, la proline est abondante dans le collagène. On sait que les IGFs stimulent particulièrement la synthèse de cette protéine (Froesch *et al.*, 1985).

Traceurs	Concentration	Activité Spécifique
		Amersham
[¹⁴ C]-proline	1,85 MBq/ml	15,7 GBq/mmol
[³⁵ S]-cystéine	3,7 MBq/ml	3,7 GBq/mmol

Tableau IV: Traceurs utilisés pour suivre la synthèse des protéines dans les fibroblastes.

Dans ces expériences, nous avons utilisé des fibroblastes d'embryons de poulets, les cellules, entre le 5^{ème} et le 9^{ème} passage, sont réparties dans des boîtes de 25 cm² à raison de 10⁶ cellules par boîte, dans un volume de 10 ml de MEM, supplémenté par 10 % SVF. Les boîtes sont placées à l'étuve pendant 24 h pour que les fibroblastes se fixent et prolifèrent. Le milieu est éliminé, le tapis

cellulaire est lavé une fois avec 10 ml de MEM seul. Les cellules sont remises à incuber 20 - 24 h à 37° C dans 10 ml de MEM seul avec les échantillons et les traceurs. A la fin de l'incubation, les cellules sont décollées du fond de la boîte par 10 ml de trypsine 0,25 % (Boehringer), diluées dans du PBS sans Ca^{2+} ni Mg^{2+} puis centrifugées (5 min., 800 g). Le culot cellulaire est récupéré puis repris dans 1 ml de tampon de lyse composé comme suit :

Tampon de lyse

- Tris 50 mM pH 7,4
- Pmsf 1 mM
- EDTA 1 mM

Le mélange est vortexé, laissé à 4° C pendant 30 min. puis centrifugé (5 min., 800 g). Le surnageant est traité par 1 ml de TCA 5 % pendant 30 min. à 4° C puis centrifugé (15 min., 2 500 g). Le culot est redissous dans 100 μ l de désoxycholate de sodium 0,4 % / NaOH 0,1 M et la radioactivité est comptée.

II-6.2. Cinétique de la synthèse protéique.

Pour cette expérience, les cellules sont cultivées comme décrit au paragraphe II-6.1. Les cellules sont remises à incuber pour des temps variant de 2 à 24 h avec les produits à tester. Les cellules sont récupérées, lysées, les protéines sont précipitées par du TCA 5 %.

Le culot protéique est redissous dans 100 μ l de désoxycholate de sodium 0,4 % / NaOH 0,1 M et les protéines sont quantifiées par un dosage colorimétrique en utilisant le kit BCA (Bicinchoninic Acid Proteins assay, kit BCA, Sigma USA) et une gamme étalon de sérum albumine bovine (BSA, Sigma). L'absorbance est lue à 562 nm (spectrophotomètre, Beckman).

Les résultats calculés par rapport à la courbe étalon (Fig.17) sont exprimés en μ g/ml

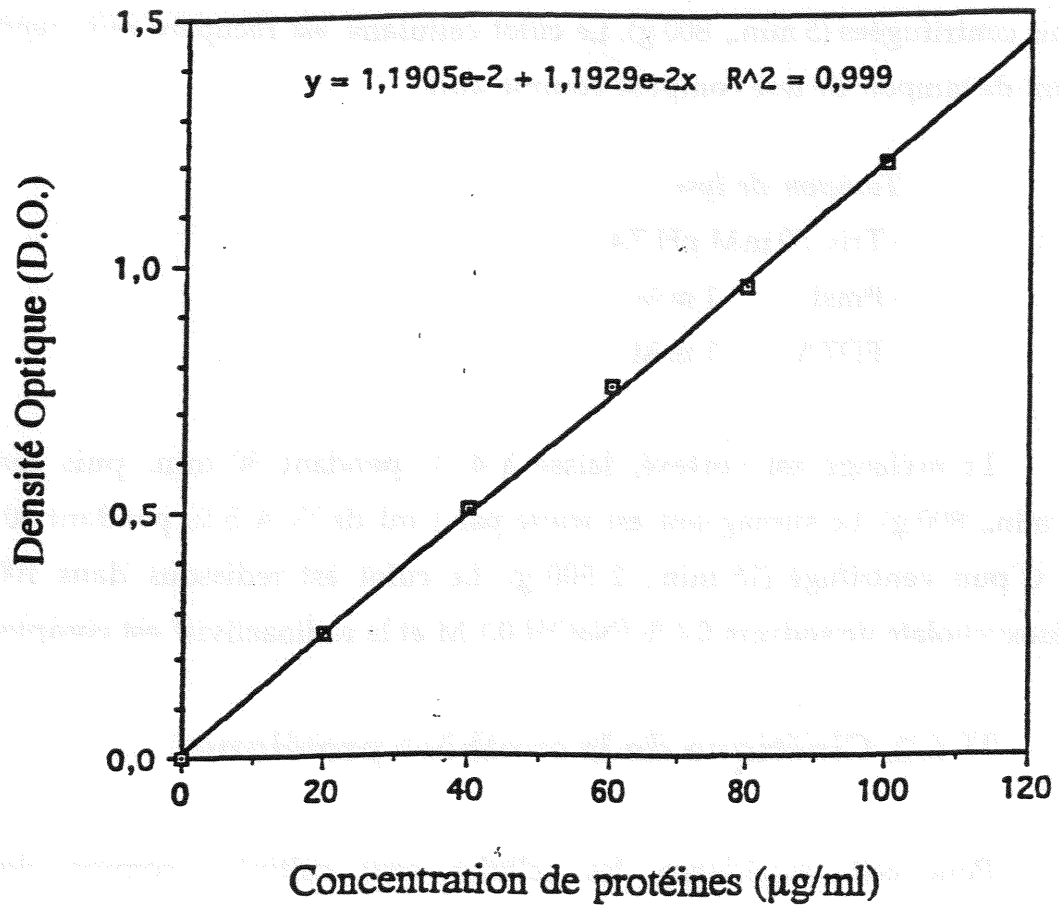


Fig. 17 : Dosage des protéines totales. Courbe étalon préparée à partir d'une solution d'albumine bovine 1 mg/ml.

II-6.3. Phosphorylation des protéines.

La transduction du signal facteur de croissance passe par l'intermédiaire de phosphorylation en cascade de protéines. Le but de ces expériences est de tester si effectivement, sous l'action des IGF1 et IGF2 et des facteurs peptidiques, il y a une augmentation mesurable de la phosphorylation des protéines, si au cours du temps cette phosphorylation évolue et si l'autoradiographie permet de mettre en évidence la phosphorylation de protéines particulières.

Les fibroblastes d'embryons de poulets sont cultivés comme décrit au paragraphe II-6.1. Après 24 h de privation en SVF les cellules sont remises à incuber avec les produits à tester et 0,37 MBq/ml de [³²P]-ATP (111 TBq/mmol, ISOTOPCHIM) et 100 µl d'ATP froid à 30 mg/ml.

La réaction est arrêtée par l'addition de 200 µl d'ATP froid 0,5 M et d'acide formique 0,1 M. Les cellules sont lysées par le tampon de lyse précédemment décrit, les protéines sont précipitées par TCA 5 %, le culot protéique est repris par le désoxycholate de sodium 0,4 %/NaOH 0,1 M (paragraphe II-6.1.) et la radioactivité est comptée sur une partie aliquote.

II-6.4. Electrophorèse SDS-PAGE.

Une partie aliquote des protéines obtenues précédemment sera soumise à une électrophorèse et à une autoradiographie.

II-6.4.1. Préparation des gels.

Les gels utilisés pour l'électrophorèse sont des gels verticaux de dimension 14 x 18 cm. Ils sont préparés le jour même de l'expérience.

II-6.4.1.1. Les solutions.

> Solution mère d'acrylamide-Bis acrylamide

- Acrylamide (BioRad) 30 g
- Bisacrylamide (BioRad) 0,8 g
- Eau distillée qsp 100 ml

La solution est filtrée sur un filtre 0,22 μ m (Millex GS, Millipore) puis conservée à température ambiante.

> Solution SDS à 20 %

- SDS (Aldrich) 10 g
- Eau distillées qsp 50 ml

La solution est fractionnée (400 μ l/ tube) puis conservée à -20° C.

> Solutions tampon

- Tris-HCl 1M pH8,8
- Tris-HCl 1 M pH 6,8

> Tampon de migration électrophorétique

- Tris (Prolabo) 3 g
- Glycine (Prolabo) 14,4 g
- SDS (Aldrich) 1 g
- Eau distillée qsp 1000 ml

> Solution de persulfate d'ammonium

- Persulfate (BioRad) 30 mg
- Eau distillée 1 ml

Cette solution de persulfate d'ammonium est préparée extemporanément.

II-6.4.1.2. Les gels.

> Le gel inférieur à 20 % d'acrylamide

- Acrylamide-Bis acrylamide 67 ml
- Tampon Tris-HCl pH 8.8 1 ml
- Eau distillée 2,3 ml
- Temed 10 μ l
- Persulfate 300 μ l

> Le gel de séparation à 13 % d'acrylamide

- Acrylamide-Bis 11,25 ml
- Tampon Tris-HCl pH 8,8 13,05 ml
- Eau distillée 5,55 ml

Dégazer

- SDS 20 % 150 μ l
- Temed 37,5 μ l
- Persulfate 300 μ l

> Le gel de concentration à 5 % d'acrylamide

- Acrylamide-Bis acrylamide 2,5 ml
- Tampon Tris-HCl pH 6.8 1,8 ml
- Eau distillée 10,4 ml

Dégazer

- SDS 20 % 75 μ l
- Temed 30 μ l
- Persulfate 150 μ l

II-6.4.2. Mode opératoire.

Deux plaques de verre 14 x 18 cm sont lavées avec de l'alcool, essuyées, puis leurs bords sont graissés pour maintenir les joints (les intercalaires) en place. Le système ainsi formé est maintenu avec de grosses pinces. Le gel inférieur forme le bouchon du système après polymérisation de la solution correspondante. Le dépôt des échantillons et des marqueurs de taille se fait dans des puits formés à l'aide d'un peigne, dans la couche supérieure (couche de 5 %).

Avant le dépôt des échantillons, une pré-électrophorèse est effectuée pendant 1 h à 100 V pour équilibrer le gel avec le tampon d'électrophorèse et pour éliminer les monomères d'acrylamide et le persulfate qui risqueraient de précipiter les protéines. Les échantillons (10 μ l) sont repris dans 0,125 M tris HCl pH 6,95 contenant 4 % SDS, 10 mM EDTA, 0,1 % DTT, 40 % glycérol et 0,01 % de bleu de bromophénol. Avant le dépôt dans le puits du gel, les échantillons sont placés 2 à 3 min. dans un bain-marie bouillant. Ceci favorise la dissociation des protéines en sous-unités sous l'action du SDS et du DTT. La vitesse de migration est contrôlée par la tension du courant passant entre les deux électrodes. La tension constante imposée est de 60 V, pendant une nuit. La masse molaire des différentes protéines d'un échantillon est déterminée en comparant leur migration à celle de protéines de référence. Les marqueurs de taille utilisés sont ceux du kit de calibration (electrophoresis calibration, Pharmacia), contenant :

- Phosphorylase β	94 kDa	Anhydrase carbonique	30 kDa
- Albumine	67 kDa	Soybean-Trypsin-Inhibitor	20,1 kDa
- Ovalbumine	43 kDa	α -lactalbumine	14,4 kDa

A la fin de la migration, le gel est découpé puis déposé dans un bac contenant la solution colorante :

> Solution colorante

- Bleu de Coomassie (R-250, MERCK)	0,2 g
- Méthanol (MERCK)	50 ml
- Acide acétique	70ml
- Eau distillée qsp	200 ml

La coloration dure 30 min. sous agitation douce. Le gel est ensuite décoloré dans une solution décolorante :

> Solution décolorante

- Méthanol	250 ml
- Acide acétique	100 ml
- Eau distillée qsp	1 litre

II-6.5. Autoradiographie.

L'autoradiographie permet de mettre en évidence des molécules protéiques néosynthétisées marquées soit à la [³⁵S]-cystéine soit à la [¹⁴C]-proline, sur un film sensible aux effets des radiations ionisantes. Pour visualiser l'image obtenue, il est nécessaire de mettre en contact l'émulsion photographique et le gel d'acrylamide pendant un temps relativement long et surtout d'utiliser de fortes doses de radioactivité. Après la décoloration, le gel est rincé à l'eau distillée puis déposé sur un papier Watmann 3M, couvert ensuite avec du plastique. Le séchage dure 2 h à 80 ° C dans un appareil de séchage (Gel Dryer Model 125, Sigma) puis il est mis en contact avec un film (KODAK BIOMAX Film) dans une cassette à double écran. L'exposition est maintenue à - 80 ° C pendant 2 semaines.

II-6.6. Recherche par immunoblot de la PKC.

Les protéines séparées par électrophorèse SDS-PAGE sont transférées sur une membrane de nitrocellulose puis la protéine recherchée est révélée par un anticorps spécifique. Un deuxième anticorps marqué est utilisé pour révéler le premier complexe antigène-anticorps.

II-6.6.1. Electrotransfert sur membrane de nitrocellulose.

Le transfert des protéines est effectué par le système « phast transfer » en milieu semi-sec « Semi dry electrophoresis transfer » dans un appareil de transfert (BioRad).

II-6.6.1.1. Réactifs.

> Solution rouge ponceau

- (p/v) dans l'acide trichloracétique 0.2 %

> Tampon de transfert

- Glycine 192 mM

- Tris 25 mM pH 8,3

- Méthanol 25 %

- Eau ultrapure qsq 1 l

II-6.6.1.2. Mode opératoire.

Après électrophorèse, le gel de polyacrylamide-SDS et la membrane de nitrocellulose (0,45 μ m, Amersham) sont équilibrés dans du tampon de transfert puis sont mis en sandwich entre deux feuilles de papier Whatman 3 mm imprégnées avec le même tampon. Le transfert se déroule pendant 30 min. sous

une tension de 20 V à température ambiante. Les protéines migrent du gel vers la membrane où elles vont se fixer. A la fin du transfert, la membrane est colorée avec la solution de rouge ponceau puis décolorée dans de l'eau distillée afin de vérifier l'efficacité du transfert.

II-6.6.2. Révélation de la PKC.

II-6.6.2.1. Réactifs.

> Tampon PBS sans calcium ni magnésium

- KH ₂ PO ₄	0,21 g
- NaCl	9 g
- Na ₂ HPO ₄	0,72 g
- Eau distillée qsq	1 l

> Solution de saturation

- Bloker (Biorad)	5 g
- Gélatine (Sigma)	2 ml
- PBS qsq	100 ml

> Solution A

- PBS-Tween 20	0,05 %
----------------	--------

> Solution d'anticorps 1

L'anticorps polyclonal anti-PKC α préparé chez le lapin (Sigma, Réf. P-4334) est conservé à - 20° C en fractions de 40 μ l. Il est dilué extemporanément au 1/6 000 dans la solution A.

> Solution d'anticorps 2

Anticorps anti IgG de lapin marqué à la peroxydase (Sigma, Réf. A 0545) dilué au 1/1 6 000 dans la solution A.

> Solution de substrat

10 ml de Tris 50 mM pH 7,6 contenant 6 mg de 3,3'-diaminobenzidine (DAB, Sigma) et 10 μ l de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2 Sigma).

II-6.6.2.2. Mode opératoire.

La membrane de nitrocellulose séchée, est incubée dans la solution de saturation pendant 4 h à température ambiante. Après 3 rinçages dans la solution A, la membrane est incubée dans la solution d'anticorps 1 pendant une nuit sous agitation à température ambiante. La feuille de nitrocellulose est ensuite lavée 3 fois dans la solution A puis placée dans la solution d'anticorps 2 pendant 2 h à 37° C. Après plusieurs lavages avec la solution A et un avec du PBS, la membrane est placée dans 10 ml de la solution de substrat de la peroxydase. Dans une chambre noire, le blot est développé pendant 30 min. à l'obscurité, à température ambiante sous agitation. La révélation est arrêtée par lavage avec la solution PBS-EDTA ; si la réaction est positive, on observe une tache colorée.

II-7. Cytométrie de flux.

Avec la technique de cytométrie en flux, nous avons étudié l'apoptose. Pour ces expériences, nous avons utilisé un cytomètre Epics Coulter C (Coultronics Margency, France) équipé d'un laser argon cohérent (Innova 905) avec une longueur d'onde d'excitation à 488 nm et de 200 W de puissance. La fluorescence verte émise par les sondes excitées est sélectionnée en utilisant un filtre « band pass » à 525 nm et les signaux électroniques sont convertis sur des histogrammes monoparamétriques de 256 canaux avec une échelle logarithmique monoparamétrique (LGFL). L'alignement optique du laser est

vérifié chaque jour et pour chaque mesure 25 000 cellules sont analysées. Des sondes différentes sont utilisées selon l'événement que l'on veut déterminer.

II-7.1. Apoptose.

L'apoptose est un processus actif au cours duquel une série d'événements biochimiques s'enclenchent qui conduisent à la mort programmée de la cellule. Ces événements sont accompagnés de modifications morphologiques de la cellule dont des modifications membranaires, la condensation de la chromatine, la fragmentation du DNA et la formation de vésicules apoptotiques liées à la membrane.

Le processus d'apoptose est régulé par des signaux induits par la présence ou l'absence de cytokines. Les IGFs protègent un certain nombre de cellules contre l'apoptose.

Pour mesurer ce phénomène en cytométrie de flux, différents marqueurs peuvent être employés :

- des marqueurs de la fragmentation du DNA. Au cours du cycle cellulaire, la quantification de la fraction sub G₀/G₁ est un reflet des cellules en apoptose.
- Perte de l'intégrité membranaire par marquage à l'annexine V-FITC.

Très précocement au cours de l'apoptose, l'asymétrie membranaire est modifiée, accompagnée de l'externalisation de la phosphatidylsérine (PS). L'annexine V est une protéine (35-36 kD) calcium dépendante qui se fixe sur les phospholipides. Elle a une haute affinité pour la PS. Conjugué au FITC elle permet une identification précoce des cellules en apoptose.

II-7.1.1. Cycle cellulaire.

Le cycle cellulaire est constitué d'une phase de mitose (M) et d'une interphase qui se subdivise en phase G1, phase S (phase de synthèse de l'ADN) et phase G2. C'est pendant l'interphase que des signaux externes peuvent agir pour déclencher la progression ou l'arrêt du cycle cellulaire. Les IGFs sont considérés comme des facteurs de progression intervenant après l'action de facteur de compétence comme le PDGF. La mesure du pourcentage des cellules dans les différentes phases du cycle et en particulier la mesure du pourcentage des cellules en phase sub G0 permet d'apprécier le nombre des cellules entrées en apoptose.

Le cycle cellulaire est mesuré par le contenu en ADN des cellules. L'ADN est marqué à l'iodure de propidium selon le protocole décrit ci-dessous.

II-7.1.1.1. Réactifs.

- > RNase (Ribonuclease) 150 U/ml (Boehringer Mannheim, Réf. : 109145
 - mettre dans un tube en verre 3 mg de RNase / 1 ml H₂O soit 15 U/ml
 - faire bouillir pendant 20 min. (pour détruire l'activité résiduelle de la DNase)
 - laisser régénérer à température ambiante
 - aliquoter en fraction de 100 µl.

- > Iodure de propidium (Sigma, Réf. : P4170).

Préparer dans 100 ml de PBS :

. iodure de propidium	5 mg
. sérum albumine bovine	15 mg
. azide de sodium	5 mg

Se conserve à l'abri de la lumière à + 4° C pendant un mois.

➤ Tampon citrate trisodique : CABS.

Dissoudre dans 1 litre d'H₂O :

- . sucrose 85,3 g
- . citrate trisodique 11,8 g

Ajouter 50 ml de DMSO

Ajuster à pH 7,6 avec HCl.

II-7.1.1.2. Mode opératoire.

Prélever des cellules traitées par différents facteurs de croissance.

- centrifuger à 300 g pendant 5 min.
- laver le culot avec 1 ml de tampon PBS pH 7,2
- centrifuger à 300 g pendant 5 min.

Fixation :

- reprendre le culot par 1 ml de mélange CABS, éthanol à 99 % V/V volume à ajuster pour obtenir une suspension finale de 1 à 2.10⁶ cell/ml
- mettre 30 min. à + 4° C (sur de la glace)
- centrifuger à 300 g pendant 5 min.
- remettre en suspension dans 1 ml de PBS pH 7,2.

Destruction du RNA :

- ajouter 50 µl de solution de RNase
- laisser 20 min. à température ambiante puis 1 min. sur la glace
- centrifuger 5 min. (300 g).

Coloration :

- reprendre le culot dans 1 ml IP
- laisser incuber 30 min. à 37° C
- remettre à l'obscurité à + 4° C quelques minutes
- passer les échantillons au cytomètre.

II-7. 1. 2. Annexine V.

L'annexine V conjugué au FITC est un outil important pour la mesure de l'apoptose par cytométrie en flux. Pour distinguer les différentes étapes d'apoptose, l'iodure de propidium (IP) est ajouté à ce mélange.

Le dosage de l'annexine V-FITC est effectué en utilisant le kit annexine V-FITC (Immunotech, Réf. 2375). Le kit repose sur l'affinité de l'annexine V-FITC pour les PS en présence de Ca^{2+} . La conjugaison de l'annexine avec le FITC se fait dans un rapport 1/1 et elle ne change pas les propriétés de liaison phospholipique de l'annexine V. La cinétique de liaison montre une rapide association de l'annexine V-FITC avec la membrane phospholipidique, si le PS et le Ca^{2+} sont disponibles. Le protocole d'annexine V-FITC est conçu pour une mesure rapide, adaptée de l'apoptose dans un échantillon en suspension.

II-7.1.2.1. Réactifs.

- 1 flacon d'annexine V-FITC liquide prêt à l'emploi (100 μl)
- 1 flacon de tampon de liaison concentré (10 x) liquide (1,7 ml)
- 1 flacon d'iodure de propidium en poudre (250 μg).

Diluer 10 fois le tampon de liaison avec de l'eau distillée et placer le sur la glace. Dissoudre les 250 μg d'IP dans 1 ml de tampon dilué.

II-7.1.2.2. Mode opératoire.

Des cellules (FEP) sont cultivées 24 h dans des plaques de 24 puits à raison de 10^5 - 10^6 cellules par puits dans 500 μl de milieu de culture supplémenté avec 10 % de SVF avec ou sans glutamine. Puis elles sont synchronisées en phase G0/G1 pendant 24 h par suppression du SVF.

- Pour l'essai, les cellules sont incubées pendant 24 h dans du MEM contenant les produits à tester.

- Après cette incubation, le milieu est enlevé et on ajoute 5 μ l d'annexine V-FITC dilués dans 500 μ l de milieu de culture contenant 1,5 mM de CaCl_2 .

L'annexine V-FITC se lie de façon optimale aux cellules apoptotiques quand la concentration en Ca^{2+} est supérieure à 1,5 mM.

- Les cellules sont incubées pendant 10 min. avec l'annexine V-FITC à température ambiante.

- Les cellules détachées, contenues dans le surnageant, sont récupérées par centrifugation et lavées 2 fois avec le milieu de culture (1,5 mM CaCl_2) afin d'éliminer l'annexine V-FITC libre, (quand la concentration en Ca^{2+} est supérieure à 1,5 mM, l'annexine liée se sépare difficilement de la surface membranaire).

- Les cellules adhérentes sont rincées 2 fois avec MEM + CaCl_2 supérieur à 1,5 mM.

- Les puits sont grattés avec un grattoir (l'utilisation de trypsine EDTA diminue la quantité d'annexine V-FITC liée et peut entraîner l'exposition de PS de cellules vivantes. Ce phénomène dépend du type de cellules).

- Les cellules sont diluées dans le milieu de culture (+ 1,5 mM CaCl_2) ou dans une solution de tampon à raison de 10^5 - 10^6 cellules/ml.

- La solution d'IP (dilution au 1/100 soit 2,5 μ g/ml de concentration finale) est ajoutée à l'échantillon).

- Après une incubation de 15 min. avec IP sur glace, les échantillons sont analysés par cytométrie en flux.

Les graphiques obtenus montrent trois populations (Fig. 18) :

1) les cellules vivantes qui ne sont pas endommagées pendant le grattage et qui ont un faible signal de FITC et d'IP,

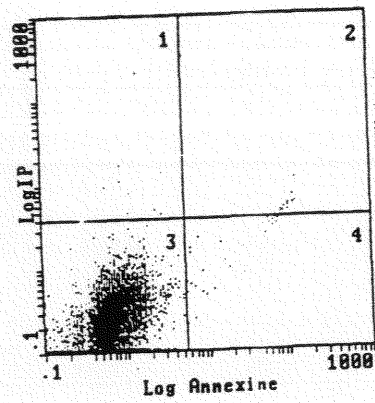
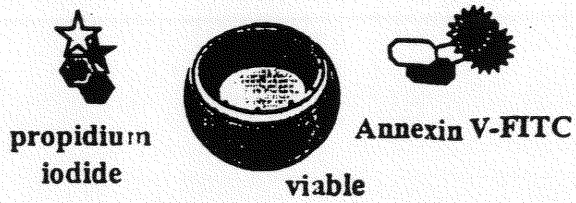
2) les cellules endommagées avec un fort signal d'IP et un faible signal de FITC,

3) les cellules apoptotiques avec un fort signal FITC et un faible signal d'IP.
Selon le type de cellules utilisées, une quatrième population peut être présente.

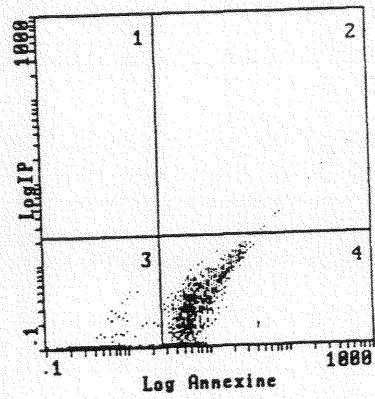
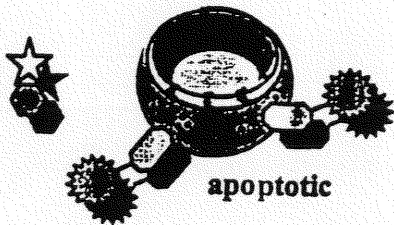
4) des cellules nécrosées qui ont un fort signal FITC et un fort signal d'IP.

- L'incubation sur glace en dernière étape est nécessaire pour arrêter le passage des cellules viables vers l'apoptose ou la nécrose.

A



B



C

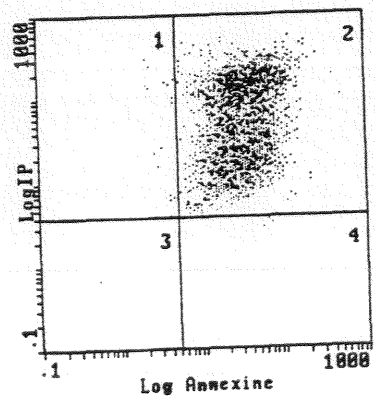
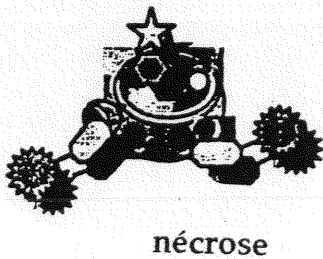


Fig. 18 : Présentation schématique des résultats obtenus par cytométrie en flux après le double marquage de l'annexine V-FITC et l'iodure de propidium (IP).

A vivante

B apoptique

C nécrosé

III - RESULTATS

III - 1. Recherche des FCPPM chez différentes espèces animales.

III-1.1. Activité mitogénique.

Dans des travaux antérieurs faits au laboratoire, il a été montré que les FCPPM du sérum humain étaient mitogènes par eux-mêmes et que par ailleurs ils stimulaient l'activité mitogénique d'IGF1 et d'IGF2 (Thiebaut, 1992). Aussi avons-nous cherché cette activité FCPPM dans des sérums d'animaux de différentes espèces. Cette activité est mesurée par l'incorporation de [³H]-thymidine dans des fibroblastes d'embryons de poulets et comme pour les expériences faites avec les sérums humains, l'activité a été mesurée sur des UF seuls et sur ces mêmes UF testés en présence d'IGF1 et d'IGF2.

III-1.1.1. Activité mitogénique des UF seuls.

Des ultrafiltrats préparés comme indiqué au paragraphe II-1. provenant de sérums de cheval, de boeuf, de porc, de veau foetal et de mouton ont été testés sur des fibroblastes d'embryons de poulets aux concentrations de 2,5 ; 5 ; 10 % (v/v). Pour comparaison des UF de sérums humains sont également testés.

Les résultats seront exprimés en cpm. Les CV des essais sont le plus généralement inférieurs à 12 % ce qui signifie que ce dosage biologique est bien maîtrisé. Cependant pour des expériences différentes, il peut y avoir des différences non négligeables dans le nombre de cpm. C'est pour cela que les résultats seront aussi exprimés en rapport de stimulation ce qui permettra de comparer les expériences entre elles.

Les tableaux V et VI ainsi que les figures 19 et 20 rapportent les résultats de deux expériences indépendantes représentatives des résultats habituellement obtenus.

III - Résultats

PRODUITS		ESPECES					
		Humain	Cheval	Boeuf	Porc	SVF	Mouton
Témoin	M(cpm)	7804	12757	15186	13906	9871	10062
	ET	858	456	2290	799	861	1036
	CV %	11,0	3,6	15,0	5,7	8,7	10,3
UF 0 %	M(cpm)	15516***	26789***	22780***	16687***	14565***	8568°
	ET	208	1207	2020	760	2156	619
	CV %	1,3	4,5	8,9	4,6	14,8	7,2
UF 2,5 %	M(cpm)	16454***	29341***	19742***	18707***	9220	8426°
	ET	1834	2646	2294	794	1508	1267
	CV %	11,2	9,0	11,6	4,2	16,4	15,0
UF 5 %	M(cpm)	19450***	29087***	22435***	19205***	6525°°	4970°°°
	ET	1936	1428	607	2089	1297	633
	CV %	9,9	4,9	2,7	10,9	19,9	12,7
UF 10 %	M(cpm)	19450***	29087***	22435***	19205***	6525°°	4970°°°
	ET	1936	1428	607	2089	1297	633
	CV %	9,9	4,9	2,7	10,9	19,9	12,7

Tableau V : Activité mitogénique d'UF de sérum d'animaux mesurée par incorporation de [³H]-thymidine dans des fibroblastes d'embryons de poulets (expérience 1). M(cpm) moyenne de 6 réplifications, ET (écart-type), CV (coefficient de variation). Chaque résultat est comparé au témoin correspondant par le test-t de student.

*** p < 0,001 (augmentation) ° p < 0,05 °° p < 0,01 °°° p < 0,001 (diminution).

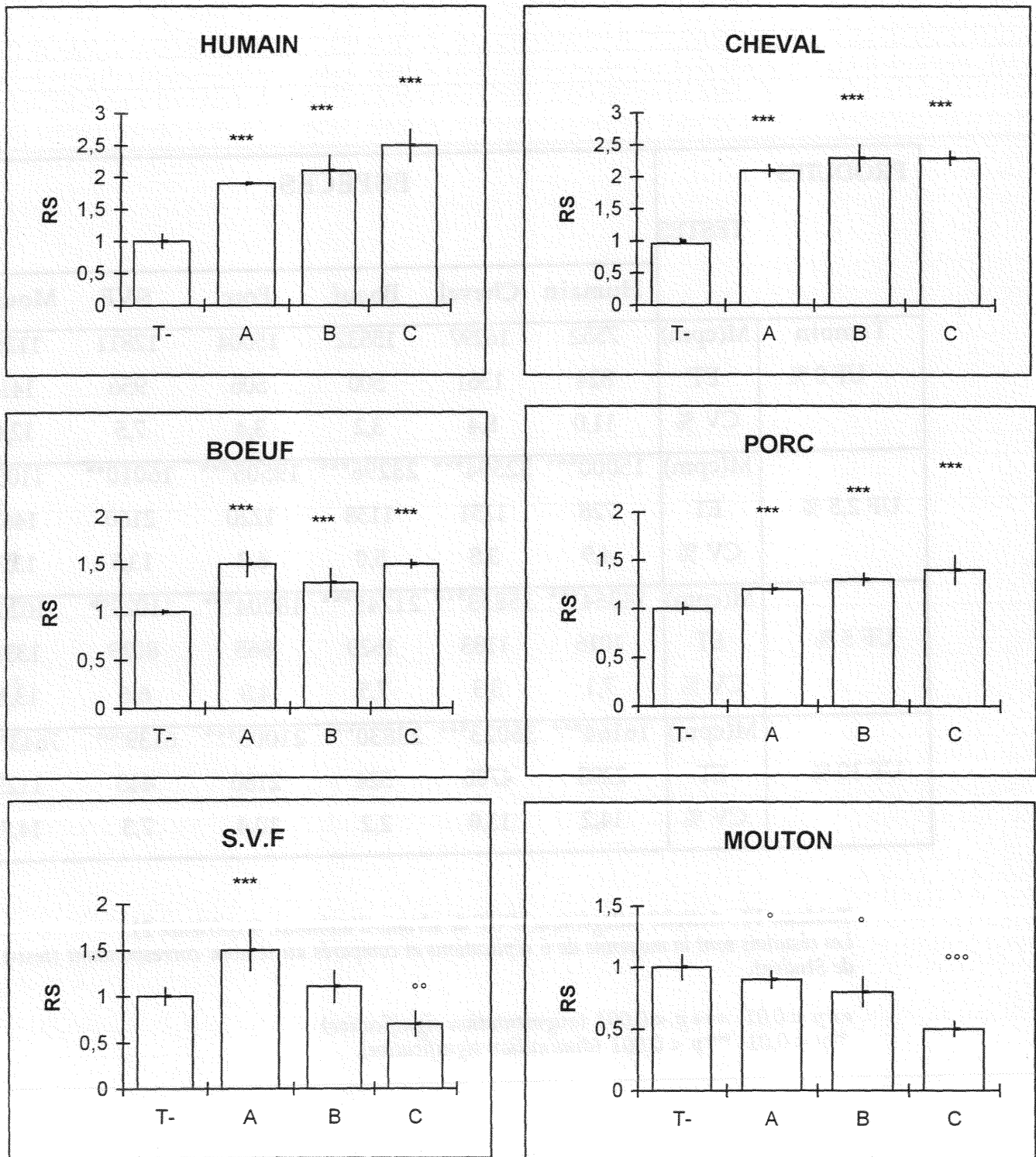


Fig. 19 : Mesure de l'activité mitogénique d'UF de sérums d'animaux. Les résultats sont exprimés en rapport de stimulation (RS) = cpm essai/cpm témoin et comparés au témoin correspondant : T = milieu seul ; A = 2,5 % UF ; B = 5 % UF ; C = 10 % UF (test-t de Student)

*** $p < 0,001$ (augmentation) ° $p < 0,05$ °° $p < 0,01$ °°° $p < 0,001$ (diminution)

PRODUITS TESTES		ESPECES					
		Humain	Cheval	Boeuf	Porc	SVF	Mouton
Témoin UF 0 %	M(cpm)	7552	16297	15532	15004	12811	11266
	ET	824	1361	500	506	956	1418
	CV %	11,0	8,4	3,2	3,4	7,5	12,6
UF 2,5 %	M(cpm)	15000***	32594***	23296***	19505***	16010**	11052
	ET	728	1251	1158	1220	2160	1465
	CV %	4,9	3,8	5,0	6,3	13,5	13,3
UF 5 %	M(cpm)	14364***	35853***	21745***	18004***	11023 ^{oo}	10200
	ET	1016	1183	1620	865	8023	1331
	CV %	7,1	3,3	7,5	4,8	6,6	13,1
UF 10 %	M(cpm)	16164***	36023***	23830***	21005***	6139 ^{ooo}	7643 ^{ooo}
	ET	2298	4700	524	2180	445	1125
	CV %	14,2	13,0	2,2	10,4	7,3	14,7

Tableau VI : *Activité mitogénique d'UF de sérums d'animaux (expérience 2).
Les résultats sont la moyenne de 6 réplifications et comparés au témoin correspondant (test-t de Student).*

** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ (augmentation significative)
^{oo} $p < 0,01$ ^{ooo} $p < 0,001$ (diminution significative).

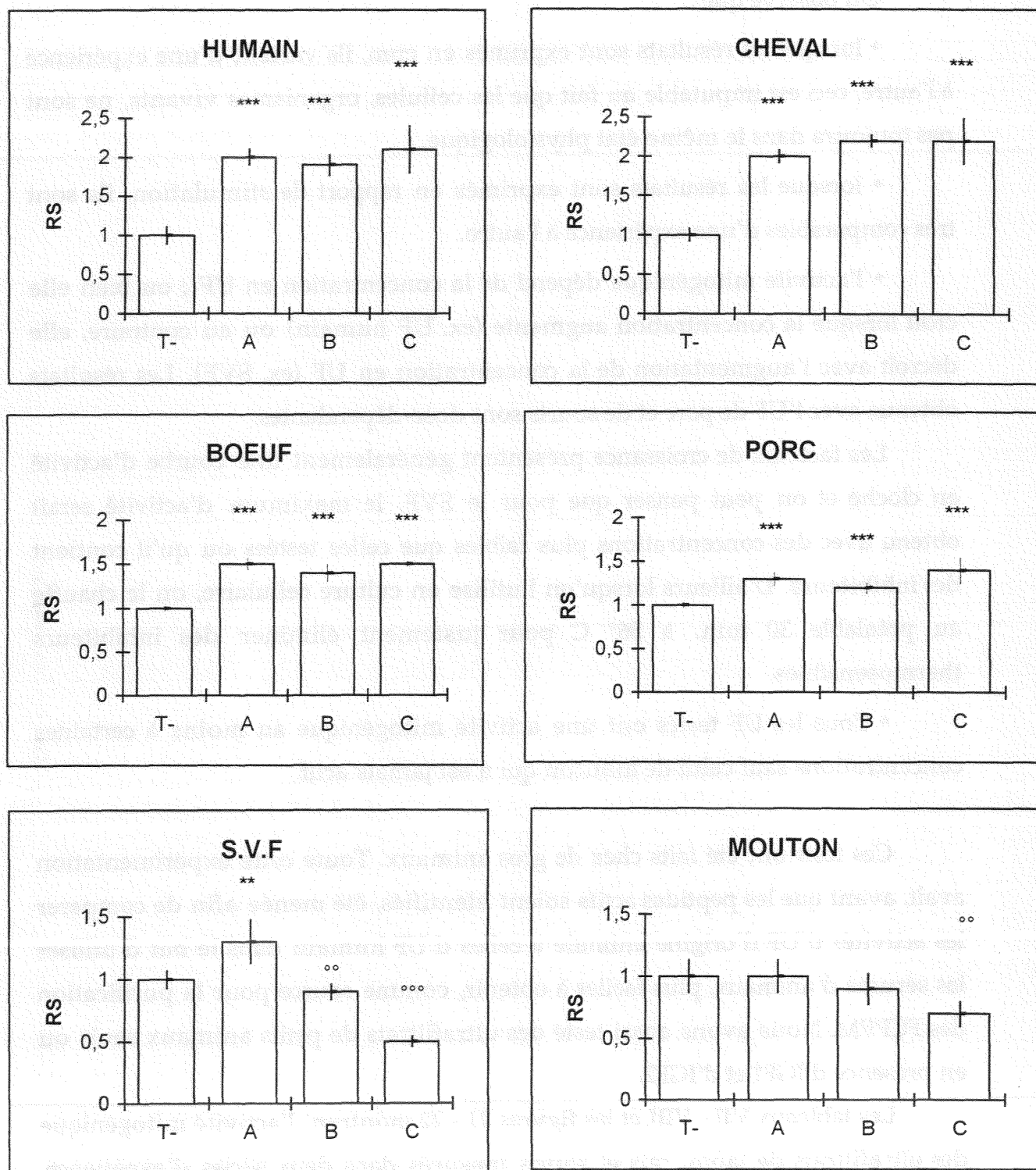


Fig. 20 : Activité mitogénique d' UF de sérums d'animaux. Les résultats sont exprimés en rapport de stimulation (RS) et comparés au témoin correspondant ((test-t de Student).
 T = milieu seul ; A = 2,5 % UF ; B = 5 % UF ; C = 10 % UF

** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ (stimulation) °° $p < 0,01$ °°° $p < 0,001$ (inhibition)

On observe que :

- lorsque les résultats sont exprimés en cpm, ils varient d'une expérience à l'autre, ceci est imputable au fait que les cellules, organismes vivants, ne sont pas toujours dans le même état physiologique.

- lorsque les résultats sont exprimés en rapport de stimulation, ils sont très comparables d'une expérience à l'autre.

- l'activité mitogénique dépend de la concentration en UF ; ou bien elle croît lorsque la concentration augmente (ex. UF humain) ou au contraire, elle décroît avec l'augmentation de la concentration en UF (ex. SVF). Les résultats obtenus avec l'UF de porc et de souris sont dose-dépendantes.

Les facteurs de croissance présentent généralement une courbe d'activité en cloche et on peut penser que pour le SVF, le maximum d'activité serait obtenu avec des concentrations plus faibles que celles testées ou qu'il contient des inhibiteurs. D'ailleurs lorsqu'on l'utilise en culture cellulaire, on le chauffe au préalable 30 min. à 56° C pour justement éliminer des inhibiteurs thermosensibles.

- Tous les UF testés ont une activité mitogénique au moins à certaines concentrations sauf celui de mouton qui n'est jamais actif.

Ces tests ont été faits chez de gros animaux. Toute cette expérimentation avait, avant que les peptides actifs soient identifiés, été menée afin de comparer les activités d'UF d'origine animale à celles d'UF humain dans le but d'utiliser les sérums d'animaux, plus faciles à obtenir, comme source pour la purification des FCPPM. Nous avons aussi testé des ultrafiltrats de petits animaux seuls ou en présence d'IGF1 et d'IGF2.

Les tableaux VII - VIII et les figures 21 - 22 montrent l'activité mitogénique des ultrafiltrats de lapin, rats et souris mesurés dans deux séries d'expérience. L'ultrafiltrat de lapin présente une activité mitogénique faible, le rapport de stimulation est au maximum de 1,2 (2,5 % UF), l'activité mitogénique de l'ultrafiltrat de souris est beaucoup plus importante, elle varie de 1,32 à 1,98 en fonction des concentrations d'UF. Par contre l'ultrafiltrat de rat est fortement inhibiteur, l'inhibition peut atteindre 50 % pour 5 et 10 % d'UF.

PRODUITS	TESTES	ESPECES		
		Lapin	Souris	Rat
Témoin UF 0 %	M (cpm)	22905	20678	20678
	ET	1241	3067	3067
	CV %	5,42	14,83	14,83
Sérum entier	M (cpm)	99075 ^{***}		5682 ^{ooo}
	ET	7315		774
	CV %	7,38		13,63
UF 2,5 %	M (cpm)	27438 [*]		12238 ^{ooo}
	ET	3972		584
	CV %	14,48		4,77
UF 5 %	M (cpm)	25247 [*]	31701 ^{***}	10984 ^{ooo}
	ET	1858	2430	1281
	CV %	7,36	7,67	11,67
UF 10 %	M (cpm)	24948	41108 ^{***}	10439 ^{ooo}
	ET	3162	8108	986
	CV %	12,68	19,84	9,45

Tableau VII : *Activité mitogénique d' UF de sérums de lapin, souris et rat (expérience 1). Les résultats sont la moyenne de 6 réplifications et comparés au témoin correspondant (test-t de Student).*

** p < 0,05 *** p < 0,01 (augmentation), ooo p < 0,001 (diminution).*

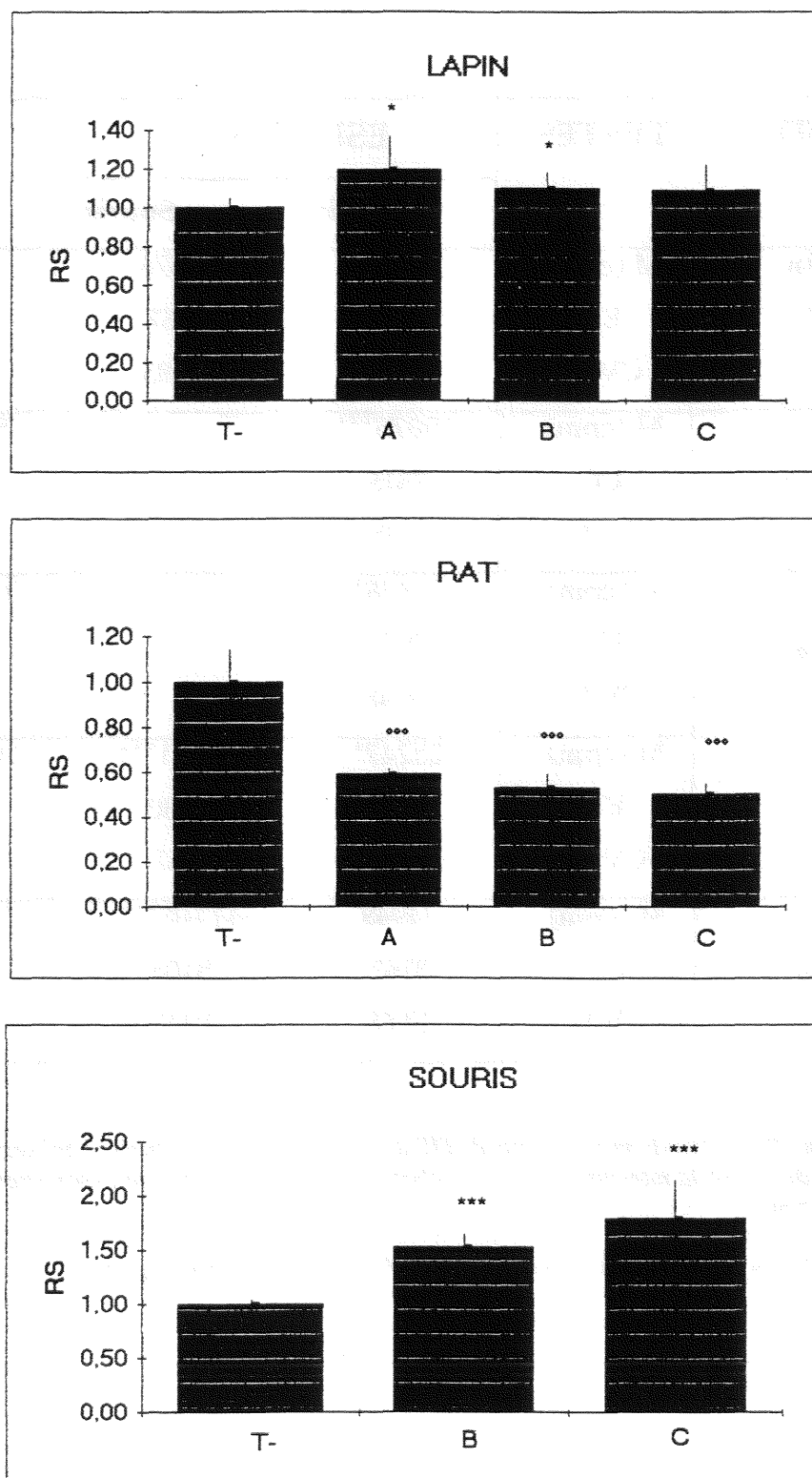


Fig. 21 : Activité mitogénique d' UF de sérums d'animaux. Les résultats sont exprimés en rapport de stimulation (RS) et comparés au témoin correspondant (1^{re} expérience) (test-t de Student).

T = milieu seul ; A = 2,5 % UF ; B = 5 % UF ; C = 10 % UF

* $p < 0,05$ *** $p < 0,001$ (augmentation) *** $p < 0,001$ (diminution)

PRODUITS	TESTES	ESPECES		
		Lapin	Souris	Rat
Témoin UF 0 %	M (cpm)	20489	18968	20489
	ET	1862	1459	1862
	CV %	9,09	7,69	9,09
UF 2,5 %	M (cpm)	23037*	25165***	
	ET	2295	2094	
	CV %	9,96	8,32	
UF 5 %	M (cpm)	22315*	27909***	11590 ^{ooo}
	ET	2819	2041	1342
	CV %	12,63	7,31	11,58
UF 10 %	M (cpm)	21043	30509***	11812 ^{ooo}
	ET	2192	1418	879
	CV %	10,42	4,65	7,44

Tableau VIII : Activité mitogénique d' UF de sérums de lapin, souris et rat (expérience 2). Les résultats sont la moyenne de 6 réplifications et comparés au témoin correspondant (test-t de Student).

* $p < 0,05$ *** $p < 0,001$ (augmentation significative par rapport au témoin, milieu seul)
^{ooo} $p < 0,001$ (diminution significative par rapport au témoin).

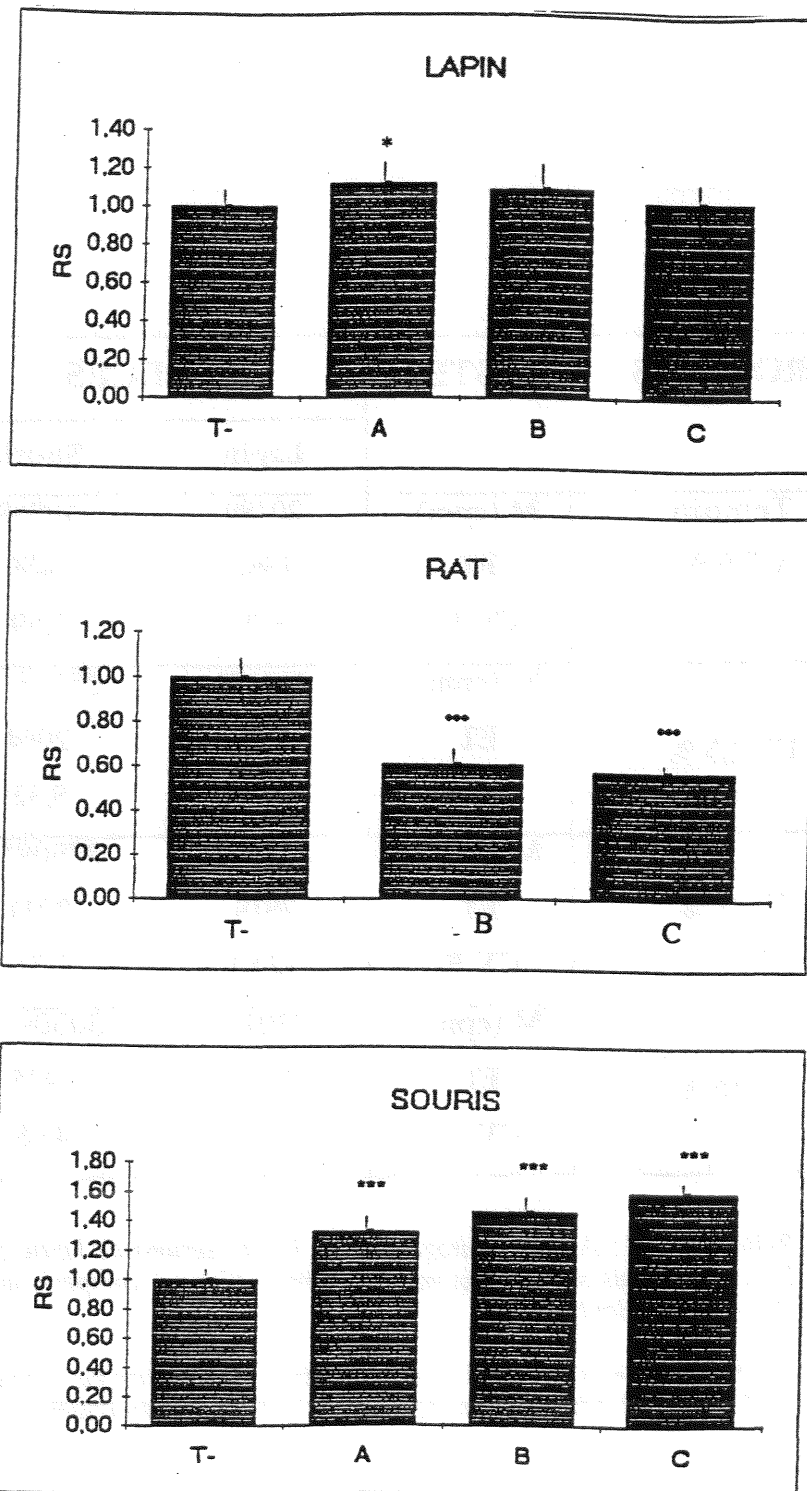


Fig. 22 : Activité mitogénique d'UF de sérums d'animaux (expérience 2). Les résultats sont exprimés en rapport de stimulation (RS) et comparés au témoin correspondant (test-t de Student).

T = milieu seul ; A = 2,5 % UF ; B = 5 % UF ; C = 10 % UF

* $p < 0,05$ *** $p < 0,001$ (augmentation) °°° $p < 0,001$ (diminution)

La significativité de l'ensemble des résultats est consignée dans la figure 23. Elle a été calculée par un test Anova suivi d'un test de Student Newman Keuls lorsque la répartition était normale ou d'un test de Kruskal-Wallis. Les rapports de stimulation permettent de comparer les UF d'animaux entre eux et avec le sérum humain. Dans le tableau IX, les UF sont rangés en fonction de leur activité.

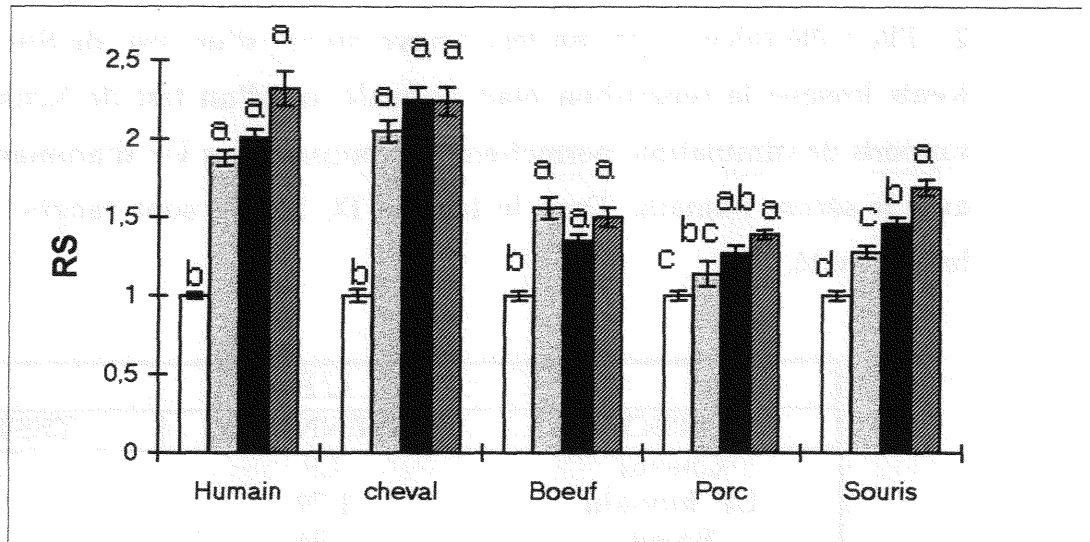
UF		
ESPECE	MOYENNE (RS)	TEST SNK
Cheval	1,9	a
UF humain	1,79	b
Boeuf	1,34	c
Souris	1,34	c
Porc	1,21	d
Lapin	1,07	e
SVF	0,96	f
Mouton	0,87	g
Rat	0,68	h

Tableau IX : Comparaison de la puissance de l'activité mitogénique des différents UF d'animaux en prenant en compte les résultats de plusieurs expériences (3) et toutes concentrations confondues. Les résultats ont été analysés par Anova suivi d'un test-t de Student Newman Keuls ou Kruskal-Wallis.

III-1.1.2. Activité mitogénique des UF d'animaux en présence d'IGF1.

IGF1 (et IGF2) est mitogénique pour de nombreuses cellules, son activité mitogénique sur les FEP a d'ailleurs été un des tests permettant sa quantification. Avant de tester les UF en présence d'IGF1, la quantité d'IGF1 à utiliser a été déterminée en mesurant l'incorporation de [³H]-thymidine dans les fibroblastes d'embryons de poulets en présence de quantités croissantes d'IGF1. Le tableau X et la figure 24 donnent les résultats de cette expérience.

A



B

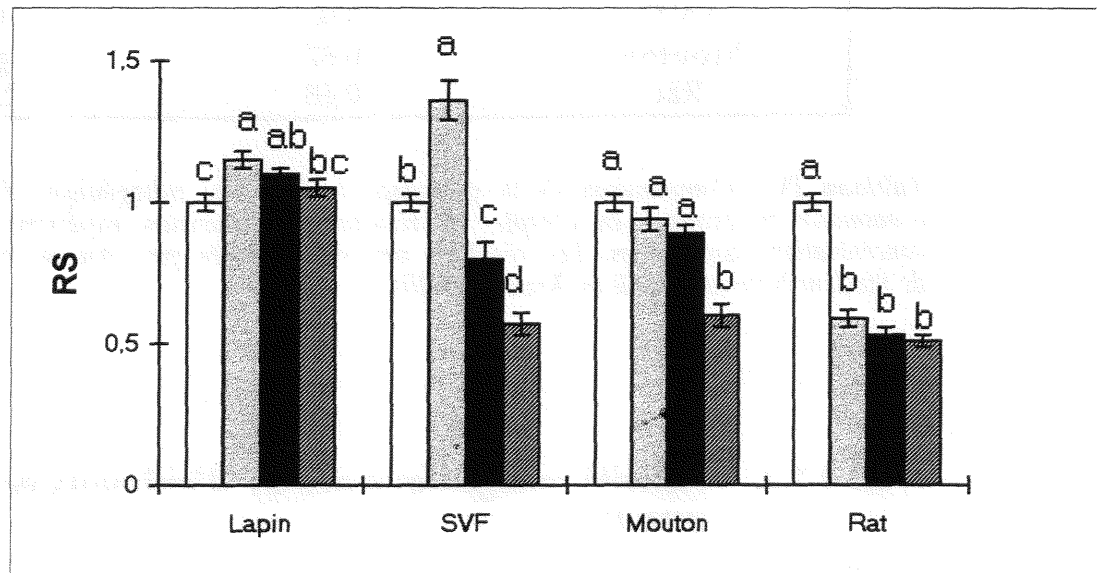






Fig. 23 : Activité mitogénique d'UF des sérums d'animaux. Les UF sont testés aux concentrations de 0 (milieu seul), 2,5, 5 et 10 %. Les résultats sont exprimés en rapport de stimulation (RS). Pour chaque espèce un Anova suivi d'un test de Student Newman Keuls (distribution normale) ou de Kruskal-Wallis suivi d'un test de Dunn ont été effectués. a, b, c et d sont significativement différents et $a > b > c > d$ pour chaque groupe.

Concentration de 0 (milieu seul)  de 2,5 %  5 %  10 % 

	IGF1 ng/ml					
	T	10	15	20	50	100
M (cpm)	22284	31183***	36317***	35049***	30578***	27070**
ET (cpm)	2180	2749	2425	2479	3039	2534
CV (%)	9,83	8,81	6,68	7,07	9,94	9,36

Tableau X : Mesure de l'activité mitogénique d'IGF1 (incorporation de [³H]-thymidine dans des fibroblastes d'embryons de poulets) en fonction de quantités croissantes. M = moyenne de 6 réplifications, ET = écart-type, CV = coefficient de variation. Les résultats sont significativement supérieurs au témoin (test-t de Student) ** p < 0,01 *** p < 0,001.

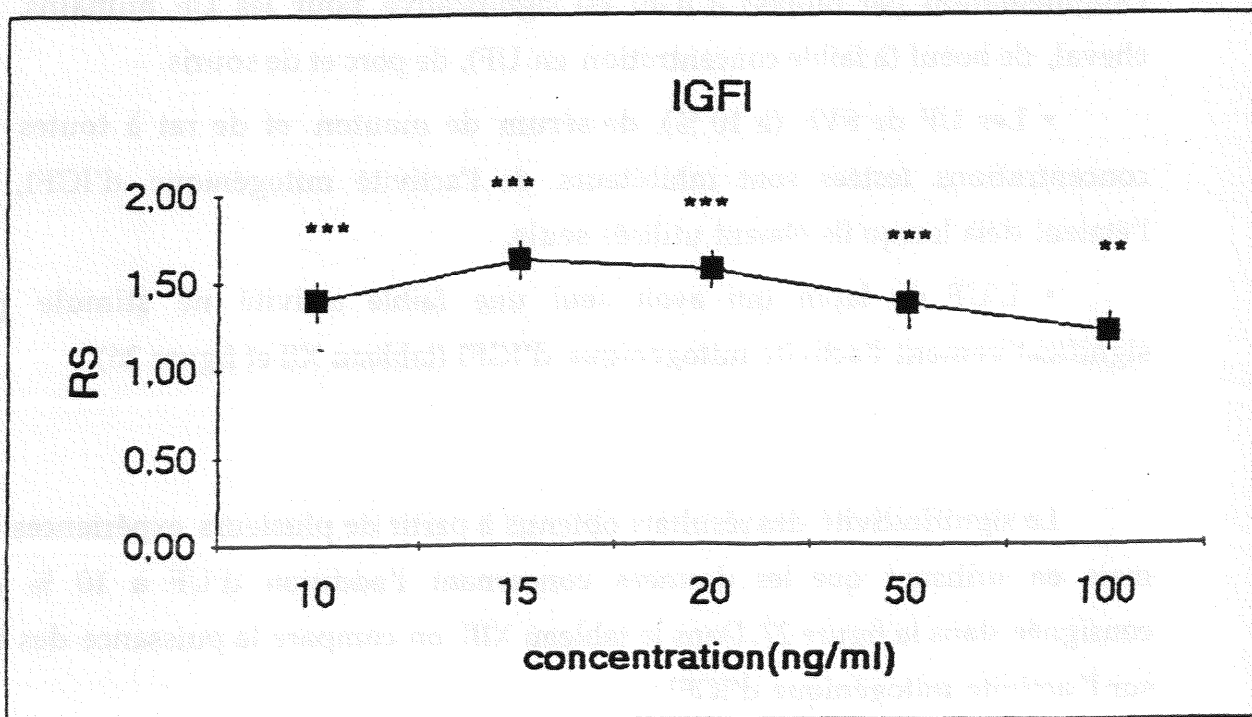


Fig. 24 : Mesure de l'activité mitogénique d'IGF1. Les résultats sont exprimés en rapport de stimulation. Les résultats sont comparés au témoin seul. ** p < 0,01 *** p < 0,001 (test-t de Student).

La concentration de 15 ng/ml qui donne la réponse maximale a été choisie pour les expériences suivantes. L'activité mitogénique des UF d'animaux a donc été mesurée en présence d'IGF1 (15 ng/ml).

Les résultats sont rassemblés dans le tableau XI [les essais sont comparés au témoin (culture en milieu seul)] et dans la figure 25 [les essais (IGF1 + UF) sont comparés à IGF1 seul].

On constate que :

- l'activité mitogénique d'IGF1 est reproductible. Le rapport de stimulation mesuré dans 6 expériences indépendantes (chacune comprenant 6 réplifications) est comprise entre 1,64 et 2 ($M = 1,76 \pm 0,1$).

- l'UF ajouté à IGF1 augmente l'incorporation de [³H]-thymidine, l'augmentation par rapport à IGF1 est significative pour les UF humains, de cheval, de boeuf (à faible concentration en UF), de porc et de souris.

- Les UF de SVF (à 10 %), de sérum de mouton et de rat à toutes les concentrations testées sont inhibiteurs de l'activité mitogénique d'IGF1, ils l'étaient déjà lorsqu'ils étaient utilisés seuls.

- L'UF de lapin qui avait seul une faible activité ne stimule pas significativement l'activité mitogénique d'IGF1 (tableau XII et figure 26).

La significativité des résultats obtenus à partir de plusieurs expériences (3) mais en utilisant que les données concernant l'addition d'UF à 10 % est consignée dans la figure 27. Dans le tableau XIII, on compare la puissance des UF sur l'activité mitogénique d'IGF1.

PRODUITS TESTES		ESPECES					
		Humain	Cheval	Boeuf	Porc	SVF	Mouton
Témoin UF 0 %	M(cpm)	7804	12757	15186	13906	9871	10062
	ET	858	456	229	799	861	1036
	CV %	11,0	3,6	1,5	5,7	8,7	10,3
IGF1 (15 ng/ml)	M(cpm)	13992***	25514***	26087***	25030***	16553***	16560***
	ET	738	449	1819	1668	1443	830
	CV %	5,3	1,8	7,0	6,7	8,7	5,0
IGF1 (15 ng/ml) UF 2,5 %	M(cpm)	20968 ***	31892***	29789***	27812***	16506***	10977
	ET	1098	1861	878	402	1597	1049
	CV %	5,2	5,8	2,9	1,4	9,7	9,6
IGF1 (15 ng/ml) UF 5 %	M(cpm)	21398***	33168***	26940***	29930***	11777	10272
	ET	3224	993	2871	1147	897	1107
	CV %	15	3,02,6	10,7	3,8	7,6	10,8
IGF1 (15 ng/ml) UF 10 %	M(cpm)	27720***	32089***	26252***	31456***	6779 ^{ooo}	7090 ^{ooo}
	ET	4574	484	3309	1106	314	501
	CV %	16,5	1,2	12,6	3,5	4,6	7,1

Tableau XI : Mesure de l'activité mitogénique d'IGF1 et d'IGF1 utilisé avec les UF de sérum d'animaux. Les résultats des essais sont comparés au témoin correspondant (test-t de Student).

*** $p < 0,001$ (augmentation significative) ^{ooo} $p < 0,001$ (diminution significative).

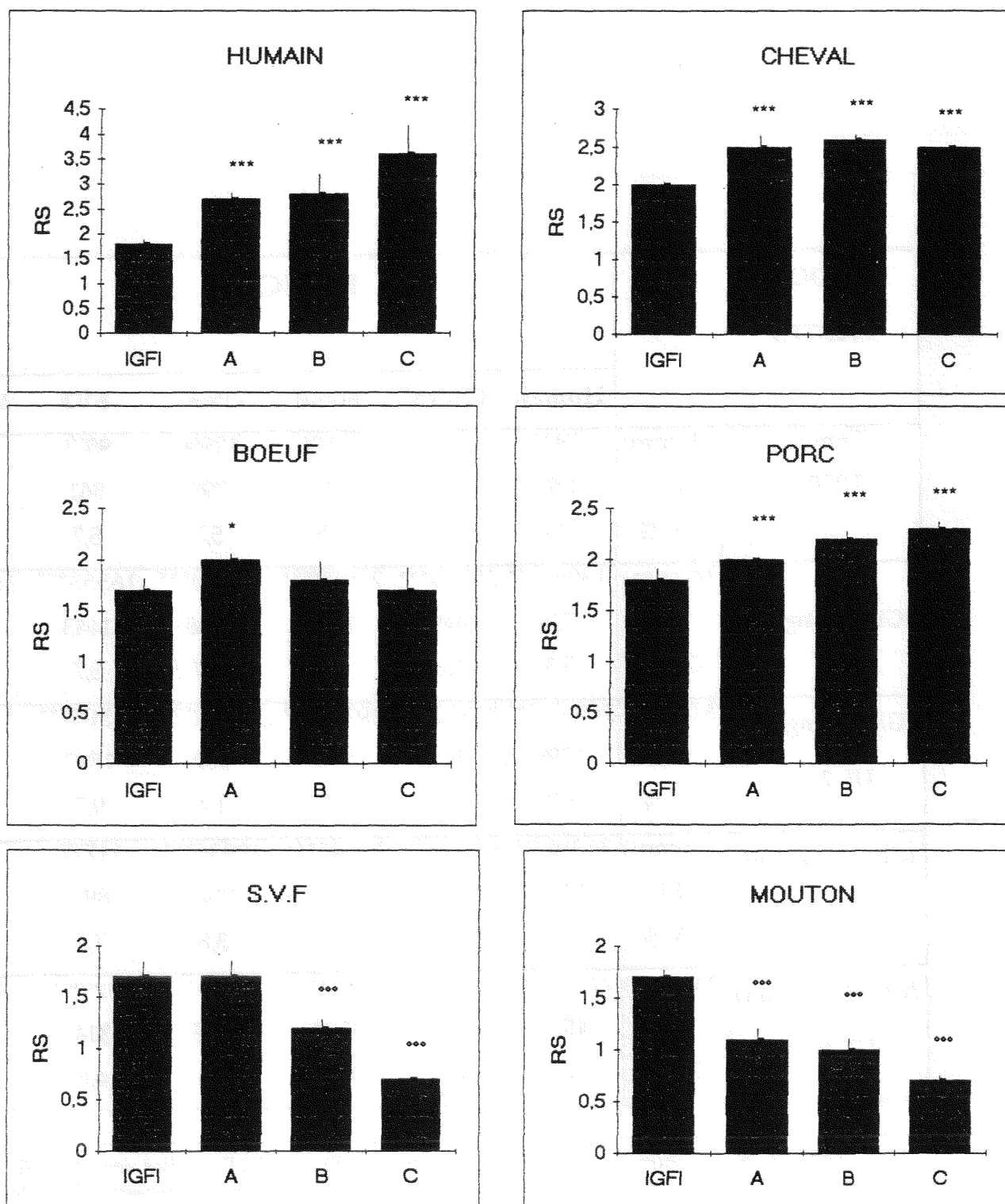


Fig. 25 : Mesure de l'activité mitogénique de IGF1 et IGF1 associé aux UF de sérums d'animaux. Les résultats sont exprimés en rapport de stimulation (RS). Chaque essai est comparé aux valeurs d'IGF1 seul.

IGF1 seul ; A = IGF1 + 2,5 % UF ; B = IGF1 + 5 % UF ; C = IGF1 + 10 % UF

* $p < 0,05$ *** $p < 0,001$ (augmentation)

... $p < 0,001$ (diminution)

PRODUITS	TESTES	ESPECES		
		Lapin	Souris	Rat
Témoin	M (cpm)	20489	18968	20489
	ET	1862	1459	1862
	CV %	9,09	7,69	9,09
IGF1 (15 ng/ml)	M (cpm)	34954***	31758***	34954***
	ET	3073	2139	3073
	CV %	8,79	6,74	8,79
IGF1 (15 ng/ml) UF 2,5 %	M (cpm)	35478***	33066***	
	ET	1197	2264	
	CV %	3,37	6,85	
IGF1 (15 ng/ml) UF 5 %	M (cpm)	34455***	35420***	15228 ^{ooo}
	ET	1555	1073	1060
	CV %	4,51	3,03	6,96
IGF1 (15 ng/ml) UF 10 %	M (cpm)	32932***	38255***	15308 ^{ooo}
	ET	19779	2039	1455
	CV %	6,01	5,33	9,50

Tableau XII : Mesure de l'activité mitogénique des UF de lapin, souris et rat en combinaison avec IGF1. Tous les résultats sont comparés au témoin correspondant (test-t de Student). *** $p < 0,001$ (augmentation) ^{ooo} $p < 0,001$ (inhibition).

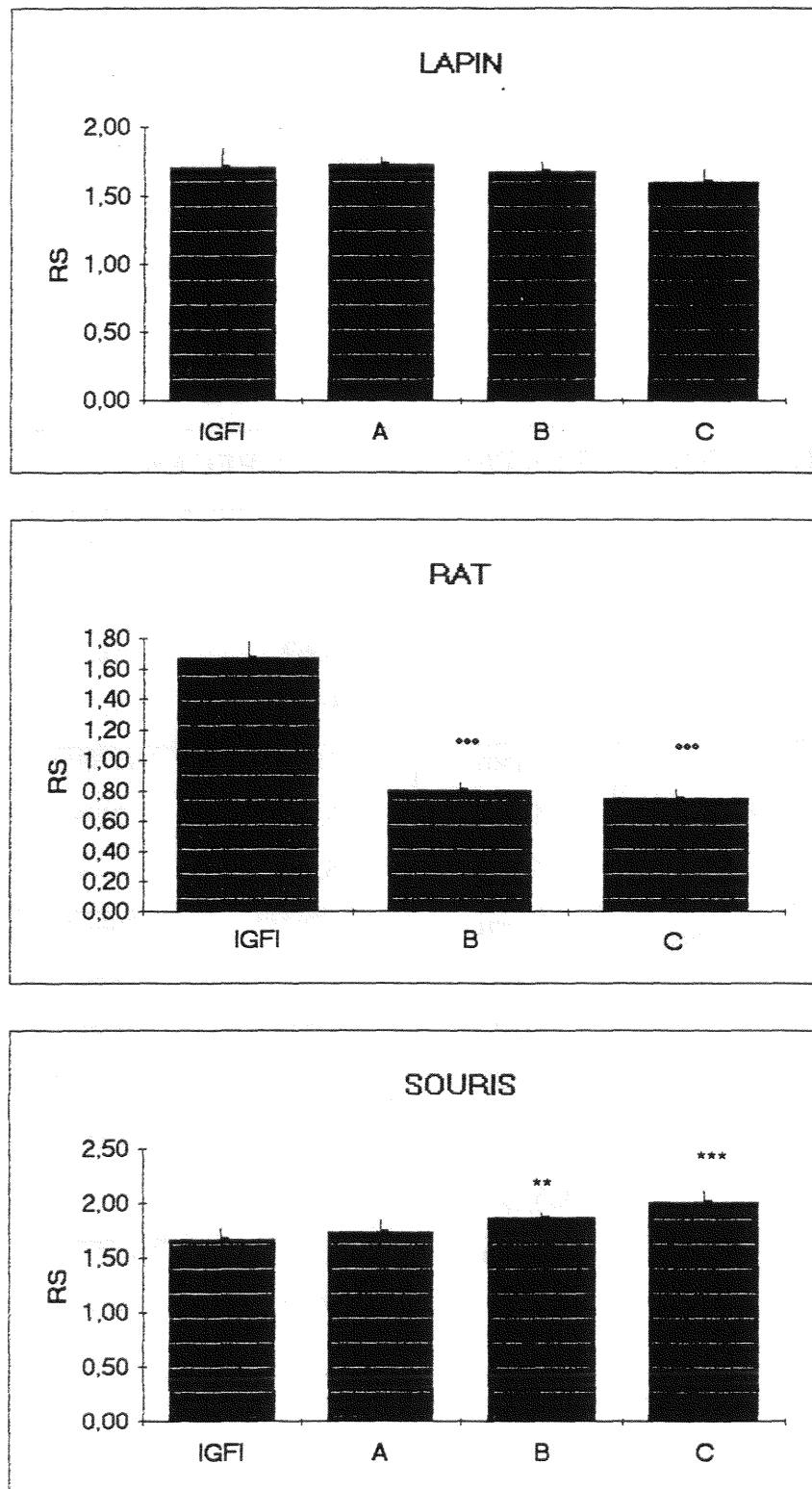


Fig. 26 : Mesure de l'activité mitogénique d'IGF1 et IGF1 associé aux UF de sérum d'animaux. Les résultats sont exprimés en rapport de stimulation (RS). Chaque essai est comparé aux valeurs d' IGF1 seul (expérience 1) (Test-t de Student).

IGF1 seul ; A = IGF1 + 2,5 % UF ; B = IGF1 + 5 % UF ; C = IGF1 + 10 % UF

** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ (augmentation) °°° $p < 0,001$ (diminution)

UF		
ESPECE	MOYENNE (RS)	TEST SNK
IGF1 seul	1,76	
UF humain	2,63	a
Cheval	2,40	b
Porc	2,05	c
Souris	1,83	d
Boeuf	1,76	d, e
Lapin	1,67	e
SVF	1,27	f
Mouton	1,07	g
Rat	0,96	h

Tableau XIII : Comparaison de la puissance des UF sur l'activité mitogénique d'IGF1. Pour cette analyse statistique (ANOVA suivie du test SNK) les résultats de plusieurs expériences (3) et de toutes les concentrations d'UF testées sont pris en compte (RS = cpm essai/cpm contrôle)....

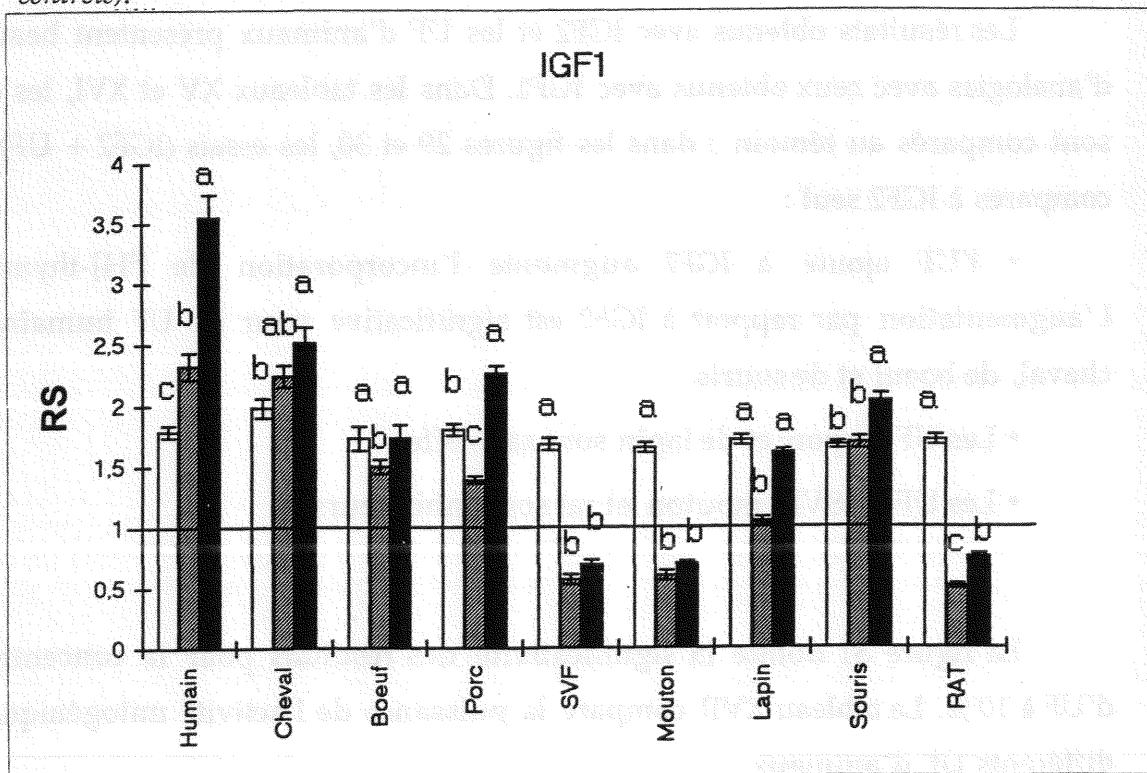


Fig. 27 : Activité mitogénique d'IGF1 (15 ng/ml) □, d'UF 10 % ▨ et IGF1 associé à UF 10 % ■. Les résultats sont exprimés en rapport de stimulation (RS). Pour chaque espèce un test Anova suivi d'un test de Student Newman Keuls (distribution normale) ou un test de Kruskal-Wallis suivi d'un test de Dunn ont été effectués. a, b, c sont significativement différents ($p < 0,05$) et $a > b > c$ pour chaque groupe de résultat.

III-1.1.3. Activité mitogénique des UF d'animaux en présence d'IGF2.

Nous avons déterminé la quantité d'IGF2 à utiliser. Le tableau XIV et la figure 28 donnent les effets mitogéniques d'IGF2 en fonction de la dose utilisée. Le maximum est obtenu pour la concentration d'IGF2 de 50 ng/ml. C'est cette concentration qui sera utilisée dans les expériences suivantes.

L'activité mitogénique d'IGF2 a été testée comme celle d'IGF1 dans 6 expériences indépendantes. Son activité mitogénique pour les FEP est inférieure à celle de IGF1 puisque la moyenne des rapports de stimulation est de $1,65 \pm 0,11$ pour une concentration en IGF2 environ 3 fois celle utilisée pour IGF1.

Les résultats obtenus avec IGF2 et les UF d'animaux présentent beaucoup d'analogies avec ceux obtenus avec IGF1. Dans les tableaux XV et XVI, les essais sont comparés au témoin ; dans les figures 29 et 30, les essais (IGF2 + UF) sont comparés à IGF2 seul :

- L'UF ajouté à IGF2 augmente l'incorporation de [³H]-thymidine. L'augmentation par rapport à IGF2 est significative pour les UF humains, de cheval, de boeuf et de souris.

- Les UF de porc et de lapin sont sans effet.
- Les UF de SVF, mouton et rat sont inhibiteurs .

La figure 31 donne la significativité des résultats pour la concentration d'UF à 10 %. Le tableau XVII compare la puissance de l'activité mitogénique des différents UF d'animaux.

	IGF2 ng/ml					
	T	10	15	20	50	100
M (cpm)	22284	24918	27105**	31613***	35496***	26166*
ET (cpm)	2190	3409	1979	2794	2564	2989
CV %	9,83	13,68	7,3	8,84	8,41	11,42

Tableau XIV : Effet mitogénique d'IGF2 (mesure de l'incorporation de [³H]-thymidine dans des FEP) en fonction de la concentration utilisée. Les résultats sont comparés au témoin par le test-t de student * p < 0,05 ** p < 0,01 *** p < 0,001 (augmentation)

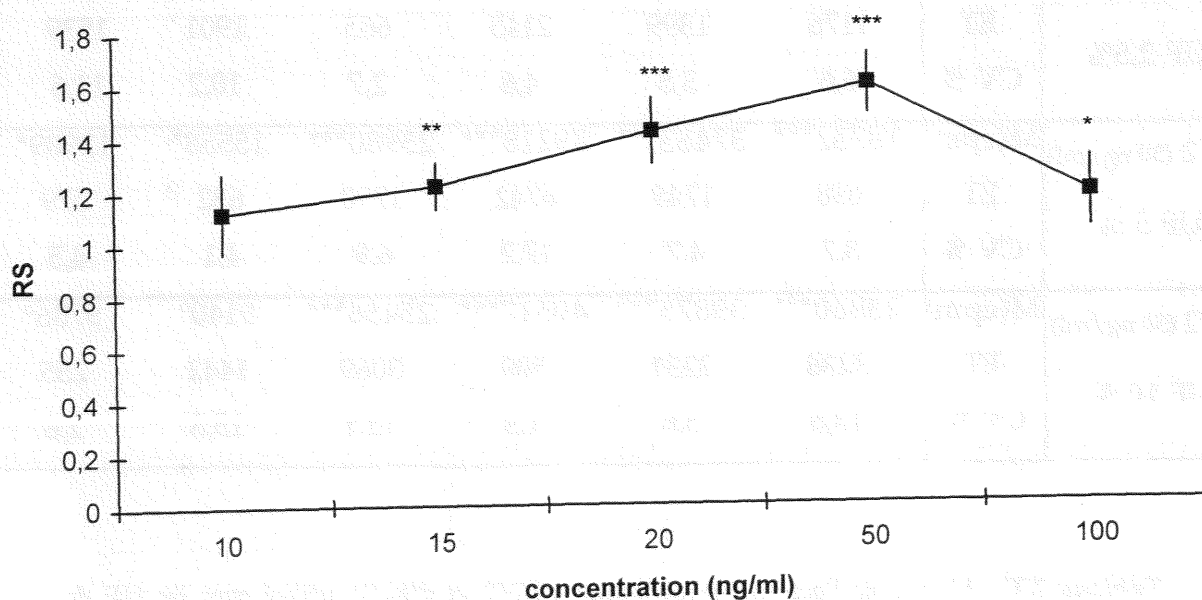


Fig. 28 : Mesure de l'activité mitogénique d'IGF2. Les résultats sont exprimés en rapport de stimulation et comparés au témoin (test-t de Student).

* p < 0,05 ** p < 0,01 *** p < 0,001 (augmentation)

PRODUITS TESTES		ESPECES					
		Humain	Cheval	Boeuf	Porc	SVF	Mouton
Témoin UF 0 %	M(cpm)	7522	16297	15532	15004	12311	11266
	ET	824	1361	500	506	956	1418
	CV %	11,0	8,4	3,2	3,4	7,5	12,6
IGF2 (50 ng/ml)	M(cpm)	12398***	24445***	30575***	24006***	21607**	17453***
	ET	672	1980	414	1415	4081	860
	CV %	5,4	5,6	1,4	5,9	18,9	4,9
IGF2 (50 ng/ml) UF 2,5%	M(cpm)	17894***	39488***	46972***	24678***	18642*	13312*
	ET	1176	1399	2145	665	1901	1539
	CV %	6,6	3,5	4,6	2,7	10,2	11,6
IGF2 (50 ng/ml) UF 5 %	M(cpm)	18732***	37483***	39218***	25980***	15558*	12909*
	ET	698	1749	6742	1790	632	579
	CV %	3,7	4,7	17,2	6,9	4,1	4,5
IGF2 (50 ng/ml) UF 10 %	M(cpm)	23860***	39875***	40517***	25456***	9140°	9786°
	ET	3238	2231	509	3069	1442	255
	CV %	13,6	5,6	1,3	12,1	15,8	2,6

Tableau XV : Mesure de l'activité mitogénique d'IGF2 et d'IGF2 utilisé avec les UF de sérums d'animaux. L'activité des essais est comparée au témoin correspondant (test-t de Student).

* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ (augmentation) ° $p < 0,05$ (diminution).

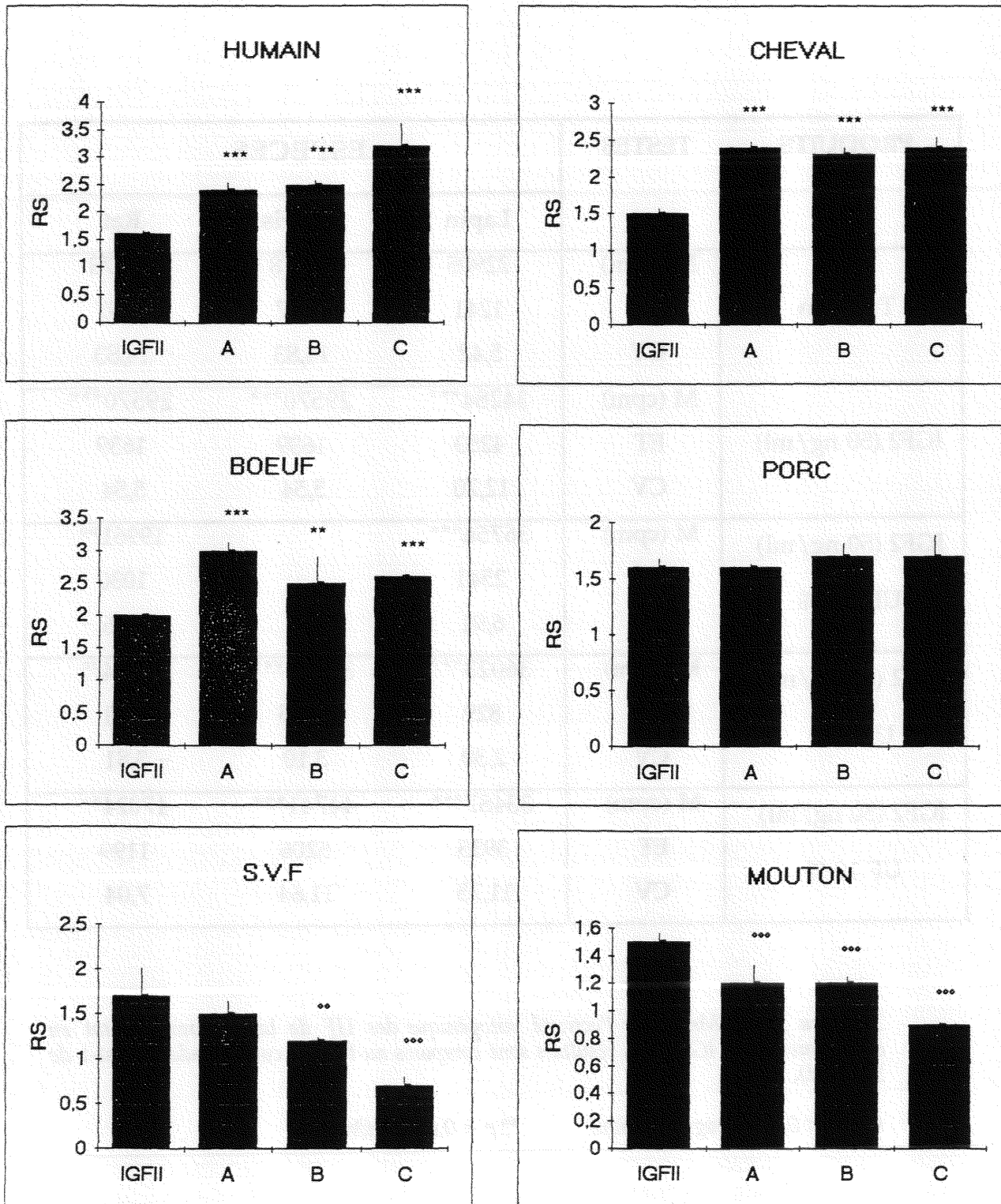


Fig. 29 : Mesure de l'activité mitogénique de IGF2 et IGF2 associé aux UF de sérums d'animaux. Les résultats sont exprimés en rapport de stimulation (RS). Chaque essai est comparé aux valeurs d'IGF2 seul (test-t de Student).

IGF2 seul ; A = IGF2 + 2,5 % UF ; B = IGF2 + 5 % UF ; C = IGF2 + 10 % UF

** p < 0,01 *** p < 0,001 (augmentation) °° p < 0,01 °°° p < 0,001 (diminution)

PRODUITS	TESTES	ESPECES		
		Lapin	Souris	Rat
Témoin	M (cpm)	22905	20678	20678
	ET	1241	3067	3067
	CV	5,42	14,83	14,83
IGF2 (50 ng/ml)	M (cpm)	34284***	29570***	29570***
	ET	4253	1639	1639
	CV	12,70	5,54	5,54
IGF2 (50 ng/ml) UF 2,5 %	M (cpm)	36756***		19961 ^{oo}
	ET	2541		1030
	CV	6,91		5,16
IGF2 (50 ng/ml) UF 5 %	M (cpm)	36023***	37283***	16894 ^{oo}
	ET	829	1155	643
	CV	2,30	3,10	3,81
IGF2 (50 ng/ml) UF 10 %	M (cpm)	33487***	44741***	17024 ^{oo}
	ET	3935	5206	1199
	CV	11,75	11,64	7,04

Tableau XVI : Mesure de l'activité mitogénique des UF de lapin, souris et rat en combinaison avec IGF2. Les résultats sont comparés au témoin correspondant (test-t de Student).

*** $p < 0,001$ (augmentation)

^{oo} $p < 0,01$ (inhibition)

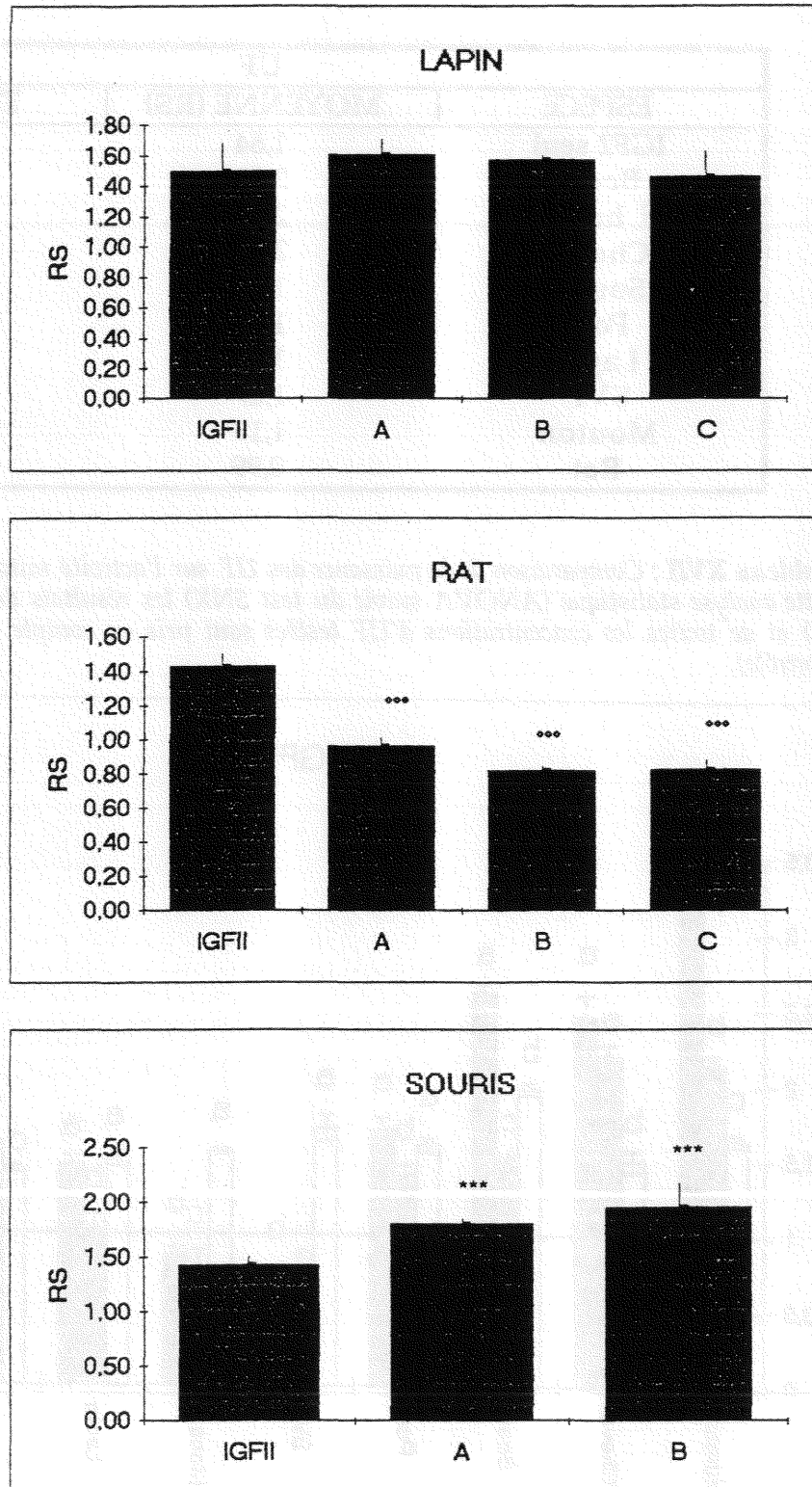


Fig. 30 : Mesure de l'activité mitogénique d'IGF2 et IGF2 associé aux UF de sérum d'animaux. Les résultats sont exprimés en rapport de stimulation (RS). Chaque essai est comparé aux valeurs d'IGF2 seul (Test-t de Student).

IGF2 seul ; A = IGF2 + 2,5 % UF ; B = IGF2 + 5 % UF ; C = IGF2 + 10 % UF

*** $p < 0,001$ (augmentation) ^{ooo} $p < 0,001$ (diminution)

UF		
ESPECE	MOYENNE (RS)	TEST SNK
IGF2 seul	1,64	
Boeuf	2,53	a
UF humain	2,35	b
Cheval	2,18	c
Souris	1,75	d
Porc	1,67	d
Lapin	1,54	e
SVF	1,27	f
Mouton	1,19	f
Rat	0,99	g

Tableau XVII : Comparaison de la puissance des UF sur l'activité mitogénique d'IGF2. Pour cette analyse statistique (ANOVA suivie du test SNK) les résultats de plusieurs expériences (3) et de toutes les concentrations d'UF testées sont pris en compte (RS = cpm essai/cpm contrôle).

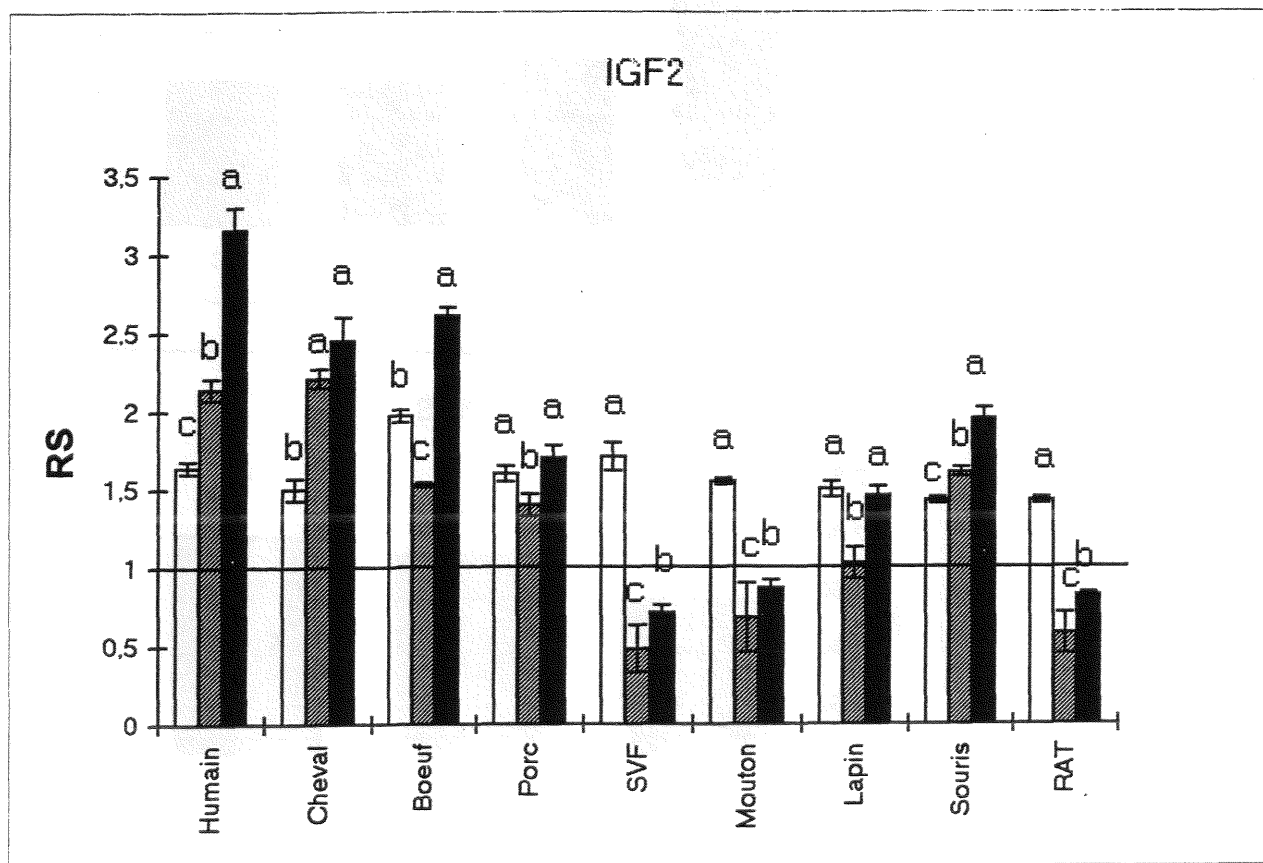


Fig. 31 : Activité mitogénique d'IGF2 (15 ng/ml) , d'UF 10% et IGF2 associé à UF 10% . Les résultats sont exprimés en rapport de stimulation (RS). Pour chaque espèce un test Anova suivi d'un test de Student Newman Keuls (distribution normale) ou un test de Kruskal-Wallis suivi d'un test de Dunn ont été effectués. a, b, c sont significativement différents ($p < 0,05$) et $a > b > c$ pour chaque groupe de résultat.

III-1.2. Recherche par test ELISA de HWESAS dans des sérums d'animaux.

Des UF d'animaux ont une activité mitogénique, cette activité est-elle due aux peptides identifiés dans le sérum humain ? Des anticorps monoclonaux spécifiques anti-HWESAS ayant été préparés au laboratoire (Capiaumont, 1999 ; Capiaumont *et al.* 2000), ils ont été utilisés pour vérifier si le peptide HWESAS était également présent dans des sérums d'animaux.

Des gammes sont réalisées avec des concentrations croissantes de HWESAS fixées sur les microplaques selon la technique décrite dans Matériel et Méthodes § II-4.1. La figure 32 donne les gammes obtenues pour différentes concentrations d'anticorps (1/100, 1/200, 1/250) en présence de concentration croissante d'HWESAS. La figure 33 représente un agrandissement des courbes précédentes dans les concentrations de HWESAS de 0 - 12 ng puisque c'est dans cette zone de concentrations que les sérums d'animaux répondent.

Avec cette technique quantitative de dosage, nous avons déterminé que l'ultrafiltrat de sérum humain contient selon les sujets entre 2 et 10 mg/l d'HWESAS, l'ultrafiltrat de jument entre 5 et 28 mg/l alors que les ultrafiltrats de cheval ou de poulain en contiennent beaucoup moins, de l'ordre de 1 mg/ml. Les concentrations d'HWESAS dans les ultrafiltrats de boeuf et de génisse sont comprises entre 2,5 et 5 mg/l. L'ultrafiltrat de porc contient environ 20 mg/l d' HWESAS. HWESAS n'a pas été mis en évidence dans le sérum de mouton qui ne présentait pas d'activité biologique.

Ces expériences sont préliminaires, nous travaillons à l'amélioration de la sensibilité de ce dosage. Cependant ces premiers résultats sont encourageants et montrent une relation entre l'activité mitogénique des sérums d'animaux et la présence d'HWESAS dans ces sérums.

III - Résultats

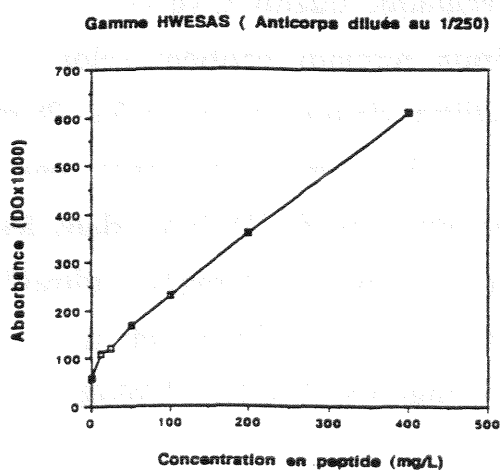
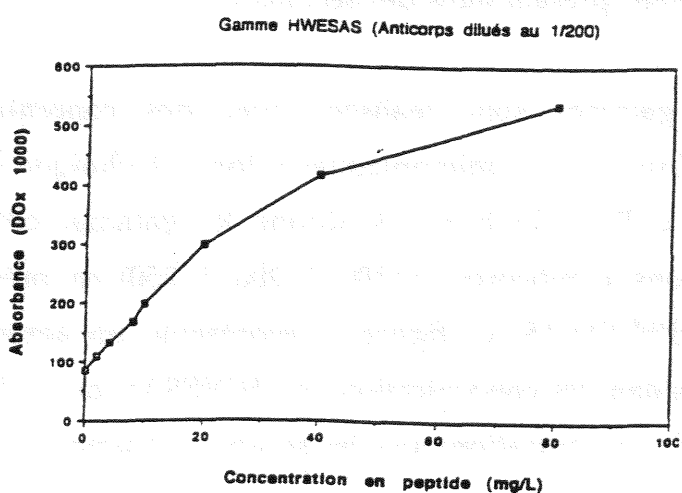
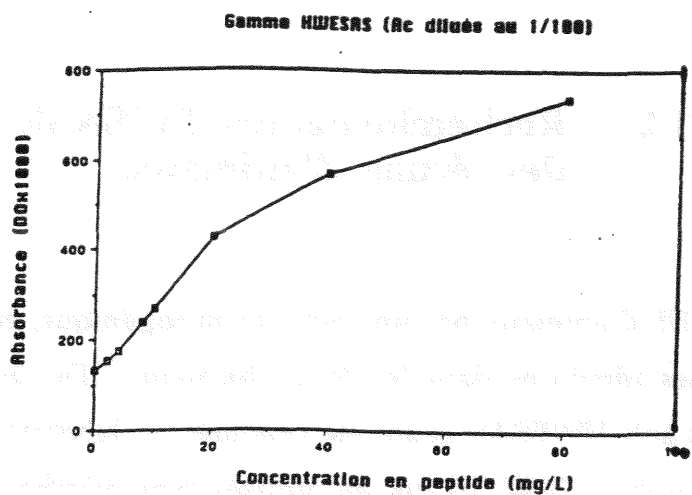


Fig. 32 : Gammes d'étalonnage obtenues avec HWESAS fixé sur des microplaques et des dilutions différentes d'anticorps anti-HWESAS.

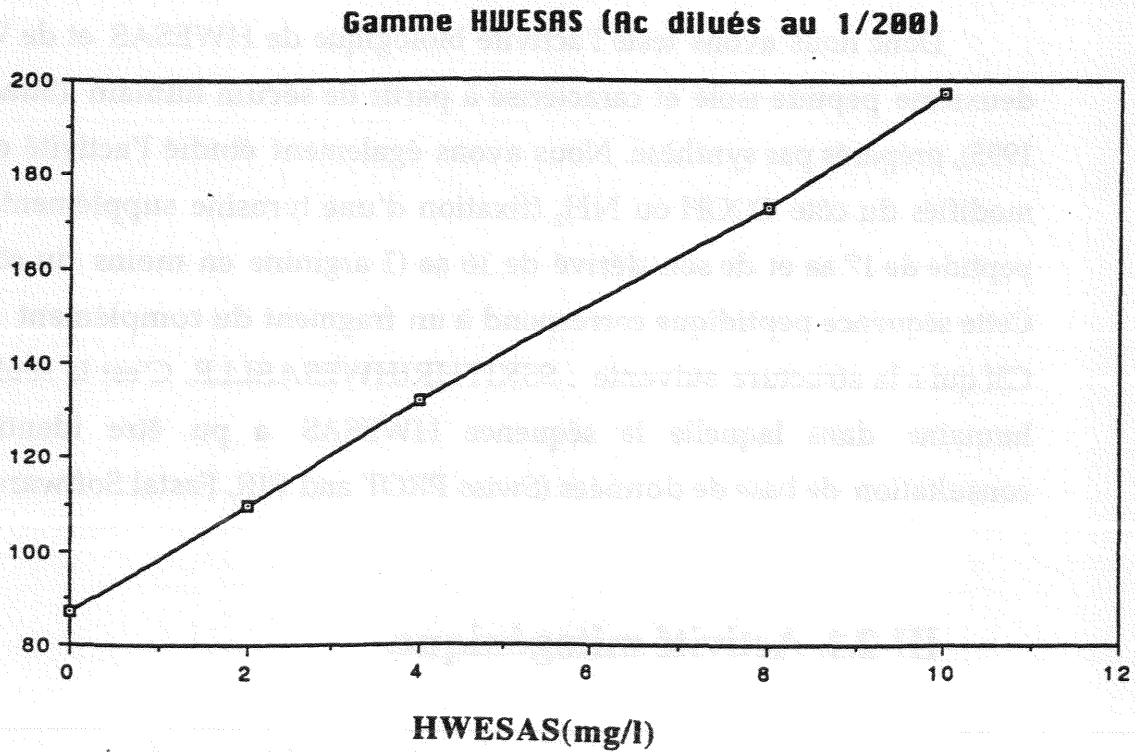
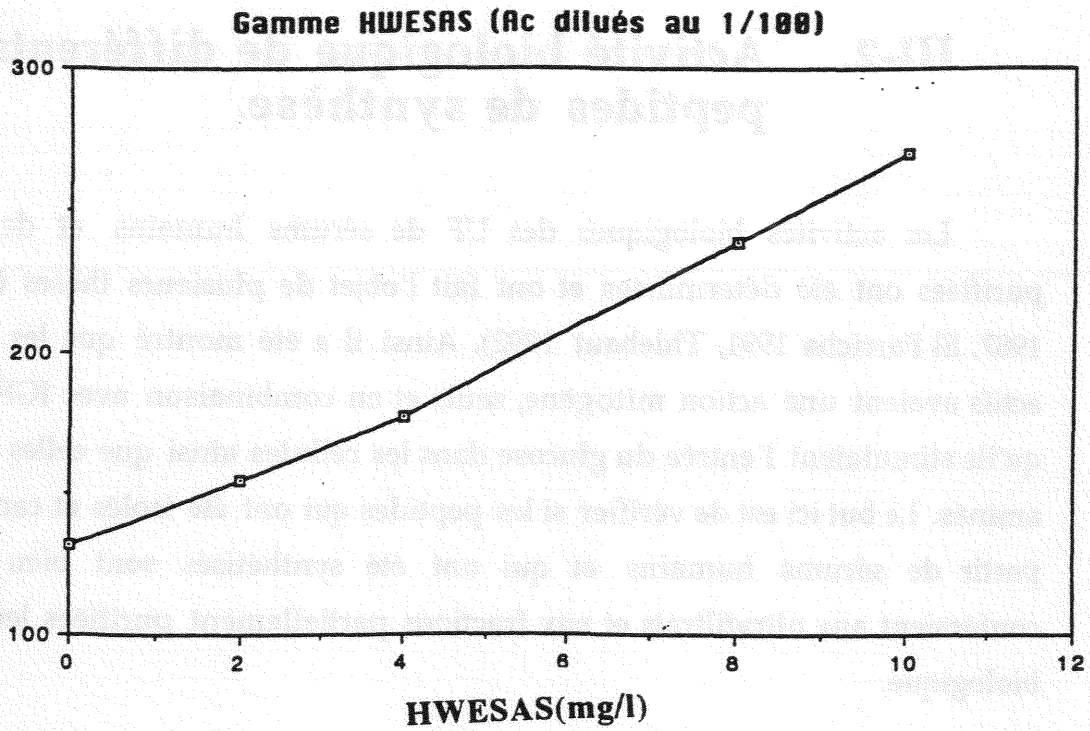


Fig. 33 : Gammes d'étalonnage obtenues avec HWESAS fixé sur des microplaques et des dilutions différentes d'anticorps anti-HWESAS. Agrandissement pour les faibles valeurs des courbes de la figure 32.

III-2. **Activité biologique de différents peptides de synthèse.**

Les activités biologiques des UF de sérums humains et de fractions purifiées ont été déterminées et ont fait l'objet de plusieurs thèses (Rajoalina 1987, El Farricha 1991, Thiebaut 1992). Ainsi il a été montré que les composés actifs avaient une action mitogène, seuls et en combinaison avec IGF1 et IGF2, qu'ils stimulaient l'entrée du glucose dans les cellules ainsi que celles des acides aminés. Le but ici est de vérifier si les peptides qui ont été isolés et caractérisés à partir de sérums humains et qui ont été synthétisés sont bien ceux qui conféraient aux ultrafiltrats et aux fractions partiellement purifiées leur activité biologique.

Donc nous avons testé l'activité biologique de HWESAS et de WGHE, un deuxième peptide isolé et caractérisé à partir de sérum humain (Straczek *et al.*, 1995), préparés par synthèse. Nous avons également étudié l'activité de peptides modifiés du côté COOH ou NH₂ (fixation d'une tyrosine supplémentaire), d'un peptide de 17 aa et de son dérivé de 16 aa (1 arginine en moins du côté COOH). Cette séquence peptidique correspond à un fragment du complément humain le C3f qui a la structure suivante : SSKITHRIHWESASLLR. C'est la seule protéine humaine dans laquelle la séquence HWESAS a pu être identifiée après consultation de base de données (Swiss PROT and PIR, Fastal Software).

III-2.1. **Activité mitogénique.**

III-2.1.1. **Activité mitogénique des peptides seuls.**

Cette activité a été mesurée sur des lignées cellulaires différentes: fibroblastes d'embryons de poulets, cellules 3T6, hybridomes Mark 3 et cellules MCF7.

III-2.1.1.1. Fibroblastes d'embryons de poulets.

Dans cette série d'expériences WGHE, HWESAS, Y-HWESAS, les peptides à 17 aa et 16 aa ont été testés. Le tableau XVIII et la figure 34 donnent les résultats d'une expérience représentative, confirmés par plusieurs expériences identiques :

- WGHE et HWESAS ont, lorsqu'ils sont ajoutés seuls au milieu de culture, une activité mitogénique, les courbes doses/réponse en cloche sont caractéristiques de celles obtenues avec les facteurs de croissance. Le maximum d'effet est obtenu pour 6 ng/ml pour les deux peptides. HWESAS modifié (un acide aminé ajouté du côté NH₂) est soit sans effet soit inhibiteur selon la dose considérée.

- Les peptides de 17 aa et de 16 aa ont également une activité mitogénique, le maximum est obtenu pour une concentration de 12 ng/ml pour le peptide de 17 aa et de 1,5 ng/ml pour le peptide de 16 aa.

Donc les peptides de synthèse présentent une activité mitogénique comme le faisaient les UF de sérums humains, on peut alors supposer qu'une grande partie de l'activité des UF, sinon la totalité, peut être attribuée à la présence de ces deux peptides WGHE et HWESAS.

III-2.1.1.2. Cellules 3T6.

Sur ces cellules ont été mesurées les activités mitogéniques de WGHE et de HWESAS. Deux expériences ont été faites pour chacun des peptides (tableaux XIX et XX, figures 35 et 36) et montrent que :

- WHGE, ajouté seul au milieu de culture, est mitogénique également pour cette lignée fibroblastique. Cependant pour cette lignée l'effet maximum est obtenu avec des concentrations plus importantes du peptide (25 ou 50 ng/ml).

PRODUITS TESTES	CONCENTRATION EN PEPTIDES										ng/ml
	T	1,5	3	6	12	25	50	75			
WGHE	M (cpm)	10694	12207*	13203**	14199**	13404**	13852***	11747	11939		
	ET	542	1025	837	1497	496	769	550	381		
	CV %	5,07	8,39	6,34	10,54	3,70	5,55	4,68	3,33		
HWESAS	M (cpm)	19498	21600	22987**	26208***	23586***	20818	21370			
	ET	1549	2090	1456	2389	724	978	3882			
	CV %	7,94	9,65	6,33	9,12	3,07	4,70	18,17			
YHWESAS	M (cpm)	18697	15822°		18763	20377	17094°	20785*	16535		
	ET	1706	1484		710	792	2512	513	2032		
	CV %	9,12	9,38		3,8	3,89	14,70	2,47	12,29		
17 aa	M (cpm)	18696			20917	22386***	20241*	21312			
	ET	450			3162	525	1500	3027			
	CV %	2,44			15,07	2,34	7,41	14,2			
16 aa	M (cpm)	19144	26030***	25697***	20976	18979					
	ET	1069	1569	424	3073	2720					
	CV %	5,59	6,03	1,65	14,65	14,34					

Tableau XVIII : Effet mitogénique de peptides seuls, mesuré par incorporation de [³H]-thymidine dans des fibroblastes d'embryons de poulets. M = moyenne 6 réplifications, ET = écart-type, CV = coefficient de variation. Les résultats sont comparés au témoin correspondant (milieu seul) par le test-t de Student * p < 0,05 ** p < 0,01 *** p < 0,001 (effet stimulateur) ° p < 0,05 °° p < 0,01 °°° p < 0,001 (effet inhibiteur).

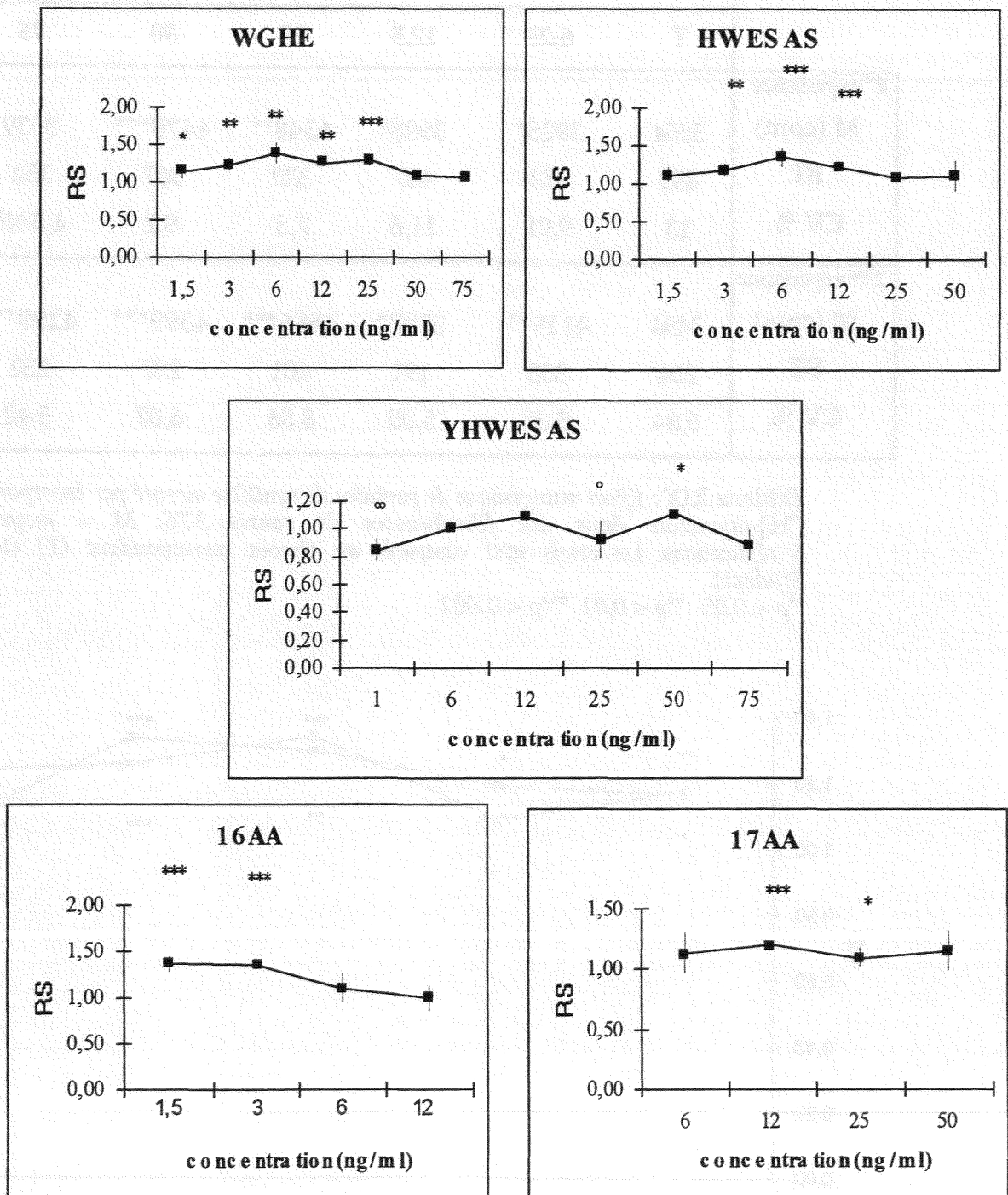


Fig. 34 : Mesure de l'activité mitogénique des peptides seuls mesurée dans des FEP. Les résultats sont exprimés en rapport de stimulation (RS) (test-t de Student).

* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ (augmentation)

° $p < 0,05$ °° $p < 0,01$ (diminution)

	WGHE						SVF
	T	6,25	12,5	25	50	75	10 %
1^{re} expérience							
M (cpm)	3554	3925*	3998*	4348**	4479***	3539	7966***
ET	485	353	467	320	367	154	490
CV %	13	9,01	11,6	7,3	8,2	4,3NS	6,15
2^{ème} expérience							
M (cpm)	3494	4119**	3797*	4686***	4399***	4299***	10084***
ET	204	358	191	401	297	232	679
CV %	5,84	8,69	5,05	8,56	6,07	5,42	6,74

Tableau XIX : Effect mitogénique de peptides de synthèse mesuré par incorporation de [³H]-thymidine dans des fibroblastes de souris 3T6. M = moyenne de 6 réplifications. Les essais sont comparés au témoin correspondant (T) (test-t de Student).

*p < 0,05 **p < 0,01 ***p < 0,001

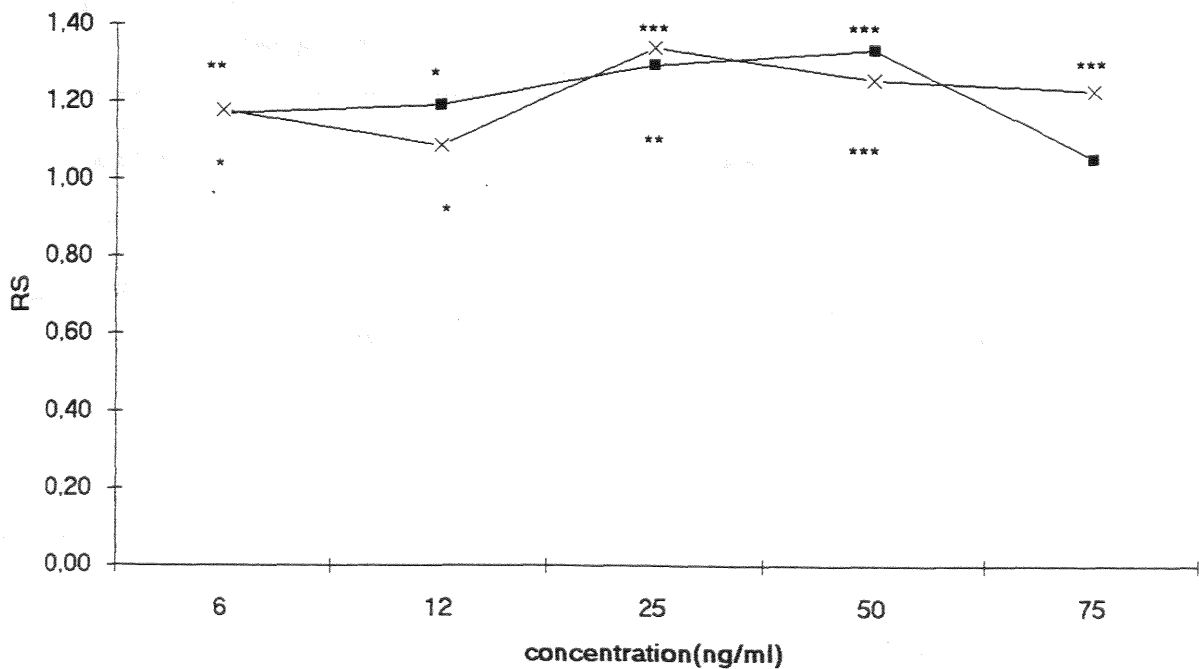


Fig. 35 : Effet mitogénique de WHGE dans des fibroblastes de souris 3T6. Les résultats sont exprimés en rapport de stimulation (RS) et comparés au témoin correspondant (milieu seul) (test-t de Student).

■ 1^{re} expérience X 2^{ème} expérience *p < 0,05 **p < 0,01 ***p < 0,001

	HWESA S ng/ml						SVF
	T	6,25	12,5	25	50	75	10 %
1^{re} expérience							
M (cpm)	3539	3613	4570***	4187**	4068**	3670	7556***
ET	193	237	428	392	313	220	823
CV %	5,4	6,5	9,3	9,3	7,7	6NS	10,9
2^{ème} expérience							
M (cpm)	3494	4986***	5171***	5010***	4647***	4761***	10084***
ET	204	352	478	371	396	400	679
CV %	5,84	7	9,2	7,4	8,5	8,4	6,74

Tableau XX : Effet mitogénique de HWESAS mesuré par incorporation de [³H]-thymidine dans des fibroblastes de souris 3T6. M = moyenne de 6 réplifications. Les essais sont comparés au témoin correspondant T ** p < 0,01 *** p < 0,001 (test-t de Student)

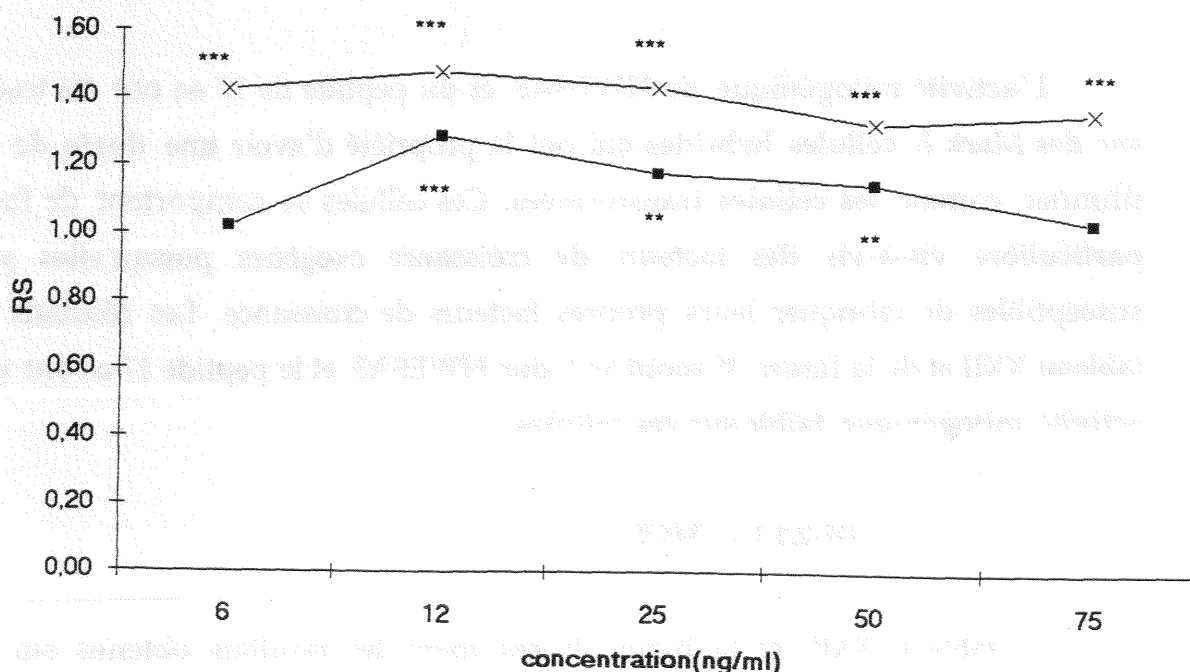


Fig. 36 : Effet mitogénique de HWESAS pour des fibroblastes de souris 3T6. Les résultats sont exprimés en rapport de stimulation (RS) et comparés au témoin correspondant (milieu seul) (test-t de Student).

■ 1^{re} expérience X 2^{ème} expérience ** p < 0,01 *** p < 0,001

- HWESAS est mitogénique pour les cellules 3T6, le maximum d'activité pour les deux expériences est obtenu pour une concentration de 12,5 ng/ml. Le maximum d'effet mitogénique était obtenu à 6 ng/ml pour les FEP.

Ces deux peptides ont une activité mitogénique inférieure à celle du SVF entier.

- L'activité mitogénique du peptide de 17 aa a aussi été testée sur ces cellules, elle est comparable à celle mesurée dans les FEP, si on exclut le point à 50 ng/ml de la première expérience (tableau XXI, figure 37). Ce peptide a une activité mitogénique inférieure à celle du SVF entier qui contient des facteurs de croissance de MM > 5 000 comme EGF PDGF, IGF et les petits facteurs de croissance.

III-2.1.1.3. Mark 3.

L'activité mitogénique de HWESAS et du peptide de 17 aa ont été testées sur des Mark 3, cellules hybrides qui ont la propriété d'avoir une durée de vie illimitée comme les cellules transformées. Ces cellules se comportent de façon particulière vis-à-vis des facteurs de croissance exogènes puisqu'elles sont susceptibles de fabriquer leurs propres facteurs de croissance. Les résultats du tableau XXII et de la figure 38 montrent que HWESAS et le peptide 17 aa ont une activité mitogénique faible sur ces cellules.

III-2.1.1.4. MCF7.

Le tableau XXIII et la figure 39 résument les résultats obtenus sur les cellules MCF7. HWESAS a une action mitogénique importante sur les cellules MCF7, le maximum d'effet observé (rapport de stimulation de 4,3 à 5,56 selon les expériences) l'est pour les doses les plus fortes testées c'est-à-dire 100 ng/ml.

III - Résultats

	17 aa ng/ml						SVF
	T	6,25	12,5	25	50	75	10 %
1^{re} expérience							
M (cpm)	3539	4359***	4162***	4008**	4689***	3437 NS	7978***
ET	193	238	296	297	438	253	748
CV %	5,4	5,4	7,1	6	9,35	7,3	9,4
2^{me} expérience							
M (cpm)	3354	4670***	4958***	4419**	4139**	3606 NS	7966***
ET	485	263	331	429	326	270	490
CV %	14,4	5,6	6,7	9,7	8,7	7,5	6,15

Tableau XXI : Effet mitogénique du peptide de synthèse de 17 aa mesuré par incorporation de [³H]-thymidine dans des fibroblastes de souris 3T6. M = moyenne de 6 réplifications. Les essais sont comparés au témoin correspondant (T) (test-t de Student) ** p < 0,01 *** p < 0,001

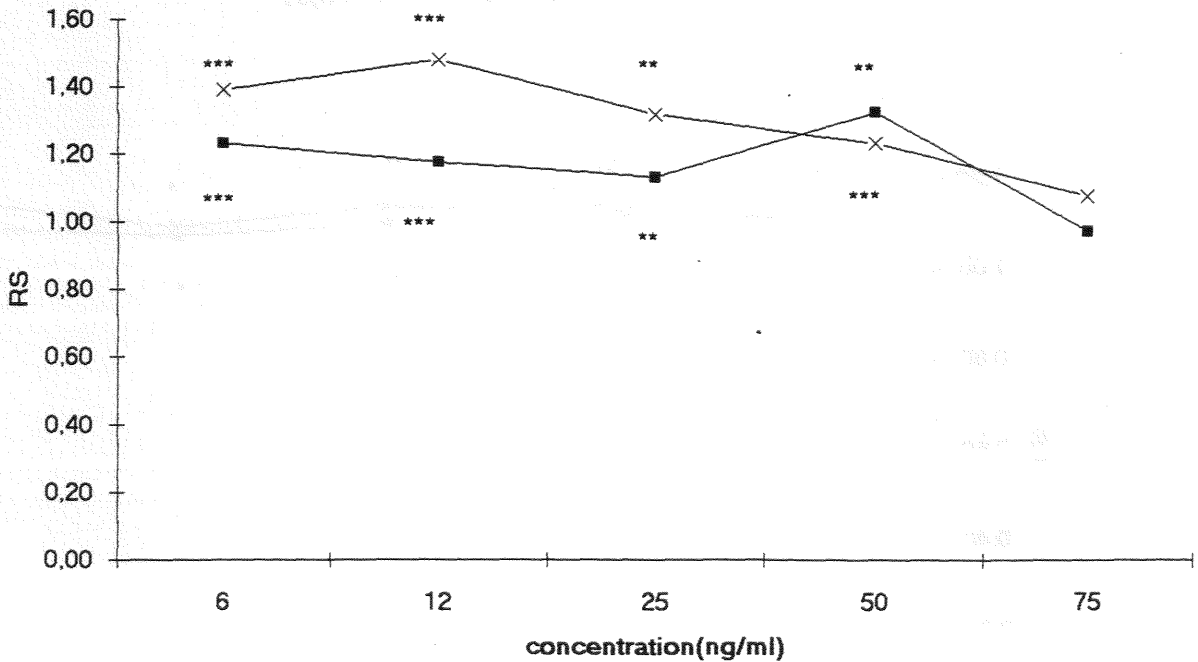


Fig. 37 : Effet mitogénique du peptide à 17 aa sur des fibroblastes de souris 3T6. Les résultats sont exprimés en rapport de stimulation (RS) et comparés au témoin correspondant (milieu seul) (test-t de Student).

■ 1^{re} expérience X 2^{me} expérience ** p < 0,01 *** p < 0,001

	PEPTIDES						SVF
	T	6,25	12,5	25	50	100	10 %
HWESAS							
M (cpm)	94559	105411*	118284**	106023*	104479*	106884**	
ET	7855	3675	2377	5738	7660	4954	
CV %	8,3	3,49	6,21	5,41	7,33	4,64	
17 aa							
M (cpm)	94559	100421	107605**	109900**	106249*	112340**	
ET	7855	12073	3743	4174	5069	6264	
CV %	8,3	12	3,4	3,8	4,77	5,58	

Tableau XXII : Activité mitogénique de HWESAS et du peptide de 17 aa mesurée sur des cellules hybridomes Mark 3. Les résultats des essais sont comparés au témoin (milieu seul) (test-t de Student). * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$

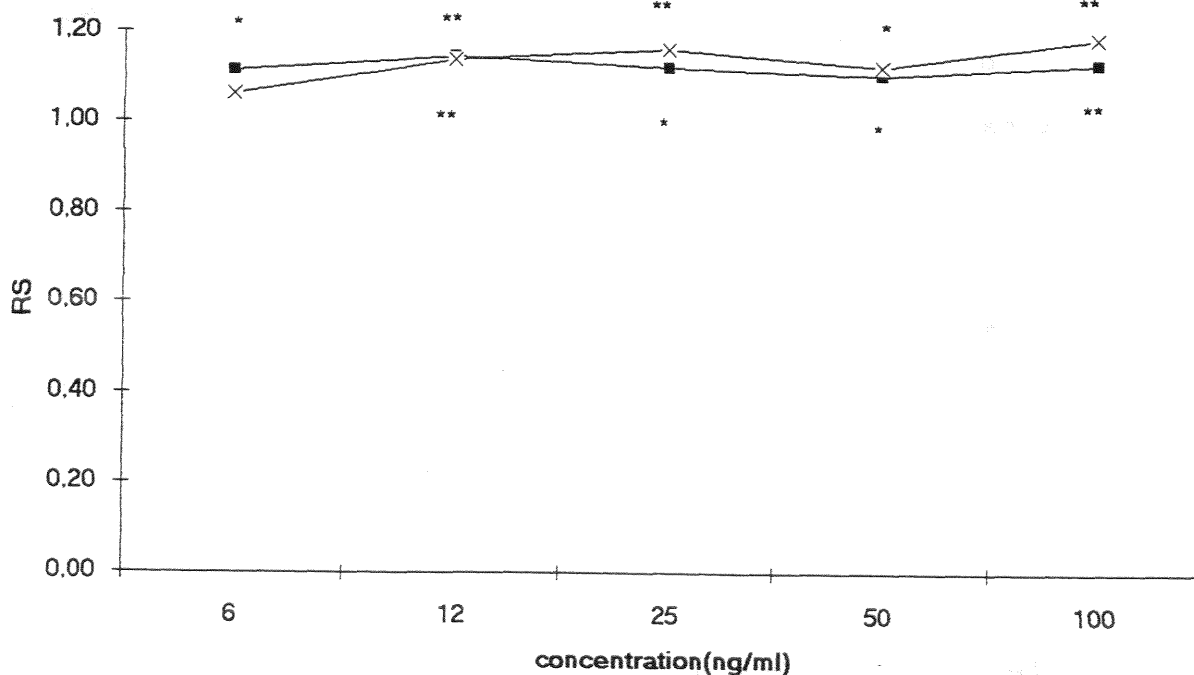


Fig. 38 : Mesure de l'activité mitogénique de HWESAS et du peptide de 17 aa mesurée sur des cellules Mark 3. Les résultats sont exprimés en rapport de stimulation (RS) (test-t de Student).

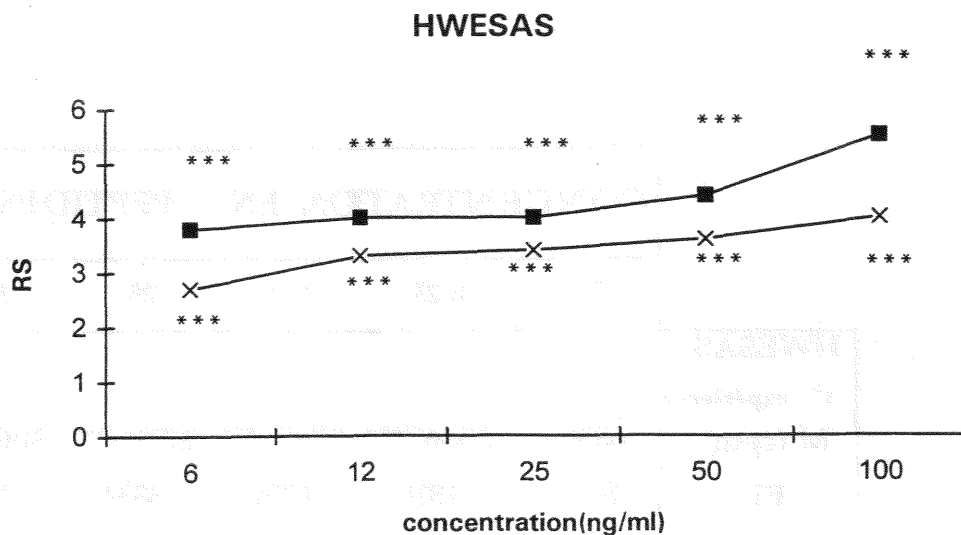
■ HWESAS x 17 aa * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ (augmentation)

		CONCENTRATION EN PEPTIDES ng / ml						
		T	6,25	12,5	25	50	75	100
HWESAS								
1 ^{ère} expérience								
M (cpm)	6830	25867***	27676***	27789***	30086***			37981***
ET	819	1810	4704	3334	2707			2658
CV %	12	7	17	12	9			7
HWESAS								
2 ^{ème} expérience								
M (cpm)	6830	18577***	22305***	231246***	24739***			29462***
ET	819	2600	2007	3951	1979			2946
CV %	12	14	9	17	8			10
17 aa								
M (cpm)	7188	6045°	8449**	10777***	9218***	12557***		
ET	567	990	591	397	278	729		
CV %	7,9	13,6	7	3,7	3	5,8		

Tableau XXIII : Activité mitogénique de HWESAS et du peptide de 17 aa mesurée sur des cellules MCF7. Les résultats des essais sont comparés au témoin (milieu seul) (test-t de Student).

** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ (augmentation) ° $p < 0,05$ (diminution)

A)



B)

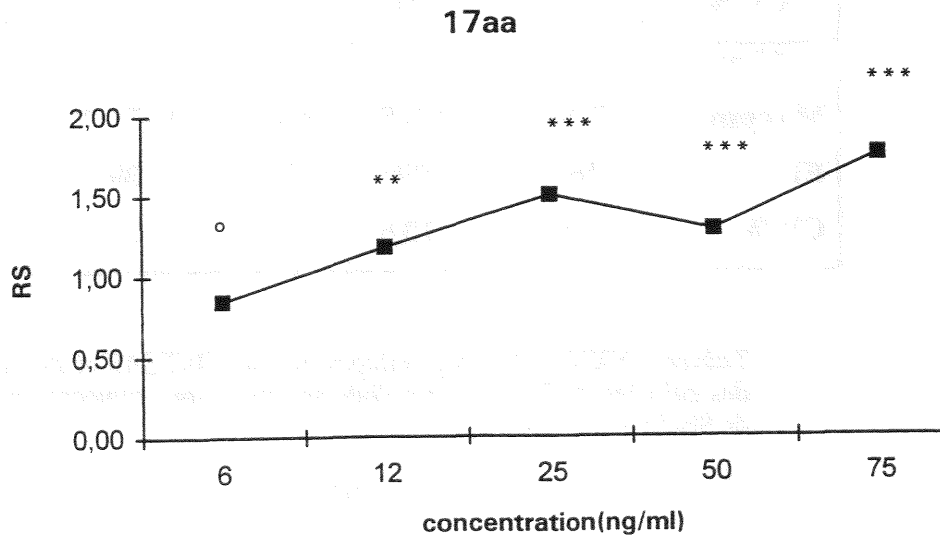


Fig. 39 : Mesure de l'activité mitogénique de HWESAS (A) et du peptide de 17 aa (B) mesurée sur des cellules MCF7. Les résultats des essais sont comparés au témoin (test-t de Student).

■ 1^{ère} expérience X 2^{ème} expérience
 ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ (augmentation) ° $p < 0,05$ (diminution)

Cependant l'effet mitogénique est très significatif déjà avec la première dose testée c'est-à-dire 6,25 ng/ml.

Le peptide de 17 aa a également une action mitogénique, cette action n'est significative que pour les plus fortes doses (de 12,5 à 75 ng/ml).

En conclusion, de toutes ces expériences de mitogénicité, nous avons fait un tableau récapitulatif indiquant le rapport de stimulation maximum et la concentration pour laquelle il a été obtenu (tableau XXIV).

	HWESAS	WGHE	17 aa	16 aa
Fibroblastes d'embryons de poulets	1,34 (6 ng)	1,32 (6 ng)	1,19 (12 ng)	1,35 (1,5 ng)
3 T 6	1,48 (12,5 ng)	1,34 (25 ng)	1,47 (12,5 ng)	-
Mark 3	1,25 (12,5 ng)	-	1,19 (25 ng)	-
MCF7	5,56 (100 ng)	-	1,74 (75 ng)	-

Tableau XXIV : Tableau récapitulatif indiquant le rapport de stimulation maximum et la dose pour laquelle il est obtenu.

III-2.1.2 Activité mitogénique des peptides de synthèse en présence d'IGF1.

III-2.1.2.1. Fibroblastes d'embryons de poulets.

Dans cette série d'expériences l'activité mitogénique d'IGF1 a été testée en présence des mêmes peptides que ceux précédemment étudiés sur des FEP, de plus a été ajouté un peptide modifié du côté COOH : HWESAS-Y. Comme pour les expériences avec les sérums d'animaux, la concentration de 15 ng/ml d'IGF1 a été choisie. Chacun des peptides a été testé dans des expériences indépendantes ce qui explique la différence des cpm pour les témoins et pour IGF1 seul. Cependant on constate que les rapports de stimulation (IGF1/témoin) varient peu au cours d'expériences différentes. Ce rapport est en moyenne de $1,56 \pm 0,08$ (n = 6). Il est un peu plus faible que celui obtenu lors des expériences faites avec les sérums d'animaux, ceci peut être dû aux lots différents d'IGF1 utilisés et à la conservation plus ou moins longue de ce produit.

Les résultats de l'effet mitogénique des peptides utilisés simultanément avec IGF1 sont rassemblés dans le tableau XXV et la figure 40.

- WGHE, HWESAS, HWESAS-Y, Y-HWESAS augmentent l'effet mitogénique d'IGF1. Le peptide le plus actif dans ce système est HWESAS pour lequel le maximum d'activité est obtenue avec 6 ng/ml.

- Pour WGHE, le maximum d'effet est obtenu pour une concentration de 12 ng/ml.

- Le peptide HWESAS-Y a une activité similaire à celle d'HWESAS mais le blocage de NH₂ terminal(Y-HWESAS) diminue l'activité du peptide au moins pour les doses > 12 ng/ml.

- Il n'y a pas d'interaction significative entre le peptide de 17 aa et l'IGF1, le peptide de 16 aa est soit sans effet soit inhibiteur de l'activité d'IGF1 alors que testé seul, il avait une activité mitogénique significative déjà à faible concentration. Les résultats de l'analyse de l'interaction peptide-IGF (ANOVA multifactorielle) sont résumés dans la figure 41 et 41 bis.

PRODUITS TESTES		IGF1 (15 ng/ml) + PEPTIDES ng/ml									
		T	IGF1	1	3	6	12	25	50	75	100
WGHE	M (cpm)	14961	24168***	28947***	29785***	34433***	33256***	30083***	25163***		
	ET	225	3410	585	5959	2755	6060	1429	1369		
	CV %	2	14,0	2	17,7	8	18,0***	4,75	5,4		
HWESAS	M (cpm)	19856	28834***	47681***	63314***	48857***	38339***	43127***	37932***		
	ET	2696	727	7349	3437	9062	3067	2908	1085		
	CV %	13,57	2,52	15,41	5,43	18,5	8	6,74	2,9		
HWESASY	M (cpm)	22383	36333***	42979***	42553***	49941***	38831**	38065***	37111***		
	ET	883	884	5340	2427	2546	1257	960	6001		
	CV %	3,95	2,43	12,4	5,7	5,10	3,24	2,52	16,17		
Y-HWESAS	M (cpm)	14849	21601***	32983***	31627***	29092***	21037***	19378***			
	ET	1087	1604	1463	3510	4911	305	863			
	CV %	7,32	7,42	4,44	11,1	16,88	14,5	4,50			
17 aa	M (cpm)	14857	23334***	23045***	24589***	29441***	22661***	24724***			
	ET	1800	1404	2108	2709	2296	3926	1898			
	CV %	12,12	6,02	9,15	11,02	7,80	17,32	7,68			
16 aa	M (cpm)	19144	32278***	26589***	33849***	27411***	27696***	23796***			
	ET	1069	3223	1646	4264	1485	2892	677			
	CV %	5,59	9,98	6,19	12,6	5,41	10,44	2,84			

Tableau XXV : Activité mitogénique de peptides de synthèse testée en présence d'IGF1 dans des fibroblastes d'embryons de poulets. La mesure se fait par incorporation de [³H]-thymidine. Les résultats sont la moyenne de 6 répétitions. Les résultats sont comparés aux témoins correspondant ** p < 0,01 *** p < 0,001 (effet stimulateur).

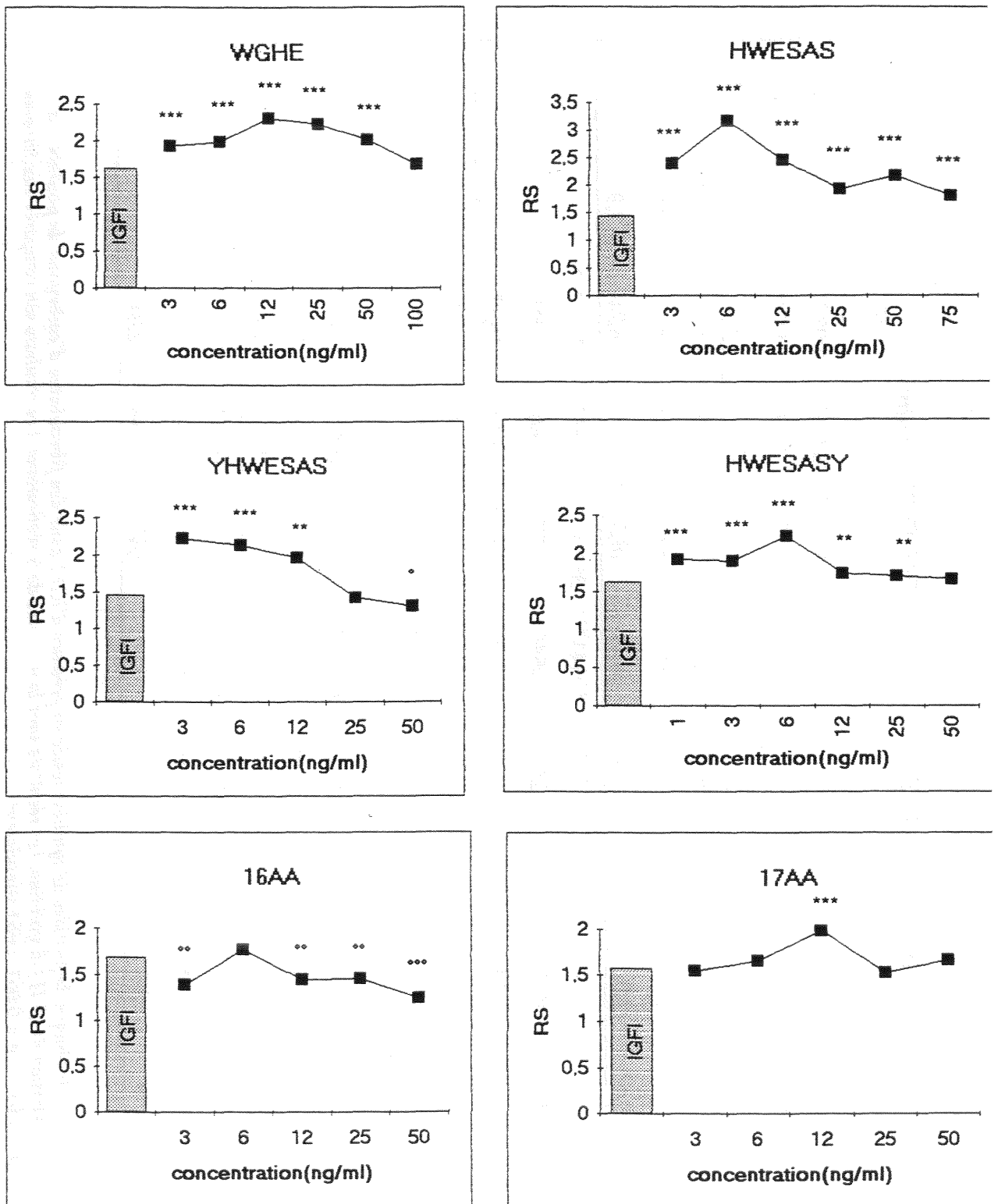


Fig. 40 : Mesure de l'activité mitogénique des peptides en combinaison avec IGF1 dans des FEP. Les résultats sont exprimés en rapport de stimulation et les essais sont comparés à IGF1 seul par un test-t de Student.

** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ (stimulation) ° $p < 0,05$ °° $p < 0,01$ °°° $p < 0,001$ (inhibition)

III - Résultats

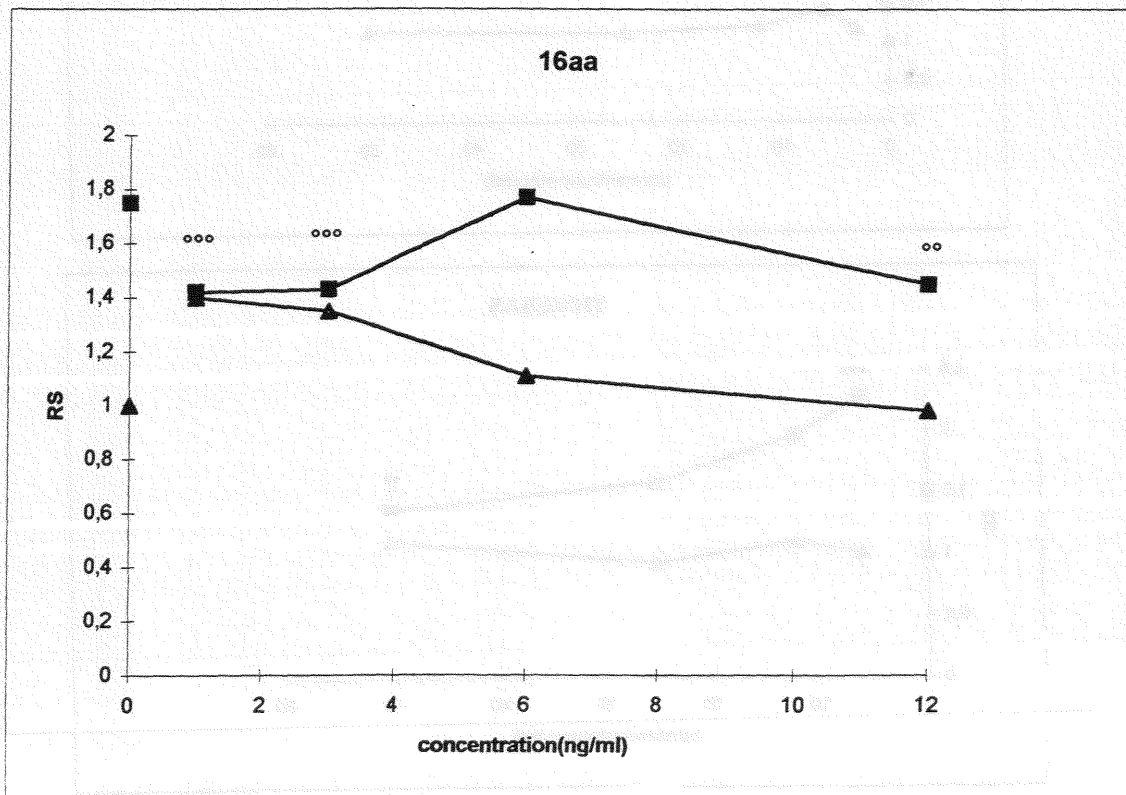
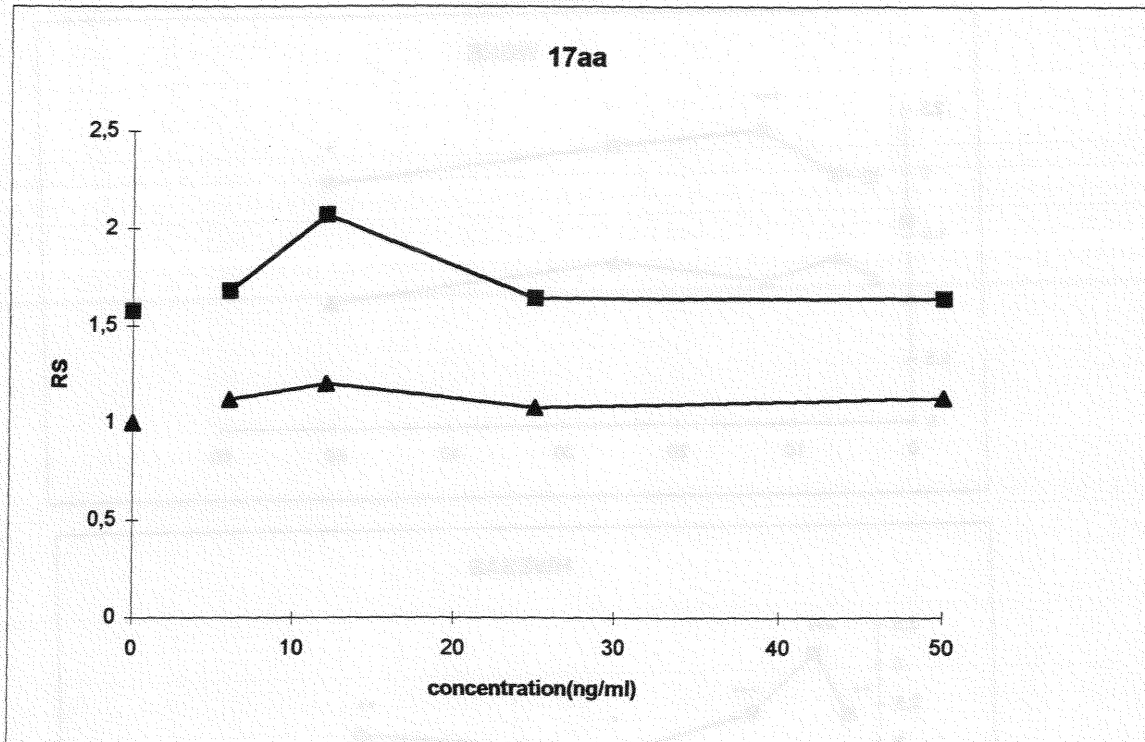


Fig. 41 : Résultats de l'interaction des peptides et d'IGF1. L'analyse statistique utilisée est l'analyse de variance ANOVA multifactorielle.

°° $p < 0,01$ °°° $p < 0,001$ (Interaction négative)

▲ peptide seul

■ IGF1+ peptide

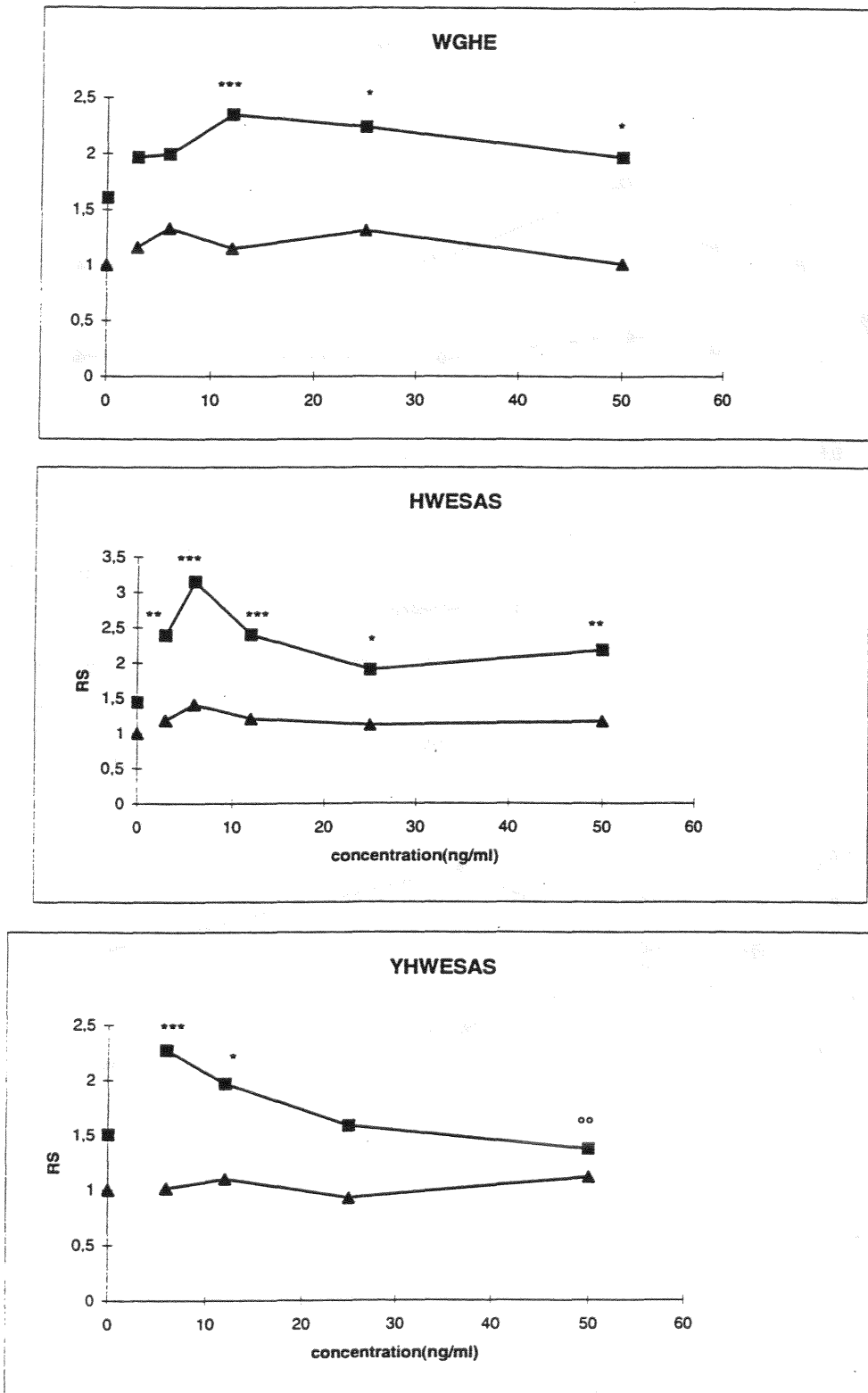


Fig. 41 B : Résultats de l'interaction des peptides et d'IGF1. L'analyse statistique utilisée est l'analyse de variance ANOVA multifactorielle.

* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ (Interaction positive)

°° $p < 0,01$ (Interaction négative)

▲ peptide seul

■ IGF1 + peptide

III-2.1.2.2. MCF 7.

HWESAS et le peptide de 17 aa ont été testés en présence d'IGF1 (25 ng / ml). Les résultats sont donnés dans le tableau XXVI et la figure 42.

- Sur ces cellules et dans une première expérience, le rapport de stimulation d'IGF1 est plus élevé que celui obtenu sur les fibroblastes d'embryons de poulets (mais nous avons utilisé 25 ng/ml au lieu de 15 ng/ml) alors que dans une seconde expérience, il était plus faible.

L'addition d'HWESAS n'augmente pas significativement l'activité mitogénique d'IGF1.

- L'expérience avec le peptide de 17 aa est difficile à interpréter car dans cette expérience, IGF1 est inactif. Par manque de peptide de 17 aa, elle n'a pas pu être recommencée.

III-2.1.2.3. Fibroblastes humains transformés.

L'activité mitogénique de HWESAS et du peptide de 17 aa a été testée sur des fibroblastes humains transformés en présence d'IGF1 (15 ng/ml). Ces cellules sont des cellules de poumon qui ont reçu un plasmide PSV3 exprimant l'antigène T du virus SV 40. Elles ont une durée de vie illimitée.

Les résultats montrent que l'addition de HWESAS n'influence pas l'activité mitogénique d'IGF1 et il est même légèrement inhibiteur à 50 ng/ml.

Le peptide de 17 aa a un effet mitogénique faible non significatif pour une seule concentration (12 ng/ml) (tableau XXVII et figure 43).

	IGF 1 + PEPTIDES						ng/ml
	T	IGF1 25 ng/ml	6,25	12,5	25	50	
HWESAS							
M (cpm)	6830	22202***	20160***	24292***	25994***	21781***	24600***
ET	819	330	2822	2186	1819	4138	5166
CV %	12	15	14	9	7	19	21
17 aa							
M (cpm)	7311	14475*	17949***	25041***	18238***	20120***	19107***
ET	800	450	509	1490	971	825	1305
CV %	10,9	5,6	5,6	10,7	9,6	7,3	12,3

Tableau XXVI : Activité mitogénique d'IGF1 et d'IGF1 + peptide, mesurées sur des cellules MCF7. Les résultats des essais sont comparés au témoin (milieu seul) (test-t de Student).

* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ (stimulation)

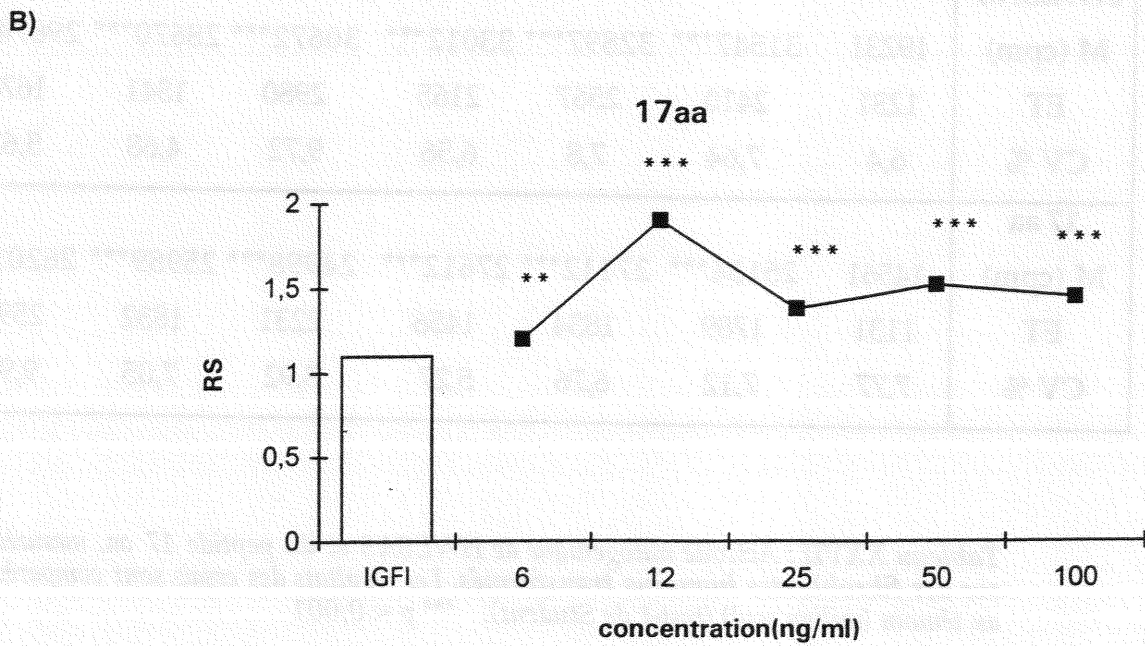
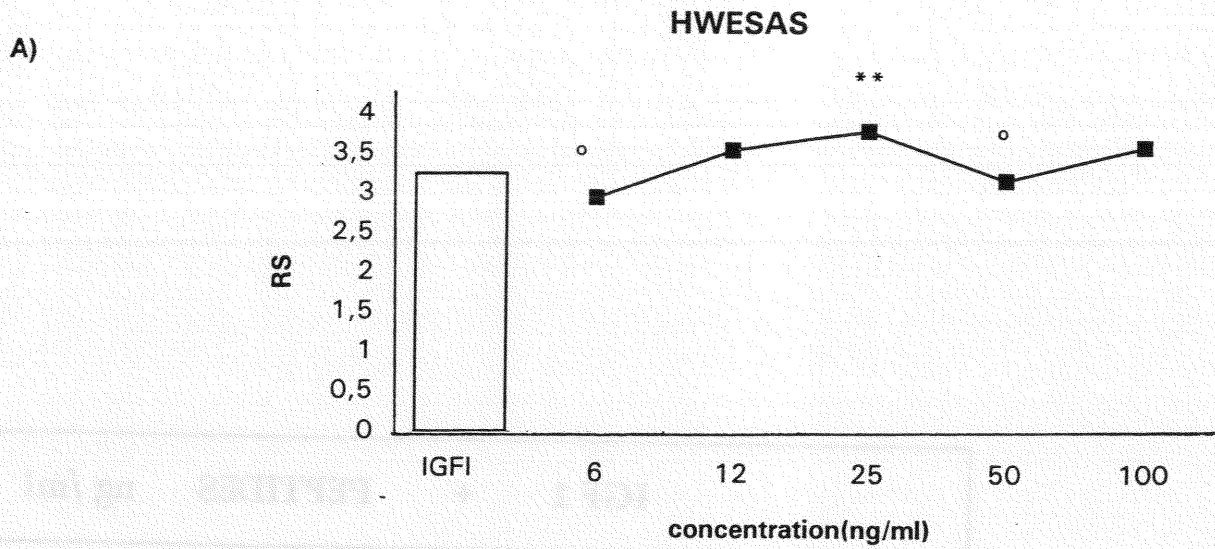


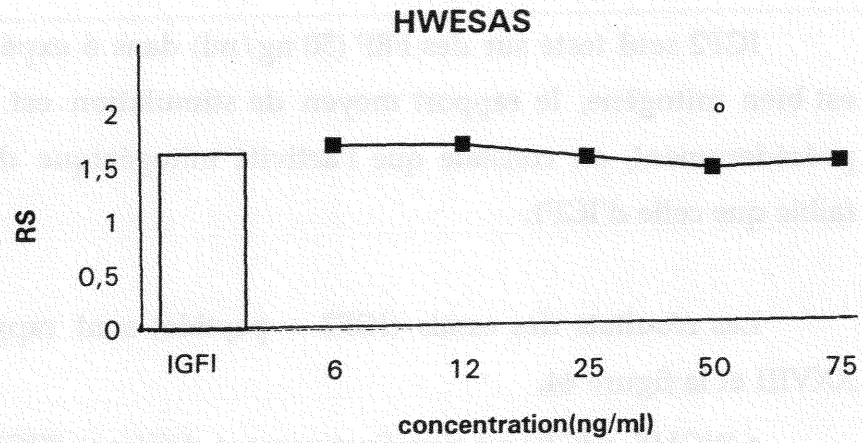
Fig. 42 : Activité mitogénique d'IGF1 et d'IGF1 + peptides mesurée sur des cellules MCF7. Les résultats sont exprimés en RS (cpm essai/cpm témoin). Les résultats IGF1 + peptide sont comparés à IGF1 seul par un test-t de Student.

** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ (augmentation) ° $p < 0,05$ (diminution)

	IGF 1 + PEPTIDES ng /ml						
	T	IGF1 15 ng/ml	6	12	25	50	100
HWESAS							
M (cpm)	19231	31547***	32897***	33012***	30672***	28670***	29874***
ET	1231	2410	2567	2165	2980	1341	1678
CV %	6,4	7,64	7,8	6,56	9,72	4,68	5,62
17 aa							
M (cpm)	14561	25134***	27112***	27612***	24998***	25989***	26201***
ET	1131	1789	1834	1456	2231	1832	2598
CV %	7,77	7,12	6,76	5,27	8,92	7,05	9,92

Tableau XXVII : *Activité mitogénique de HWESAS et du peptide 17 aa, mesurée sur des fibroblastes humains transformés. Les résultats des essais sont comparés au témoin (milieu seul) (test-t de Student). *** p < 0,001*

A)



B)

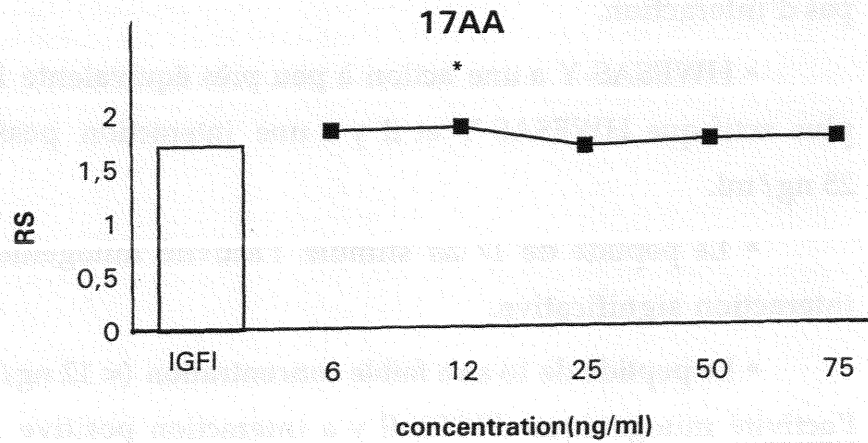


Fig.43: Mesure de l'activité mitogénique de HWESAS (A) et du peptide de 17 aa (B) en combinaison avec IGF1 (15 ng/ml) réalisées sur des fibroblastes humains transformés. Les résultats des essais sont exprimés en RS et les essais (IGF1 + peptide) sont comparés à IGF1 seul (test-t de Student). * $p < 0,05$ (stimulation) ° $p < 0,05$ (inhibition)

III-2.1.3. **Activité mitogénique des peptides en combinaison avec IGF2.**

III-2.1.3.1. **Fibroblastes d'embryons de poulets.**

IGF2 seul testé sur des FEP (50 ng/ml) dans 6 expériences indépendantes est bien mitogène, le rapport moyen de stimulation est de $1,49 \pm 0,1$. Comme précédemment, on constate que l'activité mitogénique d'IGF2 est un peu plus faible que celle d'IGF1.

Les résultats des essais (IGF2 + peptide) sont rapportés dans le tableau XXVIII et la figure 44.

- WGHE + IGF2 est significativement différent d'IGF2 seul. Cependant par le test ANOVA multifactoriel, on ne met pas en évidence une interaction significative (Fig. 45). Il n'y a pas d'WGHE ce qui pourrait signifier que ces composés agissent par des voies de transduction différentes.

- HWESA augmente l'activité d'IGF2 mais plus faiblement que ne le fait WGHE (RS maximal pour 6 ng, versus 3 ng pour WGHE). Cependant il n'y a pas d'interaction.

- HWESAS-Y a une action à peu près équivalente à celle. Y-HWESAS est plus actif que HWESAS-Y et il y a une interaction positive avec IGF2 à 6 et 25 ng/ml.

- Le peptide de 17 aa stimule l'activité mitogénique d'IGF2, mais sans interaction significative.

- Le peptide de 16 aa à faible concentration (< 12 ng/ml) stimule fortement l'activité mitogénique d'IGF2. Il y a interaction positive avec IGF2 à toutes les concentrations testées.

PRODUITS TESTES	IGF2 (50 ng/ml) + PEPTIDES										ng/ml			
	T	IGF2	1	3	6	12	25	50	75	100				
WGHE	M (cpm)	13586	18805***	22031***	23257***	21873***	20304**	20092***	20106***					
	ET	943	2670	690	2148	3316	3790	1059	1537					
	CV %	7,31	1,38	3,13	9,24	15,16	18,7	5,29	7,65					
HWESAS	M (cpm)	15593	22311***		24927***	26780***	23880***	24817***	25464***					
	ET	786	909		2739	3512	1058	973	2082					
	CV %	5,04	4,07		10,99	13,11	4,43	3,92	8,17					
HWESAS-Y	M (cpm)	13194	18859***	23838***	24028***	23533***	21194***	20353***	16301***					
	ET	584	1011	2152	2213	1025	2309	1846	1553					
	CV %	4,42	5,3	9,03	9,21	4,36	10,90	9,07	9,53					
Y-HWESAS	M (cpm)	14019	19267***		25088***	27904***	23388***	21400***	19720***	15792*				
	ET	620	1102		721	4587	1187	1015	3664	1754				
	CV %	4,42	5,7		2,87	16,44	5,08	4,74	18,58	11,10				
17 aa	M (cpm)	14428	20508***		23792***	24364***	25768***	27268***	25812***	22540***				
	ET	932	1916		4508	2112	1960	3088	3396	1820				
	CV %	6,45	9,34		18,95	8,67	7,61	11,32	13,16	8,07				
16 aa	M (cpm)	17812	26617***	59430***	63264***	47646***	48476***	30604***	30640***	29558***				
	ET	2345	3894	5432	5355	1131	4529	3608	3349	395				
	CV %	13,7	14,63	9,14	8,47	2,67	9,34	11,79	10,93	1,34				

Tableau XXVIII : Activité mitogénique de peptides de synthèse testée en présence d'IGF2 dans des fibroblastes d'embryons de poulets. La mesure se fait par incorporation de [³H]-thymidine. Les résultats sont la moyenne de 6 répétitions. Les essais sont comparés au témoin correspondant (test-t de Student) * p < 0,05 ** p < 0,01 *** p < 0,001 (effet stimulateur)

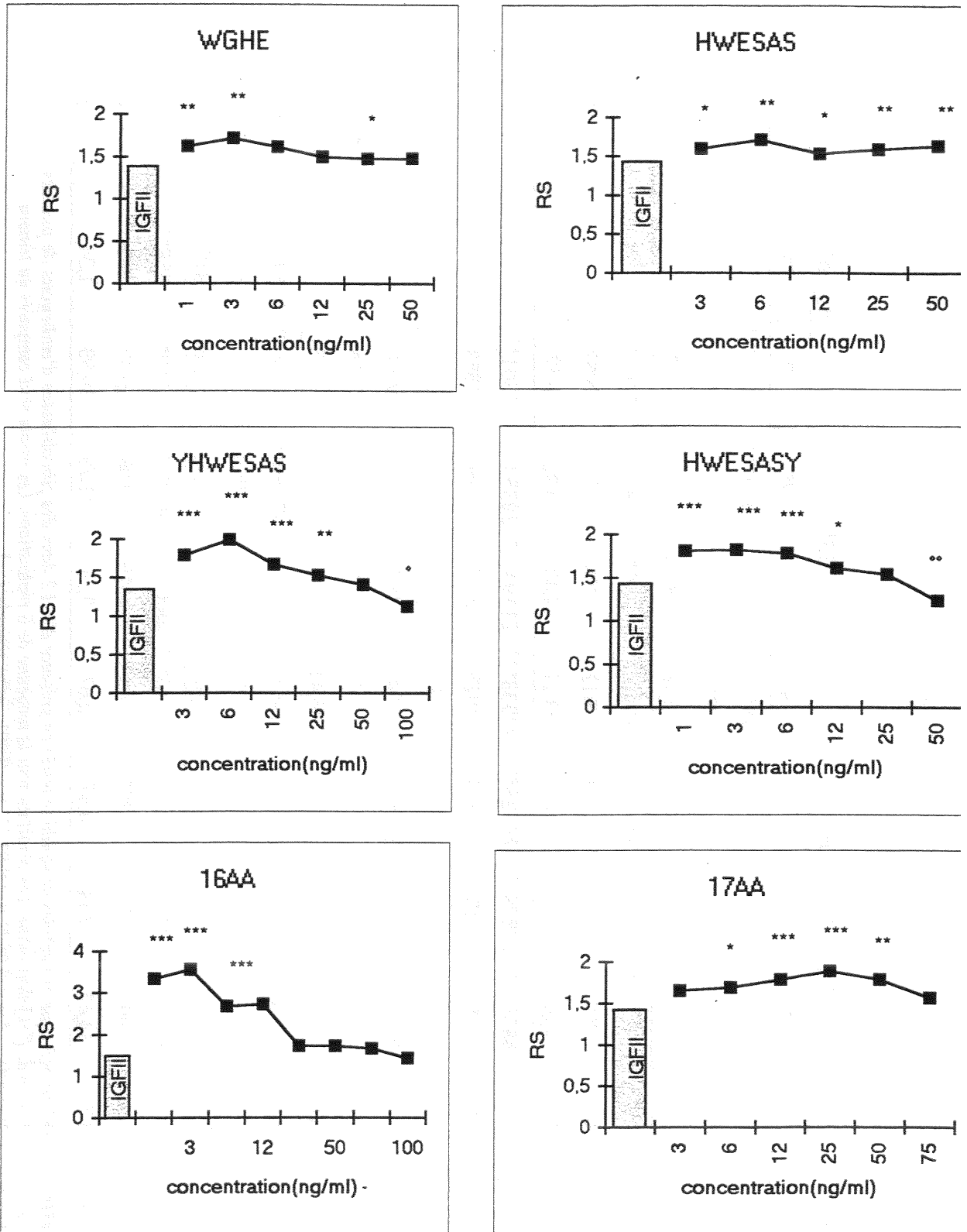


Fig. 44 : Mesure de l'activité mitogénique des peptides en combinaison avec IGF2. Les résultats sont exprimés en rapport de stimulation et les essais sont comparés à IGF2 seul par un test-t de Student.

* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ (stimulation) ° $p < 0,05$ °° $p < 0,01$ (diminution)

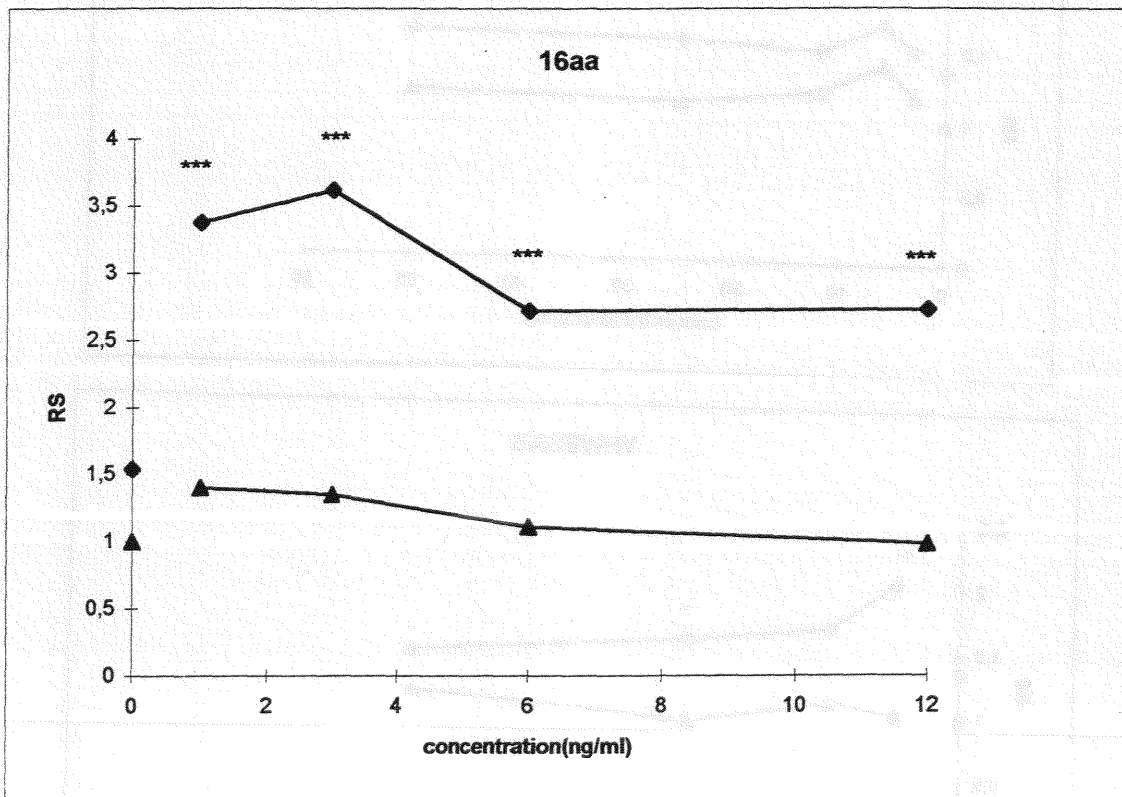
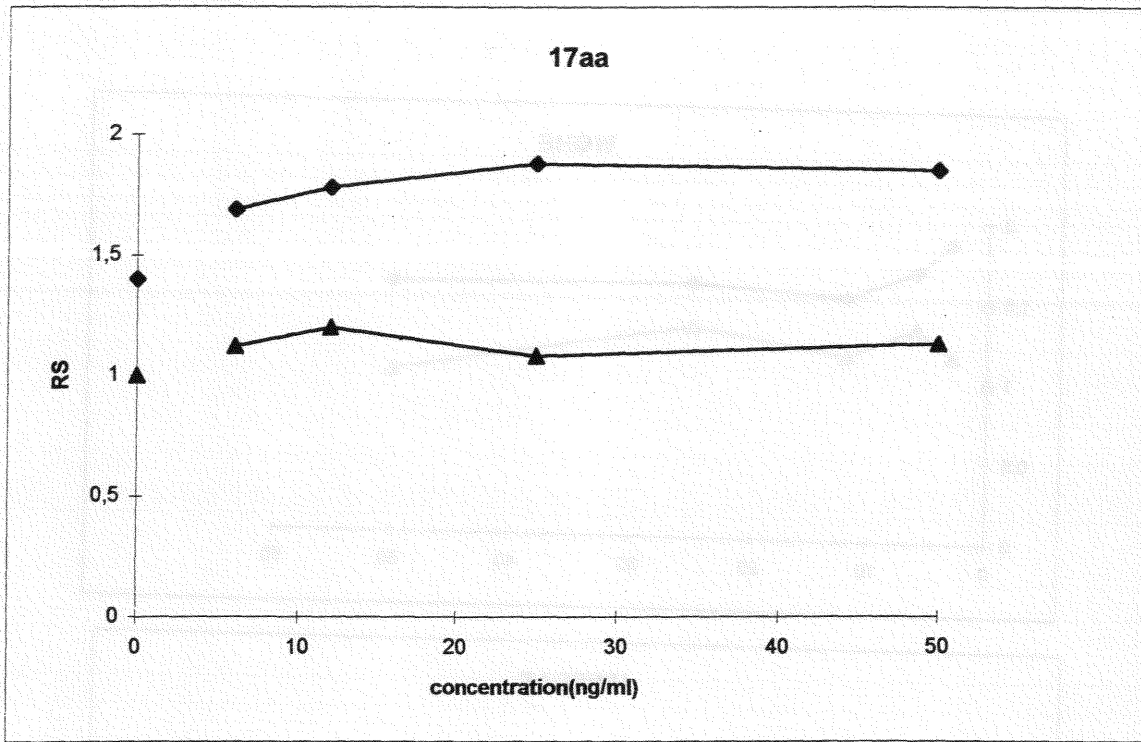


Fig. 45 : Résultats de l'interaction des peptides et d'IGF2. L'analyse statistique utilisée est l'analyse de variance ANOVA multifactorielle.

* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ (interaction positive)

▲ peptide seul

■ IGF2 + peptide

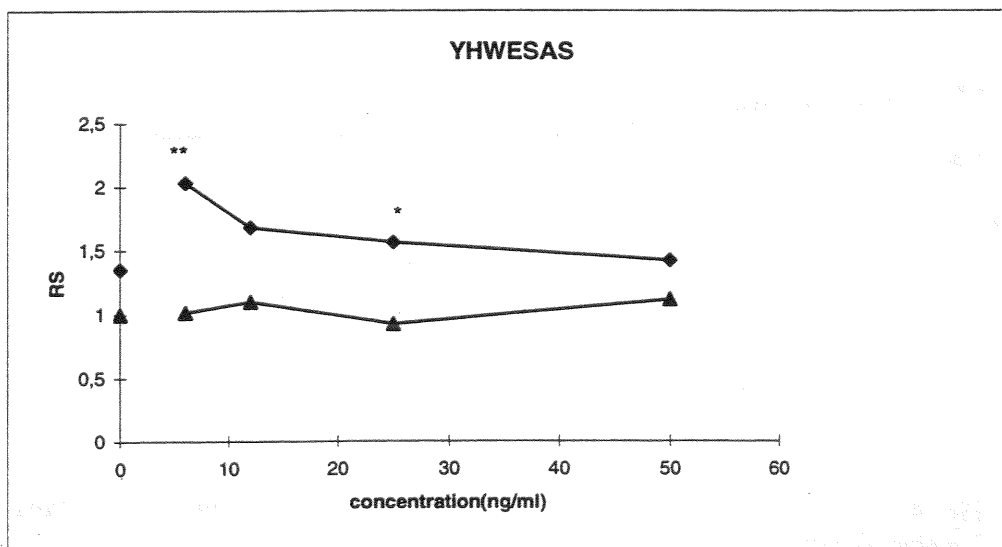
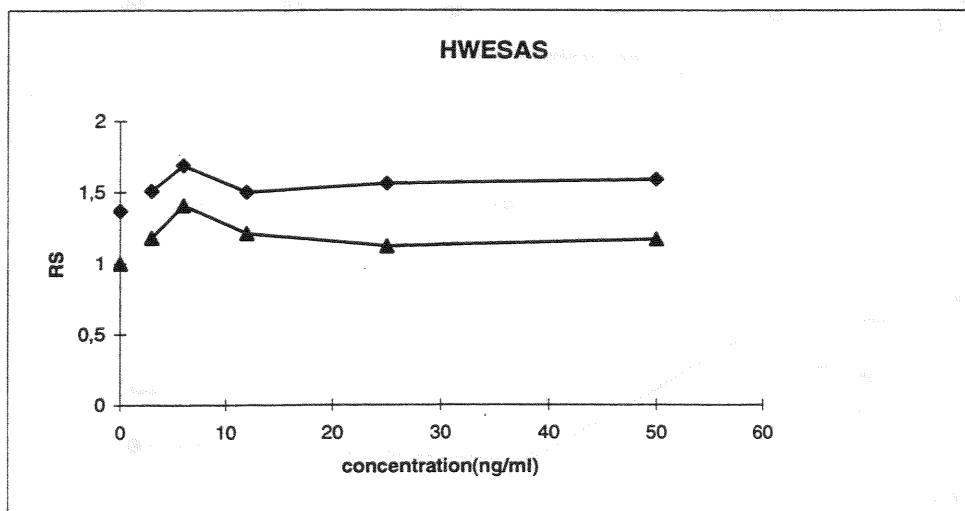
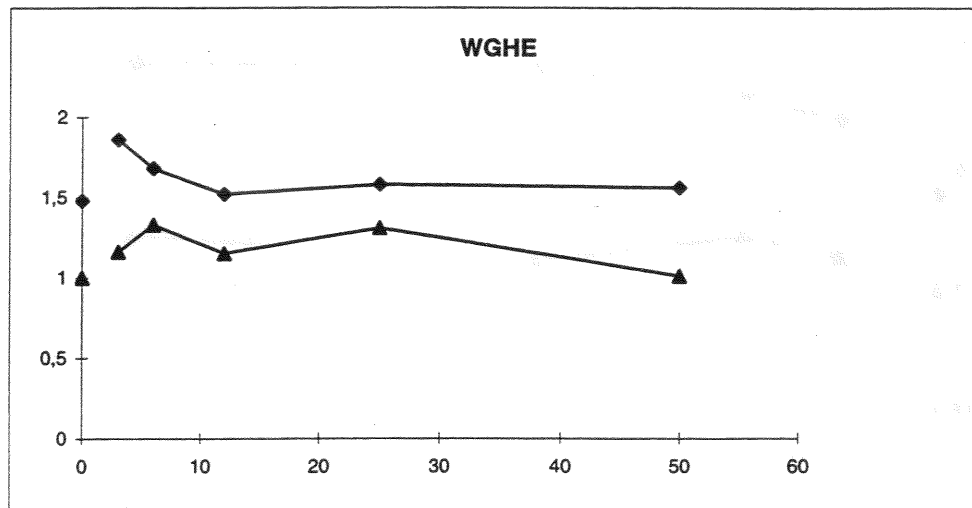


Fig. 45 B : Résultats de l'interaction des peptides et d'IGF2. L'analyse statistique utilisée est l'analyse de variance ANOVA multifactorielle.

* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ (Interaction positive)

▲ peptide seul

■ IGF2+peptide

III-2.1.3.2. Cellules MCF7.

IGF 2 a également été testé en présence de HWESAS et du peptide de 17 aa sur ces cellules. Les résultats sont consignés dans le tableau XXIX et la figure 46.

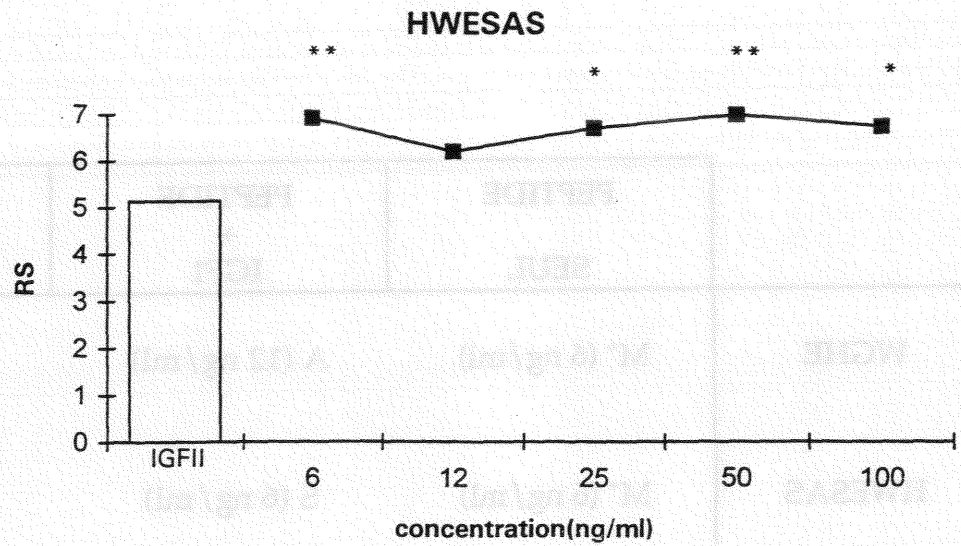
Les cellules MCF7 répondent bien à l'effet mitogénique de IGF2. HWESAS augmente significativement l'activité d'IGF2 et cette stimulation est déjà maximale pour 6,25 ng/ml d'HWESAS. Le peptide de 17 aa semble avoir une action biphasique avec un effet inhibiteur à faible dose et un effet stimulateur à dose plus forte, cependant cette expérience n'a pu être confirmée par manque de produit.

Les peptides étudiés se comportent différemment vis-à-vis d'IGF1 et d'IGF2. Le tableau XXX récapitule l'ensemble de ces résultats sur les FEP.

	IGF 2 + PEPTIDES ng /ml						
	T	IGF2 25 ng/ml	6,25	12,5	25	50	100
HWESAS							
M (cpm)	6830	35061***	47259***	42472***	45890***	47748***	46195***
ET	819	6661	2362	4249	5506	4780	6929
CV %	10,9	19	5	10	12	10	15
17 aa							
M (cpm)	7188	11670***	6562	8309	13604***	13917***	14454***
ET	567	840	1115	997	1374	1029	2224
CV %	7,9	7,2	17	12	10,1	7,4	15,6

*Tableau XXIX : Activité mitogénique d'IGF2 et d'IGF2 + peptide mesurées sur des cellules MCF7. Les résultats des essais sont comparés au témoin (test-t de Student). *** p < 0,001 (stimulation)*

A)



B)

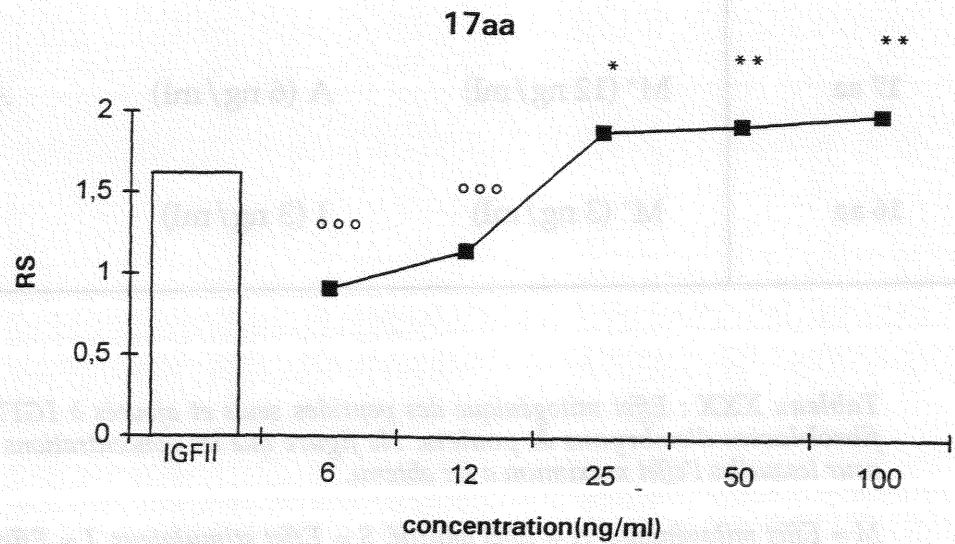


Fig. 46 : Mesure de l'activité mitogénique de HWESAS (A) et du peptide de 17 aa (B) en combinaison avec IGF2 sur des cellules MCF7. Les résultats sont exprimés en rapport d'activité et les essais sont comparés à IGF2 seul par un test-t de Student.

* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ (stimulation) °°° $p < 0,001$ (inhibition)

	PEPTIDE SEUL	PEPTIDE + IGF1	PEPTIDE + IGF2
WGHE	M ⁺ (6 ng/ml)	A (12 ng/ml)	A (3 ng/ml)
HWESAS	M ⁺ (6 ng/ml)	S (6 ng/ml)	A ⁻ (6 ng/ml)
YHWESAS	pas d'effet	A (6 ng/ml)	A (6 ng/ml)
17 aa	M ⁺ (12 ng/ml)	A (6 ng/ml)	A ⁻ (12 ng/ml)
16 aa	M ⁺ (3 ng/ml)	I (3 ng/ml)	S (3 ng/ml)

Tableau XXX : Effet mitogénique des peptides seuls et ajoutés à IGF1 ou IGF2 sur les fibroblastes d'embryons de poulets. Ne figure que les concentrations (entre parenthèses) pour lesquelles l'effet maximum a été obtenu.

M = Effet mitogénique, A = Effet additif, S = Effet stimulateur, I = Effet inhibiteur.

III-2.1.4. Activité séquentielle de HWESAS et du peptide de 17 aa.

Dans des travaux antérieurs, nous avons montré qu'il n'était pas nécessaire que l'UF de sérum humain soit ajouté en même temps que l'IGF1 pour qu'il augmente l'activité mitogénique de ce dernier. Il était cependant nécessaire que l'UF soit mis avant l'IGF1 pour qu'il y ait activité. Nous avons repris ces expériences avec des peptides purifiés.

Les cellules (FEP) ont été incubées 24 h dans du milieu MEM supplémenté avec 10 % de SVF puis mises pendant 24 h dans du MEM seul afin de les synchroniser en phase G₀/G₁, puis les cellules ont été remises en culture dans du milieu MEM frais additionné des peptides seuls en concentrations croissantes pendant 4 et 6 h. Les cellules sont alors lavées 3 fois avec du MEM et remises en culture avec IGF1 seul (15 ng/ml) ou IGF2 seul (50 ng/ml) soit de 18 h à 20 h. La thymidine tritiée a été ajoutée pendant les 6 dernières heures de culture. Les résultats obtenus sont donnés dans les figures 47, 48 et 49.

- **HWESAS.** Lorsque ce peptide est préincubé 4 h avant l'addition d'IGF1 ou d'IGF2, il ne stimule pas significativement l'activité mitogénique de ces facteurs de croissance. Par contre lorsqu'il est préincubé 6 h avant l'addition d'IGF1, il stimule significativement l'activité mitogénique de ce dernier, ceci a été confirmé dans deux expériences.

Les résultats obtenus avec IGF2 au cours de deux expériences sont plus difficiles à interpréter : dans la première, HWESAS incubé 6 h ne stimule pas significativement l'activité mitogénique d'IGF2, tandis que dans la seconde, il y a une action stimulatrice significative.

- **peptide de 17 aa.** Lorsque ce peptide est préincubé 4 h, il est sans effet sur l'activité mitogénique d'IGF1 et IGF2. Après une préincubation de 6 h, il stimule significativement l'activité mitogénique d'IGF1 mais pas celle d'IGF2.

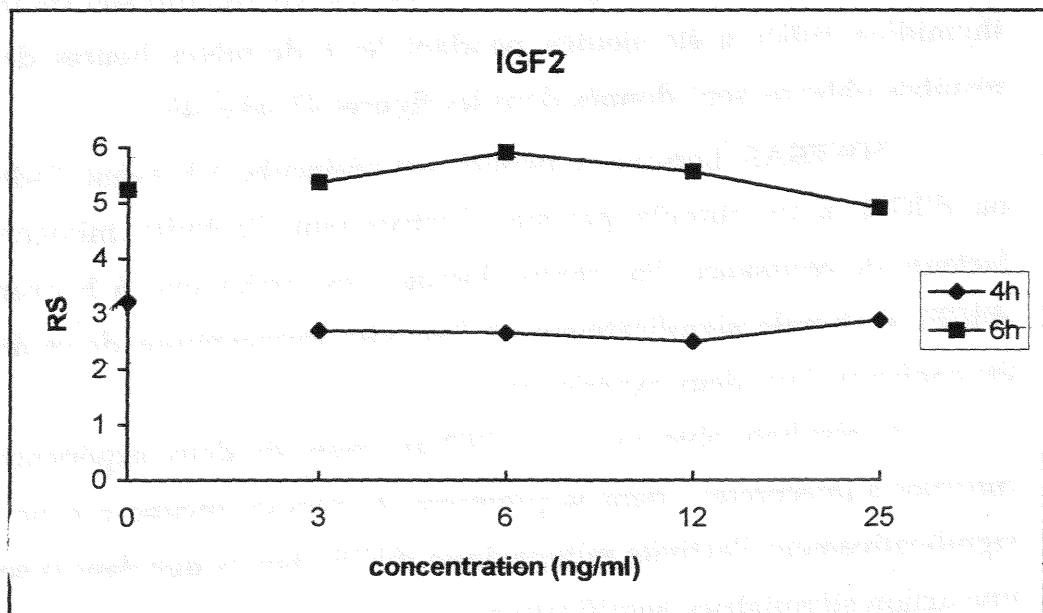
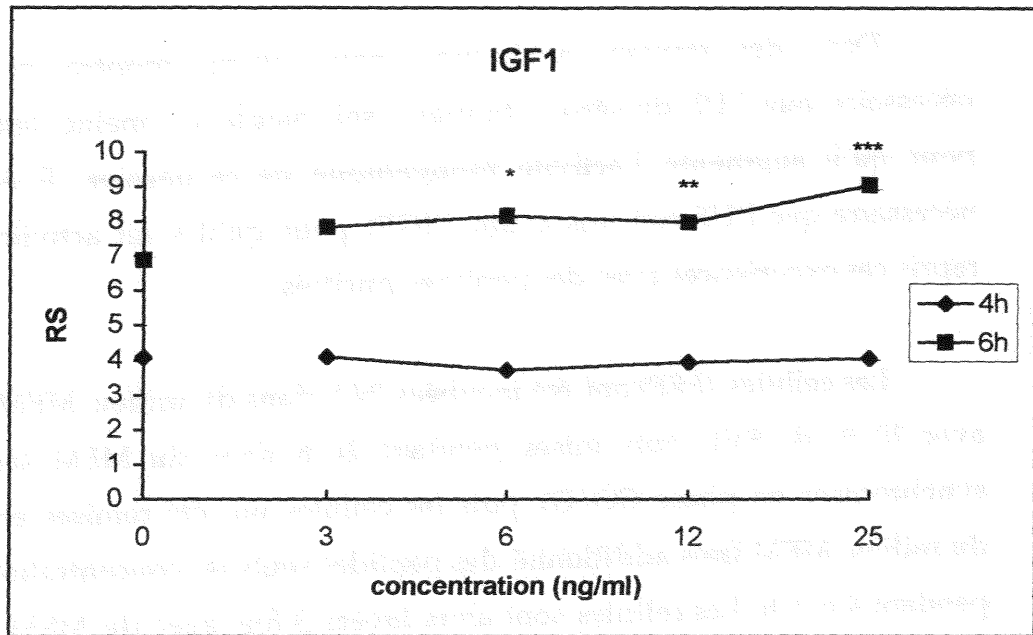


Fig. 47 : Etude de l'activité mitogénique de HWESAS associé aux IGFs, lorsque ces composés sont ajoutés séquentiellement. HWESAS a été incubé 4 (◆) ou 6 h (■) avant d'être enlevé et remplacé par IGF1 ou IGF2. La moyenne des résultats de 6 essais est exprimée en rapport de stimulation. Les essais sont comparés aux IGFs seuls (1^{er} expérience) (test-t de Student).

* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ (stimulation)

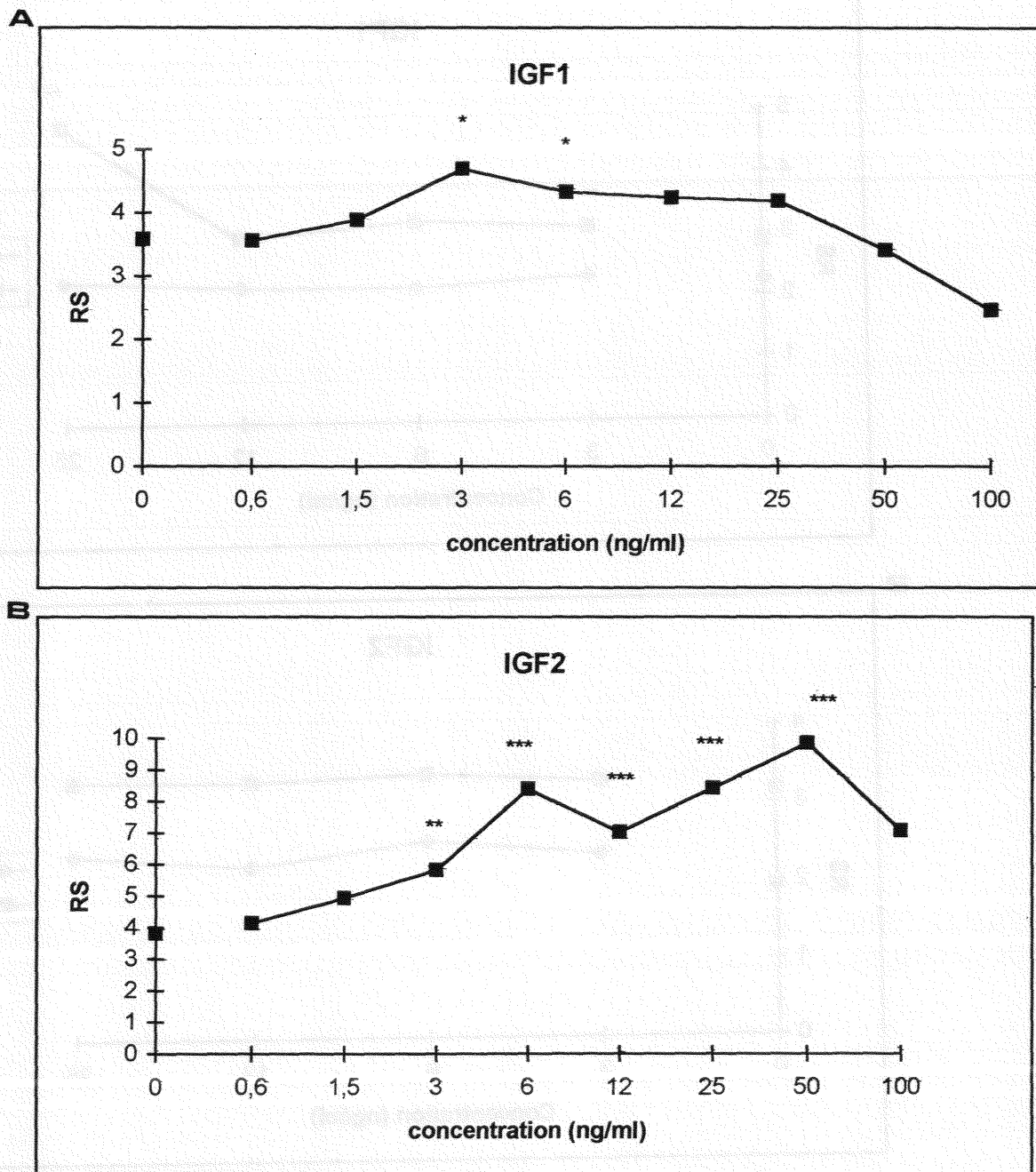


Fig. 48 : Etude de l'activité mitogénique de HWESAS associé aux IGFs, lorsque ces composés sont ajoutés séquentiellement. HWESAS a été incubé 6 h avant d'être enlevé et remplacé par IGF1 (A) et IGF2 (B). La moyenne des résultats de 6 essais est exprimée en rapport de stimulation. Les essais sont comparés aux IGFs seuls (2^{ème} expérience) (test-t de Student).

* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ (simulation).

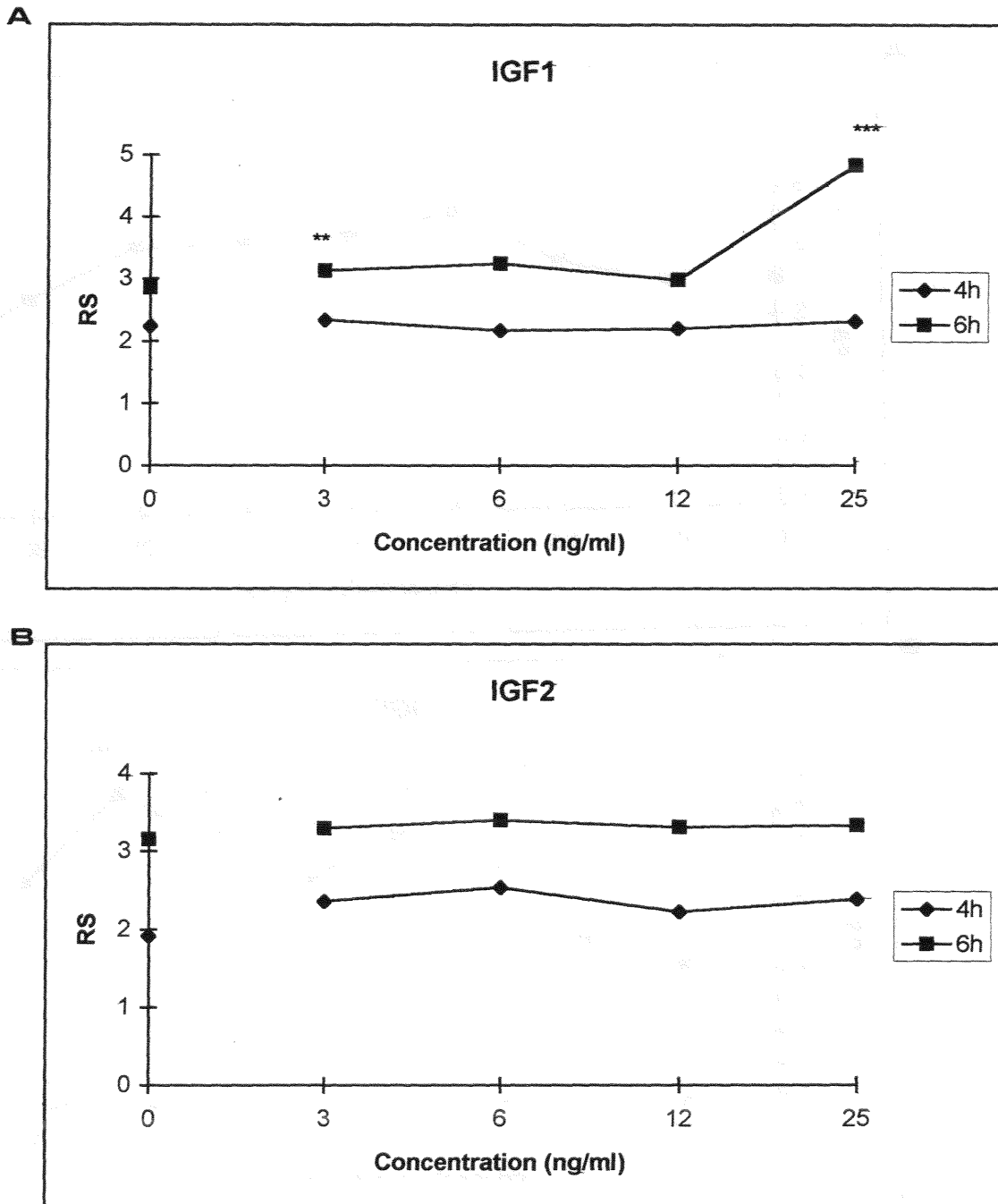


Fig. 49 : Etude de l'activité mitogénique du peptide de 17 aa associé aux IGFs, lorsque ces composés sont ajoutés séquentiellement. HWESAS a été incubé 4 ou 6 h avant d'être enlevé et remplacé par IGF1 (A) et IGF2 (B). ♦ préincubation de 4 h, ■ préincubation de 6 h. La moyenne des résultats de 6 essais est exprimée en rapport de stimulation. Les essais sont comparés aux IGFs seuls (test-t de Student).

** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ (stimulation)

III-2.1.5 Utilisation d'inhibiteurs de la PKC.

IGF1 et IGF2 agissent par l'intermédiaire de sa fixation à un récepteur de type I, récepteur à activité tyrosine-kinase. L'activation de ce récepteur entraîne des phosphorylations en cascade, en particulier des protéines de la voie des MAP Kinases, ceci aboutit à l'activation de gènes précoces impliqués dans la prolifération cellulaire (Kodawaki *et al.*, 1998). Cependant il a également été décrit que la protéine kinase C (PKC) était impliquée dans l'effet mitogénique d'IGF1 et d'IGF2. Kojima *et al.* (1992) ont décrit cet effet sur des cellules Balb/C 3T3. Pour tester si la PKC pouvait jouer un rôle dans l'activité mitogénique observée en présence d'IGF1 ou d'IGF2 et de HWESAS, nous avons réalisé deux types d'expériences.

Dans un premier temps, les FEP ont été incubés 24 h dans les conditions standards en présence des facteurs de croissance et la PKC a été recherchée par immunoblot dans les extraits cellulaires. Les cellules ont été lysées par un tampon de lyse et après centrifugation, les protéines sont précipitées par TCA 5 %, le précipité lavé a été dissous dans un mélange 0,4 % de désoxycholate-0,1 M NaOH puis soumis à une électrophorèse en milieu dissociant et à un immunoblot selon le protocole décrit au paragraphe II-6.4.

La figure 50 montre les résultats. Les cellules cultivées dans le milieu seul (ligne 1) exprime la PKC à un taux faible. L'expression de cette protéine est augmentée en présence d'IGF1 (ligne 2), d'IGF2 (ligne 4) et d'HWESAS (ligne 6).

On remarque cependant que l'augmentation en présence d'HWESAS est plus faible que celle observée en présence d'IGF1 et d'IGF2 et l'utilisation du mélange IGF1 ou IGF2 + HWESAS (ligne 3 et ligne 5) n'augmente pas l'expression de l'enzyme.

Pour la thèse de Mahrou SAREM,

Il n'y a pas de Page 154.

Dans un deuxième temps, nous avons renouvelé les expériences de mitogénicité sur les fibroblastes d'embryons de poulets en ajoutant dans les milieux de culture un inhibiteur de la PKC, le bisindolylmaléimide. Les fibroblastes synchronisés en phase G0/G1 sont cultivés pendant 24 heures avec les produits à tester et l'inhibiteur à concentrations croissantes. La [³H]-thymidine est ajoutée pendant les 6 dernières heures de culture.

En étudiant le tableau XXXI et la figure 51, on observe comme dans les expériences précédentes que l'addition de HWESAS à IGF1 ou IGF2 stimule l'incorporation de [³H]-thymidine. L'addition d'inhibiteur de PKC diminue l'incorporation de [³H]-thymidine. Cette inhibition est dose dépendante et devient significative pour 0,2 µM d'inhibiteur dans l'expérience avec IGF1 et pour 0,1 µM dans l'expérience avec IGF2 (les résultats en présence d'inhibiteur sont comparés aux résultats obtenus avec IGFs + peptide). Dans cette expérience, l'inhibiteur de la PKC a été ajouté au mélange IGF + HWESAS.

Pour essayer de mieux comprendre les mécanismes en jeu, nous avons testé le bisindolylmaléimide sur HWESAS seul, sur IGF1 ou IGF2 seul et à nouveau sur les mélanges IGF1 ou IGF2 + HWESAS.

Les tableaux XXXII et XXXIII ainsi que la figure 52 donnent les résultats. Deux expériences ont été faites avec HWESAS seul et on constate que l'inhibiteur de PKC inhibe l'activité mitogénique de HWESAS, l'effet est significatif pour une concentration de 0,4 µmol/l d'inhibiteur.

Lorsque IGF1 seul est traité par l'inhibiteur de la PKC, son activité mitogénique est légèrement diminuée. Cependant la différence n'est significative que pour une concentration de 1 µM de l'inhibiteur de la PKC.

Les résultats obtenus avec IGF2 seul sont surprenants, la présence d'inhibiteur de la PKC semble augmenter l'activité mitogénique d'IGF2. Cette expérience demande à être confirmée.

Par contre lorsque IGF1 ou IGF2 sont testés en même temps que HWESAS, l'inhibiteur de la PKC diminue significativement l'activité mitogénique du mélange pour des concentrations à partir de 0,4 μ M.

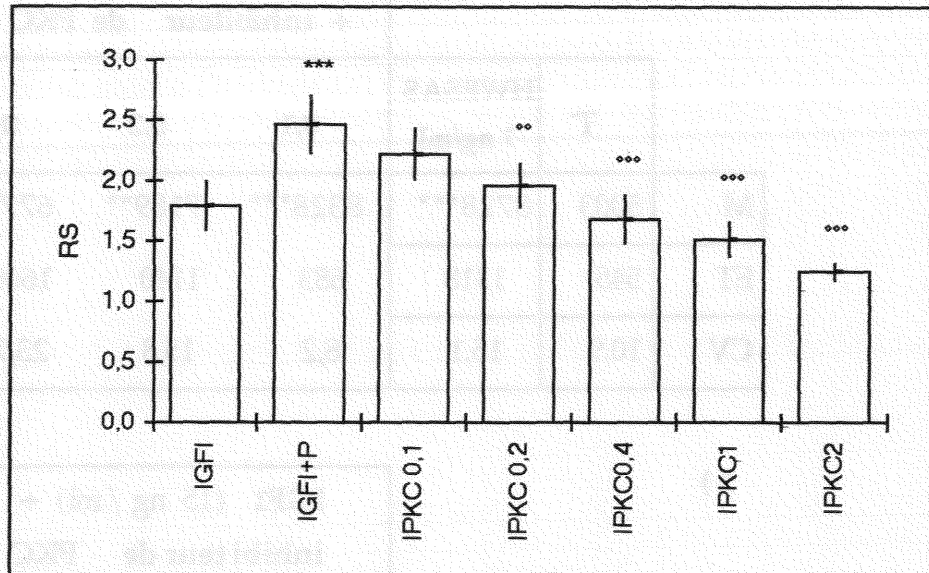
En conclusion, l'inhibiteur de la PKC utilisé est pratiquement sans action sur IGF1 seul, il semble qu'il stimule l'activité mitogénique d'IGF2. Par contre, il diminue l'activité mitogénique d'HWESAS seul et lorsqu'il est en mélange avec IGF1 et IGF2.

		IGF1 (15 ng/ml) + HWESAS (7 ng/ml) + inhibiteur de PKC (µmole/l)						
T		IGF1 (15 ng/ml)	IGF1 + HWESAS (15 ng/ml)(7 ng/ml)	0,1	0,2	0,4	1	2
M	11596	20786***	28605***	25752***	22740***	19481***	17559***	14453***
ET	801	2324	2766	2445	2059	2316	1628	770
CV	6,9	11,2	9,7	9,5	9,1	11,9	9,3	5,3

		IGF2 (50 ng/ml) + HWESAS (7 ng/ml) + inhibiteur de PKC (µmole/l)						
T		IGF2 (50 ng/ml)	IGF2 + HWESAS (50 ng/ml)(7 ng/ml)	0,1	0,2	0,4	1	2
M	10864	17305***	23810***	20288***	18612***	15172***	13385**	11109 NS
ET	840	1688	993	2546	1141	1304	1656	1348
CV	7,7	9,8	4,2	12,5	6,1	8,6	12,4	12,1

Tableau XXXI : Effet d'un inhibiteur (bisindolylmalimide) de la PKC sur l'activité mitogénique d'IGF1 et d'IGF2 utilisé en présence d'HWESAS. L'activité mitogénique d'IGF1 (15 ng/ml) et d'IGF2 (50 ng/ml) est significativement augmentée en présence de HWESAS. L'addition de l'inhibiteur diminue l'incorporation de [³H]-thymidine qui reste cependant toujours supérieure au témoin (milieu seul). Les résultats sont comparés au témoin par un test-t de Student. ** p < 0,1 *** p < 0,001 (effet stimulateur).

A)



B)

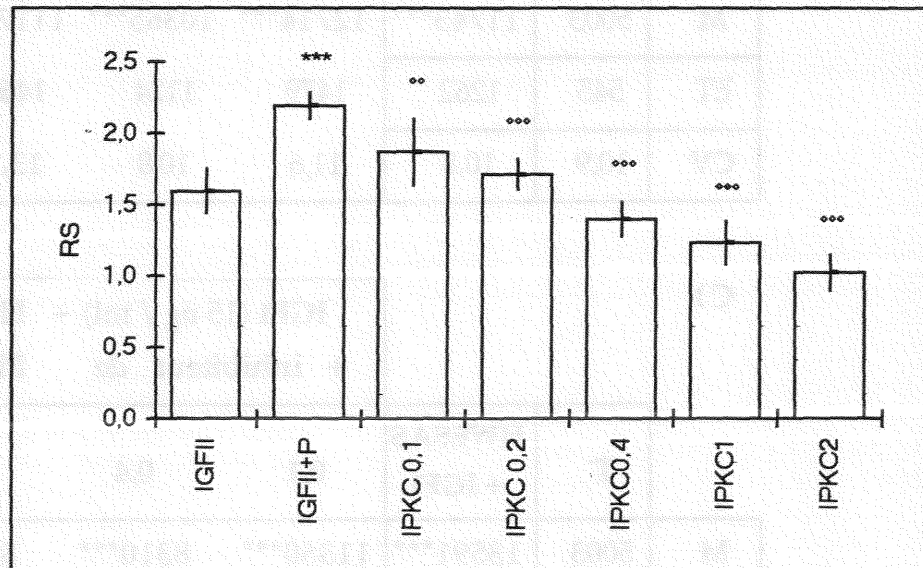


Fig. 51 : Rôle de la PKC dans l'activité mitogénique d' IGF1 (A) et d' IGF2 (B) en combinaison avec HWESAS. Des FEP sont cultivés dans des conditions standards en présence d'IGF1, d'IGF2 seuls ou en combinaison avec HWESAS. Le bisindolylmaléimide est utilisé en concentration croissante avec IGFs + peptide (μM). L'incorporation de $[^3\text{H}]$ -thymidine est mesurée.

Les résultats IGF1 ou IGF2 + peptide sont comparés aux résultats obtenus avec IGFs seuls. *** $p < 0,001$ (stimulation).

Les résultats avec l'inhibiteur de la PKC sont comparés à IGFs + peptide. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (inhibition).

A

			HWESAS (7 ng / ml) + inhibiteur de PKC (µmole / l)				
	T	HWESAS 7 ng/ml	0,1	0,2	0,4	0,6	1
M	5003	8728***	8328***	7189**	6770**	6689*	3888 ^{oo}
ET	545	1318	683	1140	1609	1526	543
CV	10,9	15,1	8,2	15,8	23,7	22,8	13,9

B)

			IGF1 (15 ng / ml) + inhibi teur de PKC (µmole / l)			
	T	IGF1 15 ng/ml	0,1	0,4	0,6	1
M	5003	11743***	12714***	10365***	11174***	7955***
ET	545	1262	1479	1124	1460	1120
CV	10,9	10,8	11,6	10,8	13,1	14

C)

			IGF1 (15 ng / ml) + HWESAS (7 ng/ml) + inhibiteur de PKC (µmole / l)			
	T	HWESAS + IGF1	0,1	0,4	0,6	1
M	5003	13591***	11350***	8310***	8542***	7351***
ET	545	1318	459	1075	705	1066
CV	10,9	15,1	4,04	12,9	8,3	14,5

Tableau XXXII : Effet d'un inhibiteur de la PKC (bisindolylmaléimide) sur l'activité mitogénique de HWESAS (A), d'IGF1 (B) et d'IGF1 + HWESAS (C). Les résultats sont comparés au témoin (milieu seul).

* p < 0,05 ** p < 0,01 *** p < 0,001 (stimulation) ^{oo} p < 0, 01 (inhibition)

A)

			HWESAS (7 ng/ml) + inhibiteur de PKC (µmole/l)				
	T	HWESAS 7 ng/ml	0,1	0,2	0,4	0,6	1
M	16309	23259***	19082**	19880**	18650*	16705	9118 ^{ooo}
ET	2180	2516	2728	3398	729	1508	1329
CV	13,4	10,8	14,3	17,1	3,9	9,0	14,6

B)

			IGF2 (50 ng/ml) + inhibiteur de PKC (µmole/l)			
	T	IGF2 50 ng/ml	0,1	0,4	0,6	1
M	16309	39438***	57299***	54342***	43180***	51990***
ET	2180	6871	11928	7052	8404	7151
CV	13,4	17,4	20,8	13	19,5	13,8

C)

			IGF2 (50 ng/ml) + HWESAS (7 ng/ml) + inhibi teur de PKC (µmole /l)			
	T	HWESAS + IGF2	0,1	0,4	0,6	1
M	16309	46917***	46955***	39659***	30032***	31155***
ET	2180	3192	7892	7726	5649	5232
CV	13,4	6,8	16,8	19,5	18,8	16,8

Tableau XXXIII : Effet d'un inhibiteur de la PKC ((bisindolylmaléimide) sur l'activité mitogénique de HWESAS (A), IGF2 (B) et IGF2 + HWESAS (C). Les résultats sont comparés au témoin (milieu seul).

* p < 0,05 ** p < 0,01 *** p < 0,001 (stimulation) ^{ooo} p < 0,001 (inhibition)

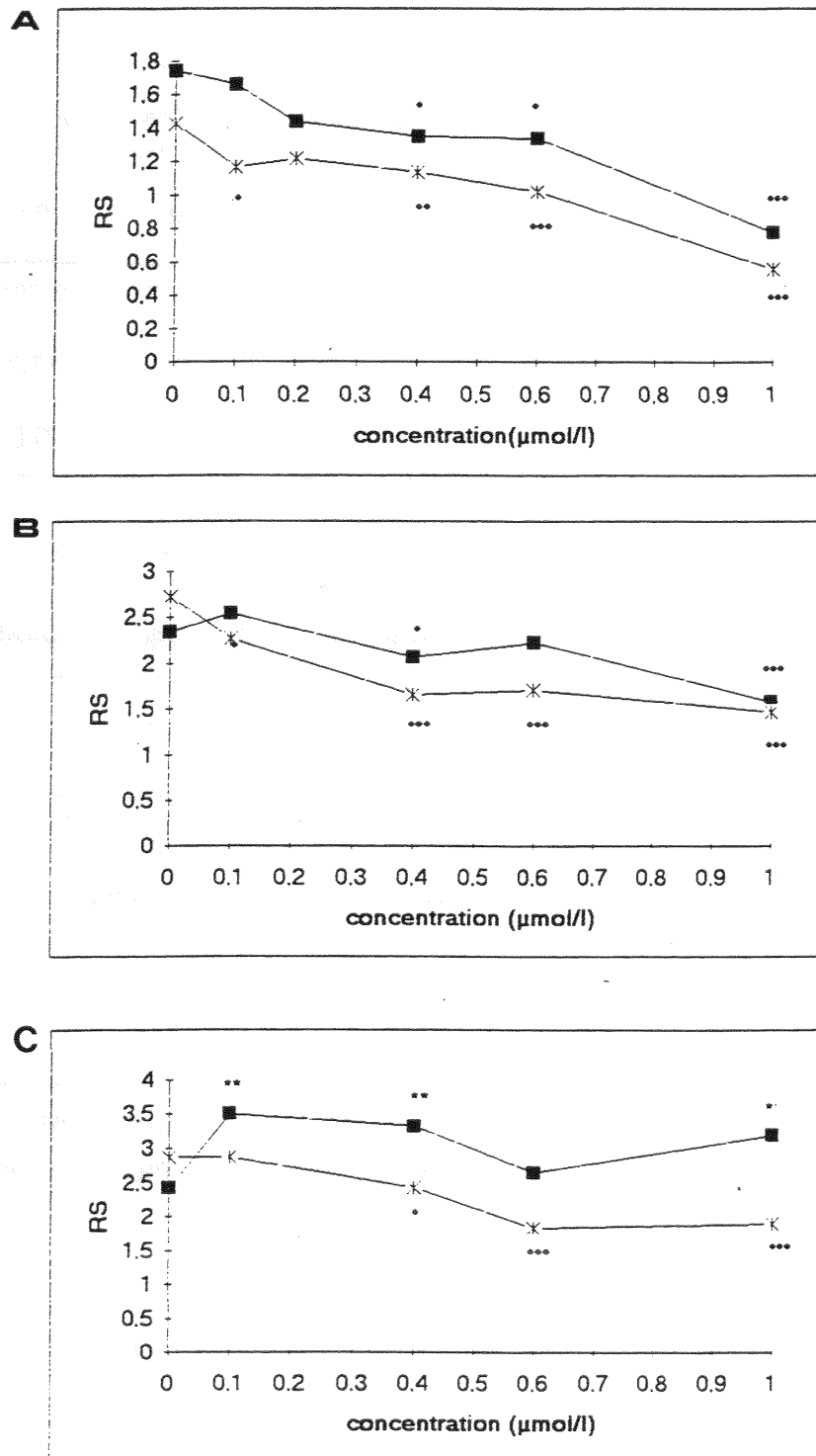


Fig. 52 : Rôle de l'inhibition de la PKC dans l'activité mitogénique :
 (A) HWESAS 2 expériences différentes, (B) ■ IGF1 et IGF1 + HWESAS X,
 (C) ■ IGF2 et IGF2 + HWESAS X

Le bisindolylmaléimide est utilisé en concentrations croissantes. L'incorporation de [³H]-thymidine est mesurée. Les résultats sont comparés aux résultats obtenus sans bisindolylmaléimide (test-t de Student). * p < 0,05 ** p < 0,01 (stimulation)

° p < 0,05 °° p < 0,01 °°° p < 0,001 (inhibition)

III-2.2. Effet sur l'apoptose.

III-2.2.1. Mesure de la phase sub GO (cycle cellulaire).

Lorsque les cellules entrent en apoptose, leur contenu en ADN se modifie (fragmentation de l'ADN). Nous avons donc en utilisant la cytométrie de flux et l'iodure de propidium étudié le contenu en ADN des cellules vivantes. Dans ces expériences sur le cycle cellulaire, le T⁻ d'apoptose (minimum de cellules en apoptose) contient 10 % de SVF, le T⁺ n'en contient pas, mais tous les milieux de culture contiennent de la glutamine.

- Si l'on considère les résultats obtenus à 12 h, on constate qu'en absence de SVF (T⁺) il y a 3,4 % de cellules en phase sub GO (apoptose) et qu'en présence de 10 % de SVF (T⁻), le pourcentage de cellules dans cette phase n'est pas mesurable. Lorsque le peptide HWESAS ou IGF1 sont utilisés seuls, on retrouve 3,3 % et 2,1 % de cellules dans cette phase. Le pourcentage de cellules en G2 est extrêmement faible dans le T⁻ (0,8 %), il est également faible en présence d'IGF1 seul (1,3 %), il est un peu plus important en présence d'IGF1 + P (2,7 %), d'IGF2 seul (2,7 %) ou d'IGF2 + P (3,1 %). Cependant ces pourcentages n'atteignent jamais celui noté avec T⁻ qui est de 8,1 % (tableau XXXIV A et figure 53 A).

- A 24 h, le pourcentage de cellules en phase sub GO est de 2,2 % pour T⁺ et 3,3 % pour HWESAS seul. Par contre, ce pourcentage est plus faible pour IGF1 seul (1,1 %), pour IGF1 + peptide (0,8 %), pour IGF2 seul (0,6 %) et IGF2 + peptide (0,6 %), pour T⁻ ce pourcentage est de 0,3 %. Le pourcentage des cellules en phase G2 est de 3,6 % pour le T⁺, 4 % pour IGF1 et 3,4 % pour IGF1 + peptide. Par contre ce pourcentage est plus important lorsque l'on considère IGF2 seul (6,2 %) ou IGF2 + peptide (6,3 %). Ces pourcentages restent cependant bien au-dessous de ceux obtenus avec T⁺ (12,2 %) (Tableau XXXIV B et figure 53 B).

Si l'on considère la phase S, IGF1 seul, IGF1 + peptide n'induisent pas un pourcentage de cellules en phase S plus important que celui observé dans le T tandis que IGF2 + peptide augmente ce pourcentage.

- A 48 h, le pourcentage de cellules en phase S et G2 diminue pour l'ensemble des produits testés y compris le sérum de veau à 10 %. Ces résultats présentent moins d'intérêt car à 48 h le nombre de cellules vivantes a considérablement diminué (Tableau XXXIV C et figure 53 C).

III-2.2.2. Annexine - FITC.

L'annexine mesure une modification précoce de l'apoptose. En effet très tôt dans l'apoptose, l'asymétrie membranaire est modifiée avec externalisation de la phosphatidylsérine. L'annexine V a une haute affinité pour cette classe de phosphoacylglycérol.

Dans une première expérience, les cellules (FEP, 5^{ème} passage) sont cultivées en présence de 10 % de SVF. Le milieu est changé et remplacé par du MEM seul afin de synchroniser les cellules en phase G0/G1. Puis ces cellules sont cultivées 24 h en présence des produits à tester. Le témoin positif d'apoptose (maximum de cellules en apoptose) contient 10 % SVF mais pas de glutamine. Le témoin négatif d'apoptose (minimum de cellules apoptotiques) contient 10 % de SVF et 4 mM de glutamine. Les essais contiennent les produits à tester sans glutamine.

Après 24 h de culture, l'annexine-FITC est ajoutée pendant 10 min. à température ambiante puis le surnageant contenant les cellules qui se sont détachées est récupéré, par ailleurs les cellules adhérentes sont récoltées après grattage des puits. Les cellules contenues dans le surnageant et celles récupérées par grattage sont lavées deux fois avec du PBS afin d'enlever l'excès d'annexine-FITC. De l'iodure de propidium est ajouté aux cellules et incubé 30 min. à 4° C, à l'obscurité. Les cellules sont ensuite analysées par cytométrie de flux (analyse de 25 000 cellules).

A) 12 h

	Sub GO/G1	GO/G1	S	G2/M
T+	3,4	94	2,2	0,8
T-	0	73,5	10	8,1
P	3,3	77	5,8	2,2
IGF1	2,1	88	7,3	1,3
IGF1 + P	1,9	89	6,2	2,7
IGF2	0	86	9	2,7
IGF2 + P	2,3	86	8,5	3,1

B) 24 h

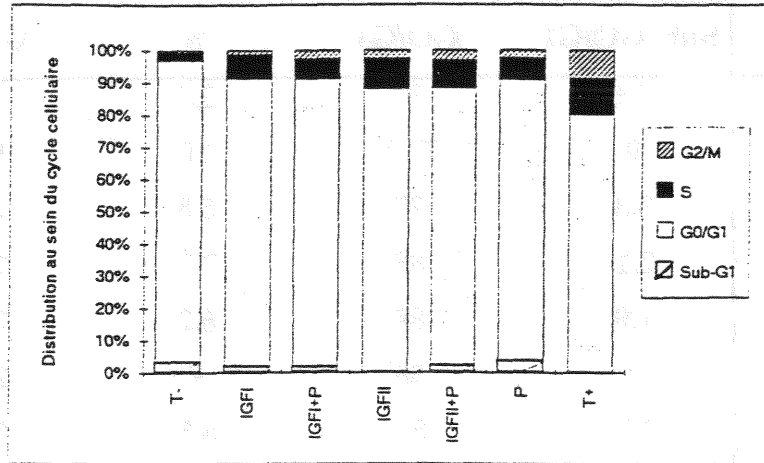
	Sub GO/G1	GO/G1	S	G2/M
T+	2,2	85	7,4	3,6
T-	0,3	77	10,3	12,2
P	3,3	84	7	3
IGF1	1,1	88	6,7	4
IGF1 + P	0,8	89	6,4	3,4
IGF2	0,6	86	7,2	6,2
IGF2 + P	0,6	85	8,6	6,3

C) 48 h

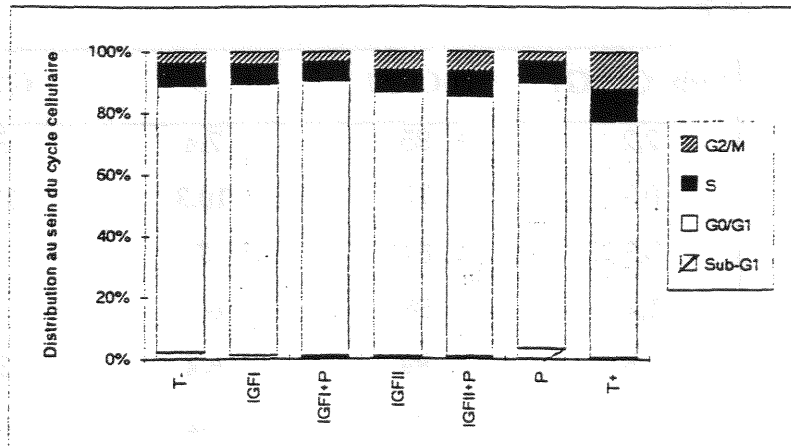
	Sub GO/G1	GO/G1	S	G2/M
T-	1,6	94	1,9	3
P	4,7	86,5	7	2,3
IGF1	2,3	92	1,8	3,6
IGF1 + P	2,2	94	2,2	1,9
IGF2	2,5	86	6,5	5
IGF2 + P	1,2	93	4,5	1,5

Tableau XXXIV : Etude du cycle cellulaire à 12 h (A), 24 h (B) et 48 h (C) d'incubation. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules vivantes dans chacune des phases du cycle. T⁺ = témoin positif d'apoptose (pas de SVF) T⁻ = témoin négatif d'apoptose (10 % SVF), P = HWESAS (7 ng/ml). A 48 h, il n'y a plus suffisamment de cellules vivantes dans T⁺

A : 12h



B : 24h



C : 48h

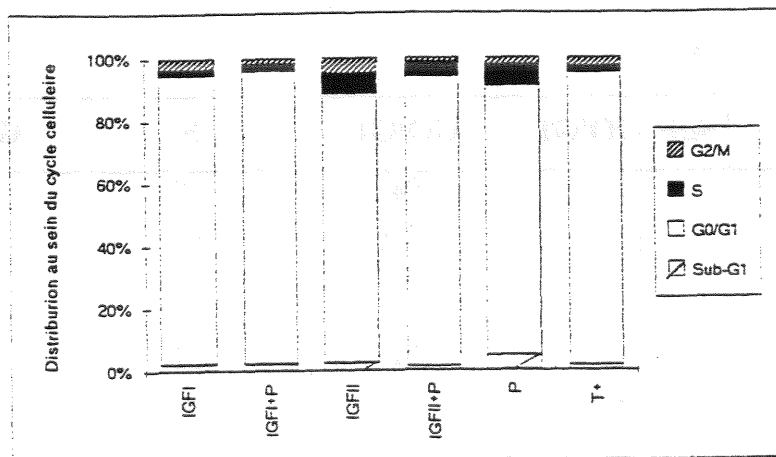


Fig. 53 : Distribution des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire dans une culture de fibroblastes d'embryons de poulets en absence de SVF (T⁻), en présence de SVF 10 % (T), en présence d'IGF1 (15 ng/ml), d'IGF2 (50 ng/ml) et d'HWESAS (P) à 7 ng/ml pendant 12 h (A), 24 h (B) et 48 h (C).

Les histogrammes mono et biparamétriques de la fluorescence de l'iodure de propidium permettent de séparer plusieurs populations : les cellules vivantes, les cellules mortes ou en phase sub GO (voir Fig. 18). Dans cette population, l'annexine-FITC permet de reconnaître et de compter les cellules en apoptose (Figures 54 et 55).

La figure 56 A et le tableau XXXV résument les résultats obtenus, ces résultats sont exprimés en % de cellules apoptotiques par rapport au nombre de cellules vivantes. Pour les cellules non adhérentes, on observe que l'IGF1 et l'IGF1 + HWESAS ont protégé les fibroblastes de poulets contre l'apoptose, cependant de façon moins efficace que le SVF 10 % + 2 mM Gln (témoin négatif de l'apoptose). IGF2 + HWESAS ou HWESAS seul sont moins efficaces. Pour les cellules adhérentes, il n'y a pratiquement pas eu d'incorporation d'annexine ce qui prouve que les membranes de ces cellules étaient en bon état. Ceci confirme donc que lorsque les cellules se détachent, une bonne partie d'entre elles sont déjà entrées en apoptose.

Une deuxième expérience a été faite pour confirmer ces premiers résultats avec des FEP (au 7^{ème} passage) et dans les mêmes conditions que ci-dessus.

Dans cette expérience, les résultats sont un peu différents de ceux de la première expérience (tableau XXXV et figure 56 B). On constate que les cellules adhérentes présentent un certain degré d'apoptose (ce qui peut s'expliquer par le vieillissement des cellules, 7^{ème} passage contre 5^{ème}). Par contre comme précédemment IGF1 + HWESAS a un léger effet protecteur. Sur les cellules adhérentes, ce mélange est aussi efficace que le SVF à 10 %. IGF2, IGF2 + HWESAS ou HWESAS ont une action protectrice moindre. Les histogrammes mono et biparamétriques sont présentés dans les figures 57 et 58.

1^{ère} expérience : cellules détachées

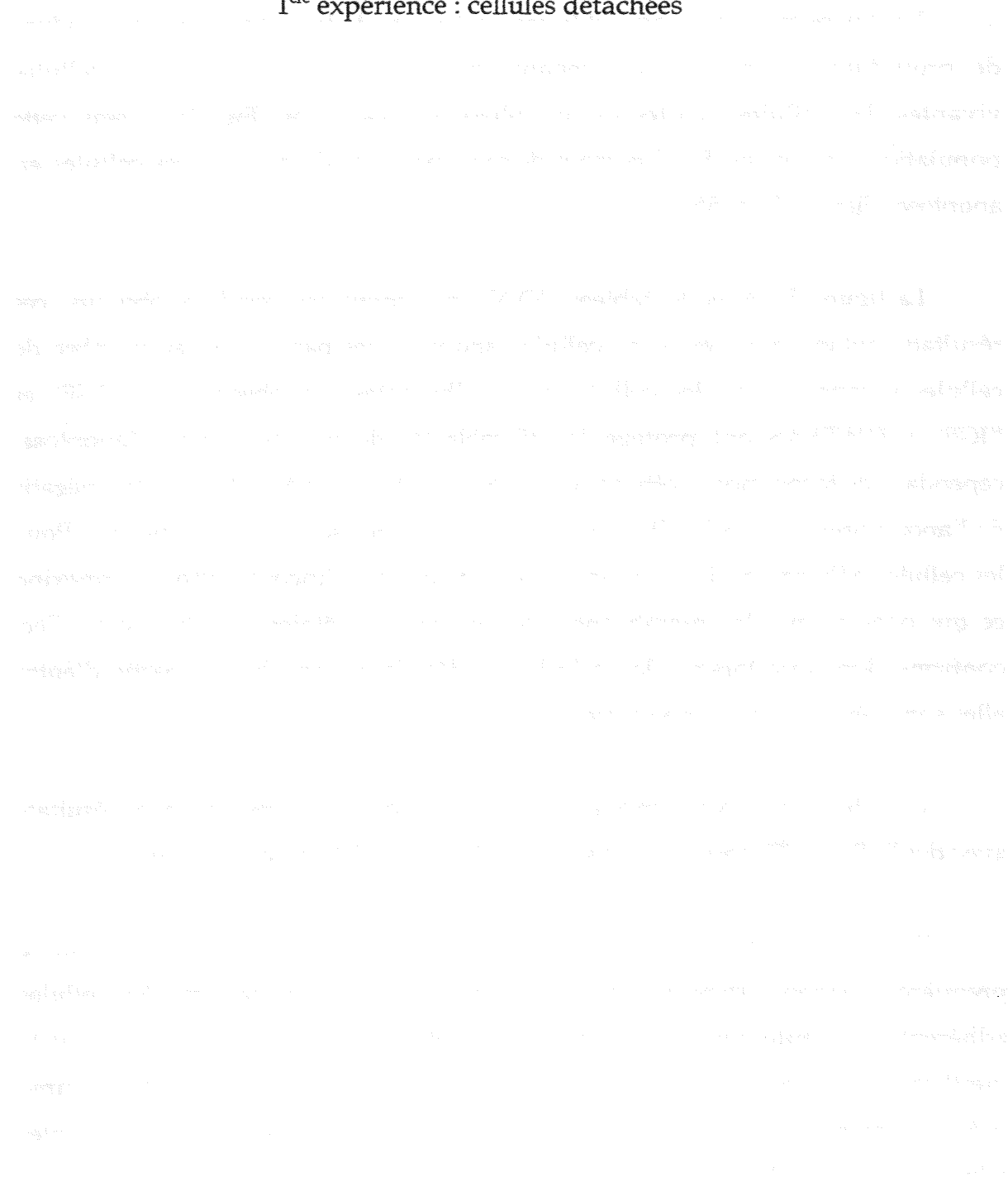


Fig. 54 : Diagrammes mono (A) et biparamétriques (B) obtenus par cytométrie en flux après marquage par iodure de propidium (IP) et annexine V. Les FEP sont incubés pendant 24 h en présence de
1 : témoin (milieu seul avec 2 mM Gln), **2 :** HWESAS (6 ng/ml), **3 :** IGF1 (15 ng/ml)
4 : IGF1 (15 ng/ml) + HWESAS (6 ng/ml), **5 :** IGF2 (50 ng/ml), **6 :** IGF2 (50 ng/ml) + HWESAS (6 ng/ml).

V : cellules vivantes, M : cellules mortes, A : cellules apoptotiques.

1^{ère} expérience : cellules adhérentes

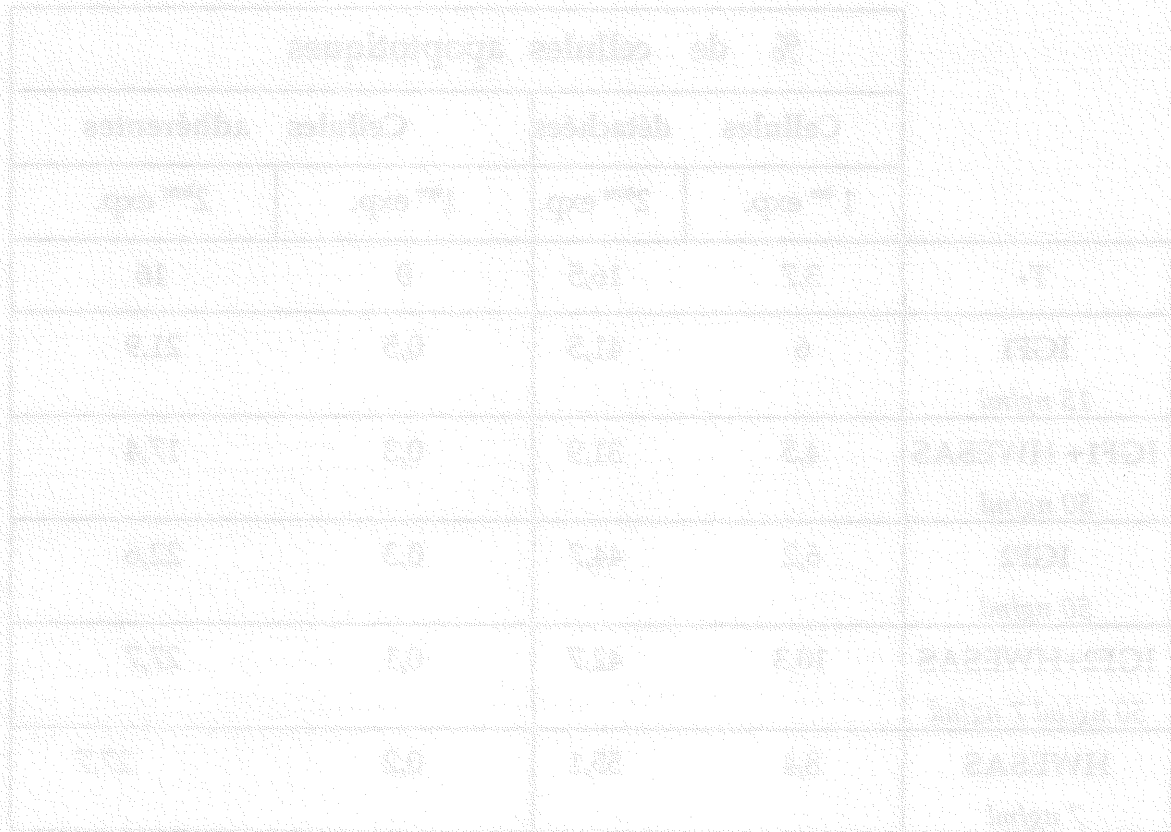


Fig. 55 : Diagrammes mono (A) et biparamétriques (B) obtenus par cytométrie en flux après marquage par IP et annexine V. Les FEP sont incubés pendant 24 h en présence de 1 : témoin (milieu seul avec 2 mM Gln), 2 : HWESAS (6 ng/ml), 3 : IGF1 (15 ng/ml) 4 : IGF1 (15 ng/ml) + HWESAS (6 ng/ml), 5 : IGF2 (50 ng/ml), 6 : IGF2 (50 ng/ml) + HWESAS (6 ng/ml).

V : cellules vivantes, M : cellules mortes, A : cellules apoptotiques

	% de cellules apoptotiques			
	Cellules détachées		Cellules adhérentes	
	1 ^{ère} exp.	2 ^{ème} exp.	1 ^{ère} exp.	2 ^{ème} exp.
T-	3,7	16,5	0	16
IGF1 15 ng/ml	6	41,5	0,5	21,9
IGF1+ HWESAS 50 ng/ml	4,5	31,9	0,3	17,4
IGF2 50 ng/ml	6,2	44,7	0,3	22,6
IGF2+HWESAS 50 ng/ml 7 ng/ml	10,3	42,7	0,1	27,7
HWESAS 7 ng/ml	8,4	55,1	0,2	27,7

Tableau XXXV : Apoptose en présence d'IGF1 (15 ng/ml), IGF2 (50 ng/ml) et HWESAS (7 ng/ml), T contient 10 % SVF et 4 mM de glutamine

Fig. 56: Pourcentage de cellules en apoptose par rapport aux cellules vivantes mesuré par la méthode à l'annexine-FITC après 24 h d'incubation.

T : témoin négatif d'apoptose, A : IGF1, B : IGF1 + HWESAS, C : IGF2, D : IGF2 + HWESAS, E : HWESAS.

■ Cellules détachées □ Cellules adhérentes

2^{ème} expérience : cellules détachées

Fig. 57 : Diagrammes mono (A) et biparamétriques (B) obtenus par cytométrie en flux après marquage par iodure de propidium (IP) et annexine V. Les FEP sont incubés pendant 24 h en présence de :

1 : témoin, 2 : milieu + SVF 10% + glutamine, 3 : HWESAS (6 ng/ml)

4 : IGF1 (15 ng/ml), 5 : IGF1 + HWESAS, 6 : IGF2 (50 ng/ml), 7 : IGF2 + HWESAS.

V : cellules vivantes, M : cellules mortes, A : cellules apoptotiques.

2^{ème} expérience : cellules adhérentes

Fig. 58 : Diagrammes mono (A) et biparamétriques (B) obtenus par cytométrie en flux après marquage par iodure de prodidium (IP) et annexine V. Les FEP sont incubés pendant 24 h en présence de :

- 1 : témoin, 2 : milieu + SVF 10% + glutamine, 3 : HWESAS (6 ng/ml)
- 4 : IGF1 (15 ng/ml), 5 : IGF1 + HWESAS, 6 : IGF2 (50 ng/ml), 7 : IGF2 + HWESAS.

V : cellules vivantes, M : cellules mortes, A : cellules apoptotiques.

III-2.3. Effet de HWESAS sur le transport membranaire.

De nombreuses études faites sur les propriétés des IGF1 et IGF2 ont montré que ces composés accélèrent précocement le transport membranaire de nutriments et d'ions.

Nous avons donc repris ces expériences pour déterminer si le peptide HWESAS isolé du sérum humain modifiait le comportement métabolique d'IGF1 et d'IGF2.

III-2.3.1. Entrée du glucose dans les cellules.

Comme décrit dans Matériel et Méthodes, ces expériences ont été réalisées dans des plaques de 6 puits avec des fibroblastes d'embryons de poulets en utilisant du 2 désoxy- ^3H -glucose, sucre non métabolisable.

L'hexapeptide a été testé à différentes concentrations seul ou en présence d'IGF1 ou d'IGF2. Ces deux facteurs de croissance ont été utilisés aux concentrations de 350 ng/ml et 700 ng/ml respectivement. Ces concentrations ont été préalablement déterminées par Thiebaut qui a testé des fractions partiellement purifiées de FCPPM (Thiebaut, thèse 1992).

- Comme décrit dans la littérature, IGF1 stimule l'entrée du glucose dans la cellule, le rapport de stimulation par rapport au témoin est de 1,66.
- HWESAS seul n'a qu'une faible action sur l'entrée du glucose dans la cellule.
- IGF1 + HWESAS ont une action synergique pour des concentrations de HWESAS de 1 500, 2 000 et 3 000 ng/ml (tableau XXXVI et figure 59).

III - Résultats

	HWESA S				
	ng/ml				
	0	1 000	1 500	2 000	3 000
T					
M (cpm)	3887	3653	4231	4298*	
ET	326	388	463	762	
CV %	9,08	10,62	10,95	17,72	
IGF1 350 mg/ml					
M (cpm)	5954	6133	8178***	10509***	7927***
ET	210	552	585	985	297
CV %	3,53	9	7,15	9,38	6,07

Tableau XXXVI : Effet de l'IGF1 et de l'hexapeptide seuls et en combinaison sur le transport membranaire du glucose mesuré par l'incorporation de 2 désoxy [³H]-glucose. Les résultats sont la moyenne de 5 réplifications. Ces résultats sont comparés au témoin.

* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ (stimulation)

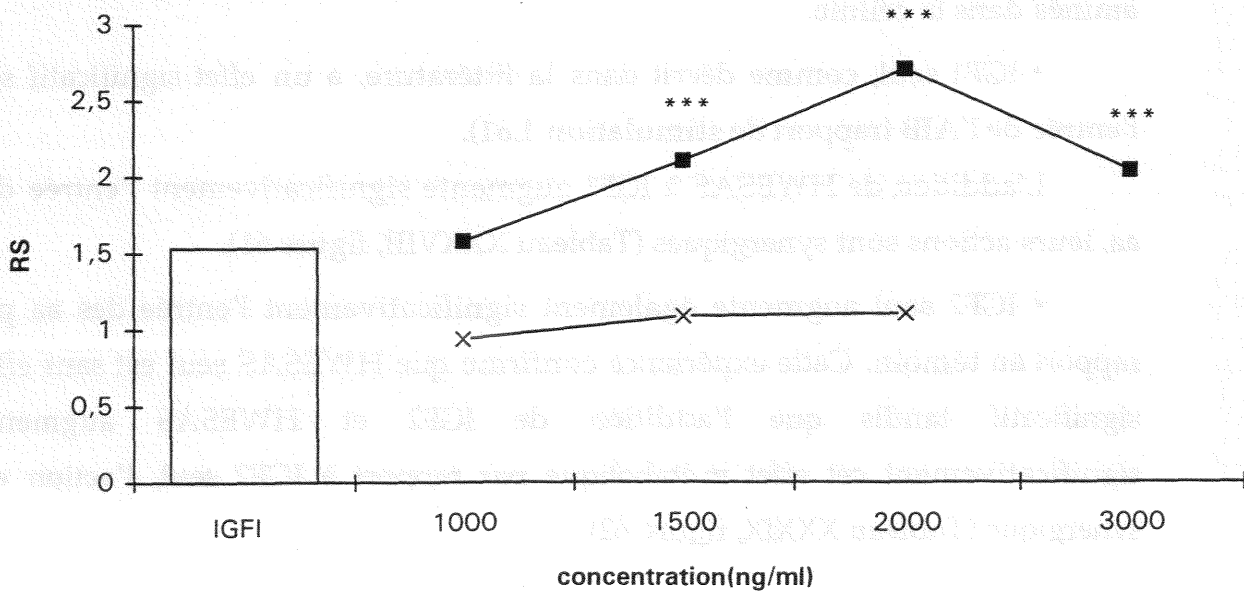


Fig. 59 : Entrée du glucose dans des FEB. Les résultats sont exprimés en rapport de stimulation. Les résultats IGF1 + HWESAS est comparé à IGF1 seul. *** $p < 0,001$.

x Effet d' HWESAS seul ■ Effet d' IGF1 + HWESAS

La même expérience a été faite avec IGF2.

- IGF2 a un effet plus faible que celui de l'IGF1 sur l'entrée du glucose dans la cellule.
- HWESAS stimule l'action d'IGF2. L'action semble additive et non pas synergique comme nous l'avons observée avec IGF1. (Tableau XXXVII et figure 60).

III-2.3.2. Entrée des acides aminés.

L'entrée des acides aminés (aa) dans la cellule est mesurée par l'incorporation de l'acide [¹⁴C]-alpha-amino-isobutyrique (AIB) comme décrit dans Matériel et Méthodes.

- HWESAS seul n'a pas d'action significative sur l'entrée des acides aminés dans la cellule.
- IGF1 seul, comme décrit dans la littérature, a un effet significatif sur l'entrée de l'AIB (rapport de stimulation 1,61).

L'addition de HWESAS à IGF1 augmente significativement l'entrée des aa, leurs actions sont synergiques (Tableau XXXVIII, figure 61).

- IGF2 seul augmente également significativement l'entrée des aa par rapport au témoin. Cette expérience confirme que HWESAS seul est sans effet significatif tandis que l'addition de IGF2 et HWESAS augmente significativement cet effet métabolique par rapport à IGF2 seul, l'action est synergique (Tableau XXXIX, figure 62).

En conclusion de ces deux expériences, HWESAS seul n'a pas d'action sur l'entrée du glucose ou des acides aminés dans les cellules (FEP) ; par contre il stimule de façon synergique les effets d'IGF1 et d'IGF2 sur ces métabolismes.

	HWESAS ng/ml						
	0	1 500	2 000	2 500	3 000	3 500	4 000
T							
M (cpm)	3925	4731**					
ET	361	832					
CV %	9,21	17,58					
IGF2							
700 ng/ml							
M (cpm)	5642**		5560**	6783***	7856***	8287***	6605***
ET	873		503	898	592	927	1001
CV %	15,5		9,6	13,24	7,5	11,20	15,15

Tableau XXXVII : Effet d'IGF2 et de l'hexapeptide seuls et en combinaison sur le transport membranaire du glucose mesuré par l'incorporation de 2 désoxy [³H]-glucose. Les résultats sont la moyenne de 5 réplifications. Les résultats sont comparés au témoin.
 ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ (stimulation).

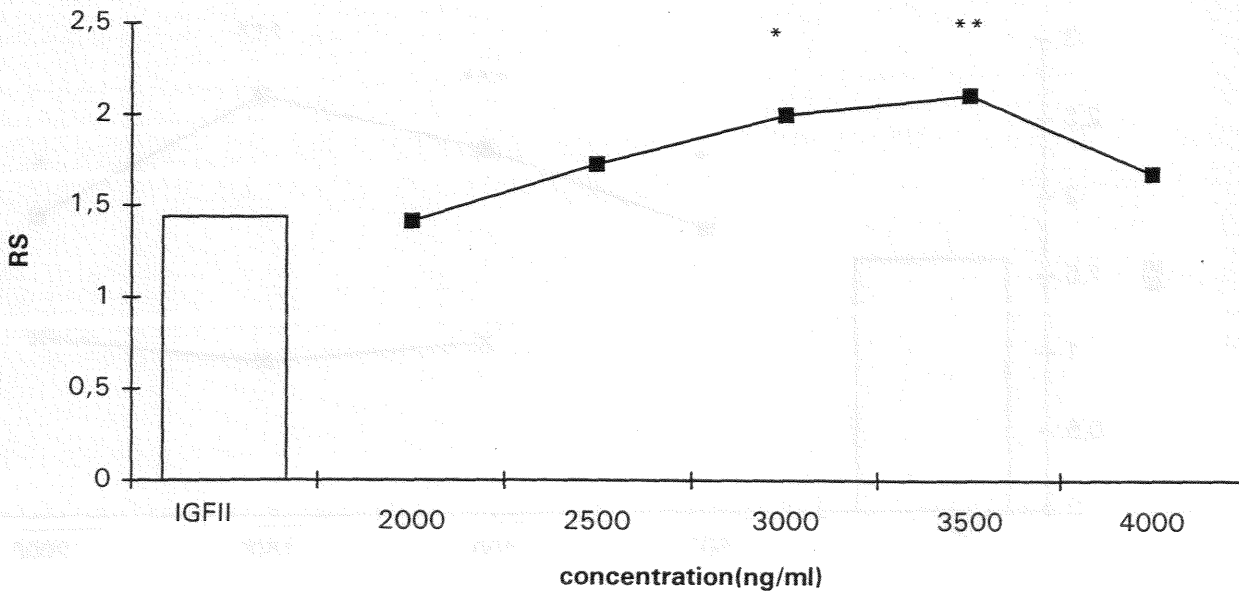


Fig. 60 : Entrée du glucose dans des FEP. Les résultats sont exprimés en rapport de stimulation. IGF2 + HWESAS est comparé à IGF2 seul.
 * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ (stimulation)

	HW ESAS ng/ml				
	0	500	1 000	1 500	2 000
T					
M (cpm)	1018		1121	986	1165
ET	117		136	49	89
CV %	11,45		12,16	4,95	7,62
IGF1 700 ng/ml					
M (cpm)	1638***	1832***	2372***	2728***	1954***
ET	72	113	106	177	148
CV %	4,42	6,59	4,5	6,5	7,58

Tableau XXXVIII : Entrée des aa dans la cellule mesurée par le test avec AIB*. IGF1 et HWESAS ont été testés seuls et en combinaison. Les résultats sont la moyenne de 5 réplifications. Les essais sont comparés au témoin (milieu seul).
 *** $p < 0,001$ (stimulation)

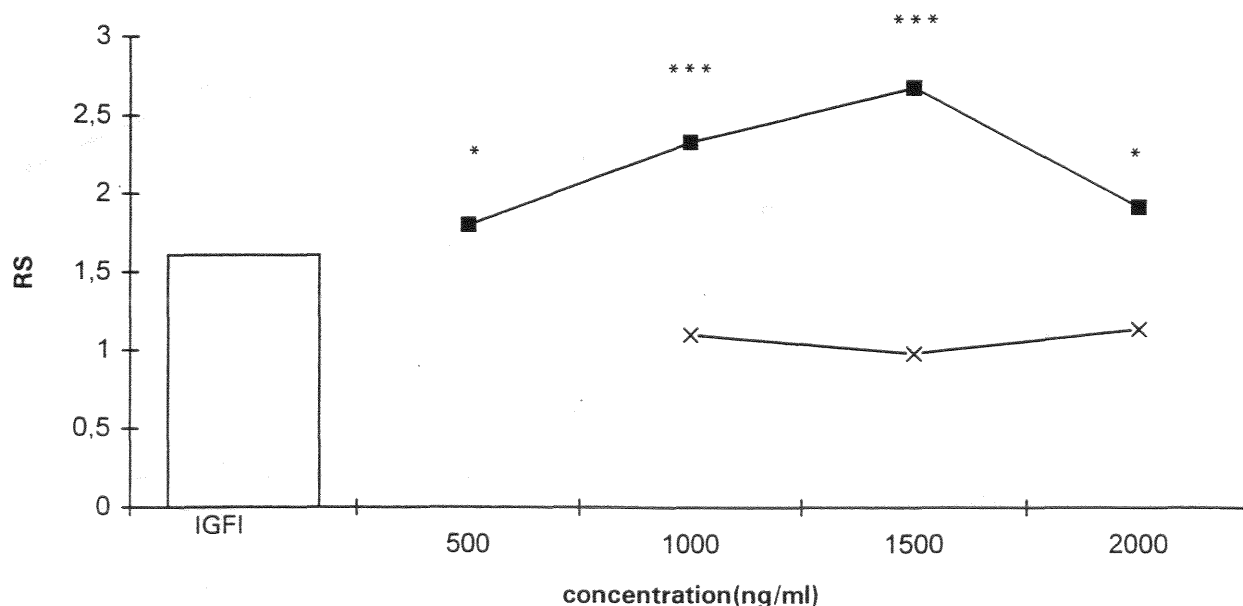


Fig. 61 : Entrée des aa dans des FEP. Les résultats sont exprimés en rapport de stimulation . Les essais (IGF1 + HWESAS) sont comparés à IGF1 seul. * $p < 0,05$ *** $p < 0,001$ (stimulation)

X Effet d'HWESAS seul ■ Effet d'IGF1 + HWESAS

	HWESAS ng/ml				
	0	500	1 000	1 500	2 000
T					
M (cpm)	908				1017
ET	23				190
CV %	2,49				18,7
IGF2 700 ng/ml					
M (cpm)	1437	1738***	2030***	1870**	1718*
ET	98	41	90	310	183
CV %	6,84	2,36	4,43	16,56	10,64

Tableau XXXIX : Entrée des aa dans la cellule mesurée par le test avec AIB*. IGF2 et HWESAS ont été testés seuls et en combinaison. Les résultats sont la moyenne de 5 réplications. Les résultats sont comparés au témoin seul.
 * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ (stimulation)

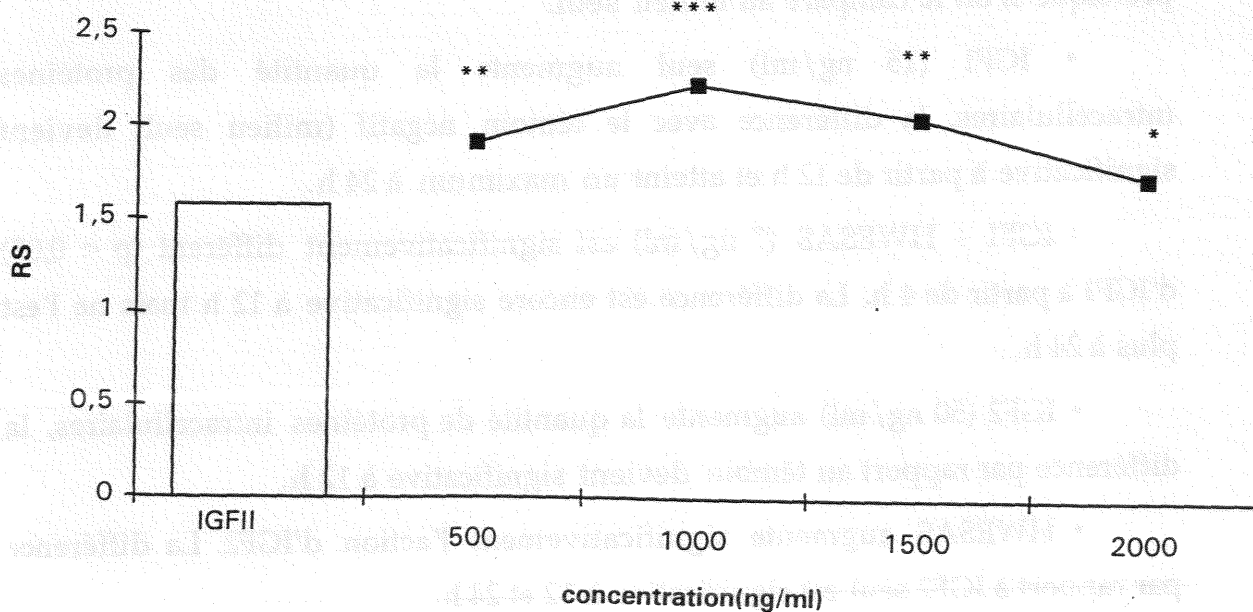


Fig. 62 : Entrée des aa dans des FEP. Les résultats sont exprimés en rapport de stimulation. Les essais (IGF2 + HWESAS) sont comparés à IGF2 seul. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ (stimulation)

III-2.4 Action de HWESAS sur la synthèse des protéines.

III-2.4.1. Quantification des protéines totales.

Nous avons étudié l'effet de HWESAS seul et en présence d'IGF1 et IGF2 sur la concentration intracellulaire des protéines totales pour savoir si elle était corrélée à l'activité mitogénique au cours du temps (Tableau XXXX). D'une manière globale, la synthèse des protéines mesurée par la technique colorimétrique BCA montre des courbes croissantes en fonction du temps avec une pente de croissance plus importante entre 4 et 12 h (Figure 63).

- Dans le témoin (milieu seul) au bout de 4 h, la quantité de protéines a presque doublé. Après 24 h, il y a 4 fois plus de protéines qu'au départ.
- HWESAS seul ne stimule pas de façon significative la synthèse protéique si on le compare au milieu seul.
- IGF1 (15 ng/ml) seul augmente la quantité des protéines intracellulaires, la différence avec le témoin négatif (milieu seul) devient significative à partir de 12 h et atteint un maximum à 24 h.
- IGF1 + HWESAS (7 ng/ml) est significativement différent ($p < 0,05$) d'IGF1 à partir de 4 h. La différence est encore significative à 12 h mais ne l'est plus à 24 h.
- IGF2 (50 ng/ml) augmente la quantité de protéines intracellulaires, la différence par rapport au témoin devient significative à 12 h.
- HWESAS augmente significativement l'action d'IGF2. La différence par rapport à IGF2 seul est significative à 12 et 24 h.

En conclusion, nous constatons que sur 24 h il y a une augmentation de la synthèse protéique en corrélation avec l'augmentation de l'activité mitogénique. Nous notons également que l'effet d'IGF1 seul est plus important que celle d'IGF2, mais en mélange avec HWESAS l'apport du peptide est le

III - Résultats

		2 h	4 h	12 h	24 h
T	M	18,3	31,09	71,54	80,51
	ET	1,76	1,87	5,99	4,43
	CV %	9,76	6	8,38	5,50
IGF1 (15 ng/ml)	M	18,35	35,41	85,67*	110,74***
	ET	0,92	2,67	6,18	5,59
	CV %	5,01	7,54	7,22	5,05
IGF1 + HWESAS	M	20,20	40,97***	95,39***	117,58***
	ET	1	1,41	2,67	6,35
	CV %	4,95	3,43	2,80	5,40
IGF2 (50 ng/ml)	M	19,11	34,07	81,32*	104,16***
	ET	1,09	1,20	2,32	3,44
	CV %	5,69	3,52	2,85	3,30
IGF2 + HWESAS	M	20,74	34,84*	90,32***	111,40***
	ET	1,71	1,53	4,37	2,32
	CV %	8,24	4,38	4,83	2,09
HWESAS (7 ng/ml)	M	18,19	31,26	71,48	78,56
	ET	0,56	1,75	5,11	6,17
	CV %	3,09	5,59	7,14	7,86

Tableau XXXX : Effet d'HWESAS, d'IGF1 et d'IGF2 sur la synthèse protéique. Les résultats sont la moyenne de 4 réplifications. Les résultats sont comparés au témoin.

* $p < 0,05$ *** $p < 0,001$ (stimulation)

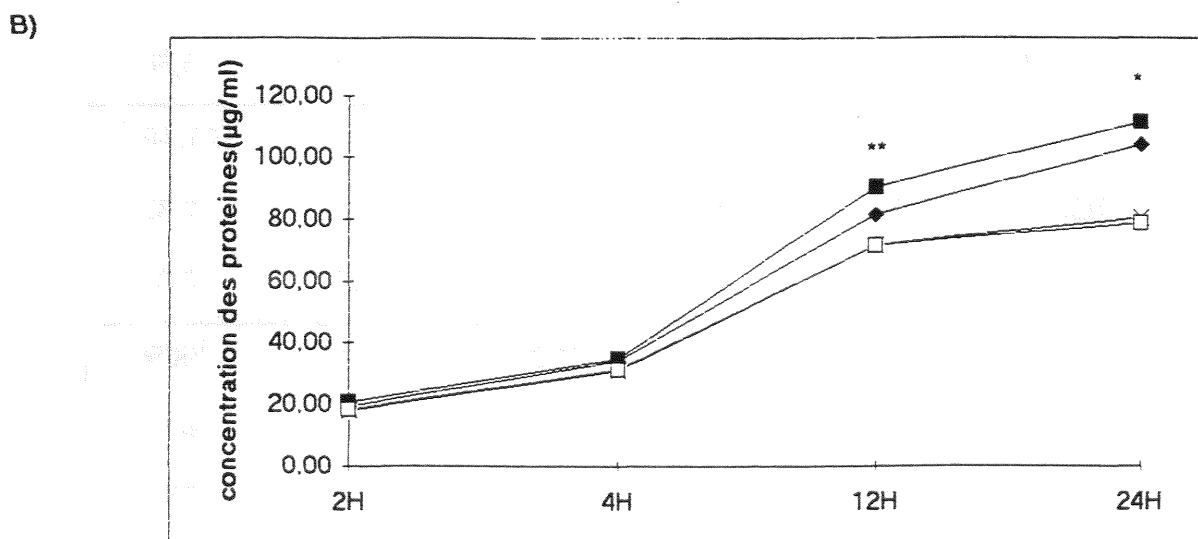
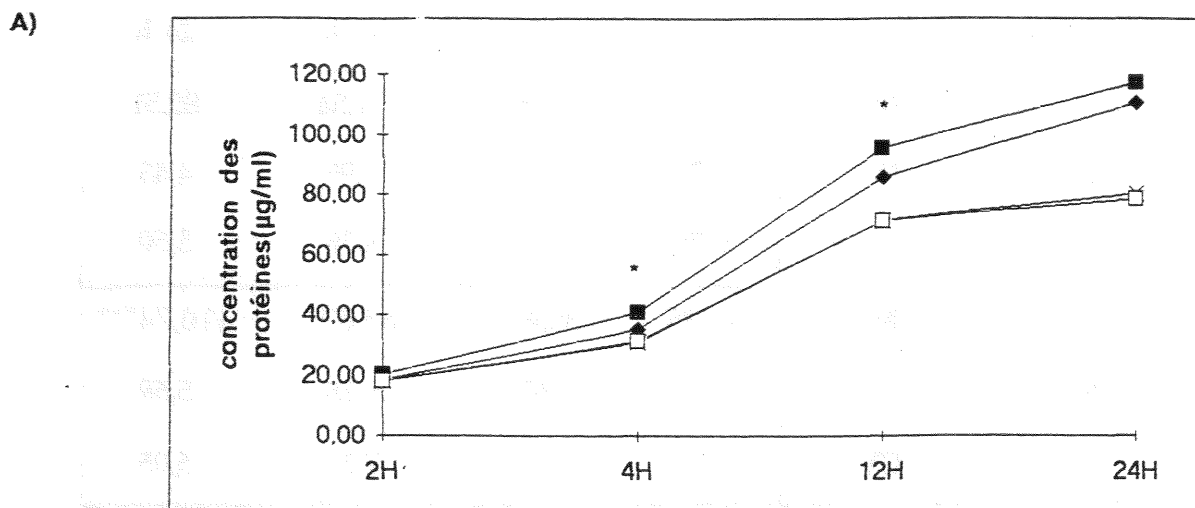


Fig 63 : Action d'IGF1 (A) et d'IGF2 (B) seuls et en présence de HWESAS sur la synthèse des protéines intracellulaires. IGF + HWESAS est comparé à IGF seul par un test-t de Student. * <math>p < 0,05</math> ** <math>p < 0,01</math> (stimulation)

□ Milieu seul X HWESAS ◆ IGF ■ IGF + HWESAS

même (une augmentation de 8 à 9 % de la synthèse protéique par rapport à IGF1 ou IGF2 seuls).

Une électrophorèse en milieu dissociant des protéines intracellulaires totales apporte quelques précisions sur les protéines synthétisées. En présence d'IGF1, deux bandes de 40 et 38 apparaissent. Ces bandes sont absentes lorsque les cellules sont cultivées en présence d'HWESAS et d'HWESAS + IGF1. Par contre les bandes 43, 36, 34, 31, 18, 17 kDa sont plus abondantes dans les protéines des cellules cultivées en présence d'IGF1+ HWESAS (Figure 64).

III-2.4.2. Mesure de l'incorporation d'acides aminés marqués.

Après synchronisation en phase G₀/G₁, les fibroblastes d'embryons de poulets sont cultivés 24 h en présence des produits à tester, les acides aminés marqués [³⁵S]-cystéine ou [¹⁴C]-proline sont maintenus dans le milieu de culture pendant la totalité de l'incubation (Matériel et Méthodes, II-6.1.).

On observe que :

- sous l'action d'IGF1 seul (15 ng/ml), l'incorporation de [³⁵S]-cystéine et [¹⁴C]-proline est augmentée, l'action étant plus importante mais non significativement différente avec la proline (rapport de stimulation 1,24 contre 1,13 pour la cystéine). La proline est en quantité importante dans le collagène. L'effet de l'IGF1 reste cependant bien inférieur à celui du SVF 10 % utilisé comme témoin positif (tableau XXXXI, figure 65).

- HWESAS seul est sans action significative sur l'incorporation de l'un ou l'autre des acides aminés, donc il ne semble pas à lui seul stimuler la synthèse protéique comme cela a été observé dans l'expérience précédente.

- l'addition simultanée d'IGF1 (15 ng/ml) et de HWESAS (6 ng/ml) dans le milieu de culture augmente significativement l'incorporation des deux acides aminés marqués par rapport à l'effet d'IGF1 seul. L'action est synergique puisque HWESAS était sans effet seul.

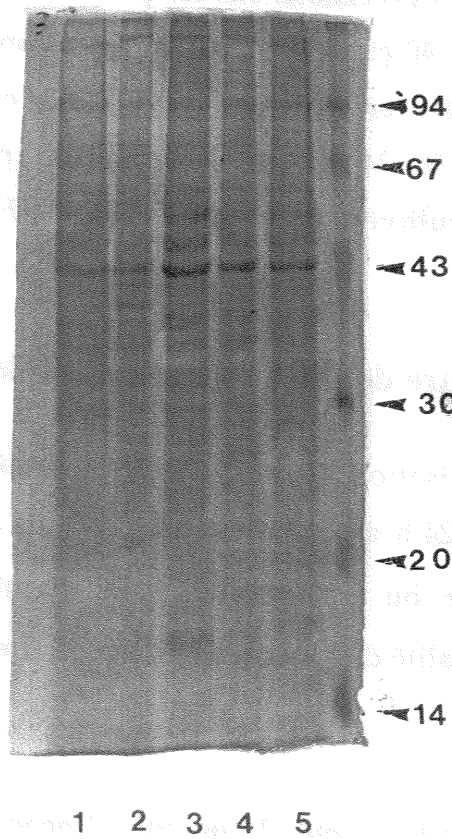


Fig 64 : Electrophorèse SDS-PAGE (gel de polyacrylamide 13 %) des protéines intracellulaires.

- 1 Milieu seul
- 2 IGF1
- 3 IGF1 + HWESAS (15 + 6 ng/ml)
- 4 HWESAS
- 5 Milieu + SVF 10 %

	T milieu seul	T ⁺ 10 % SVF	IGF1 15 ng/ml	HWESAS 6 ng/ml	IGF1 + HWESAS
[³⁵S]-cystéine					
M	34412	71590***	39043**	31334°	44411***
ET	1152	3185	2104	3304	1821
CV %	3,35	4,45	5,39	0,91	4,10
[¹⁴C]-proline					
M	26612	63210***	33112**	29073*	36489***
ET	2385	5684	3222	2270	2199
CV %	8,96	8,99	9,73	7,81	6,03

Tableau XXXXI : Néosynthèse de protéines. Mesure de l'incorporation d'acides aminés marqués dans des fibroblastes d'embryons de poulets. Les résultats sont la moyenne de 4 réplifications. Les résultats sont comparés à T⁻ (milieu seul).
 * p < 0,05 ** p < 0,01 *** p < 0,001 (stimulation) ° p < 0,05 (inhibition)

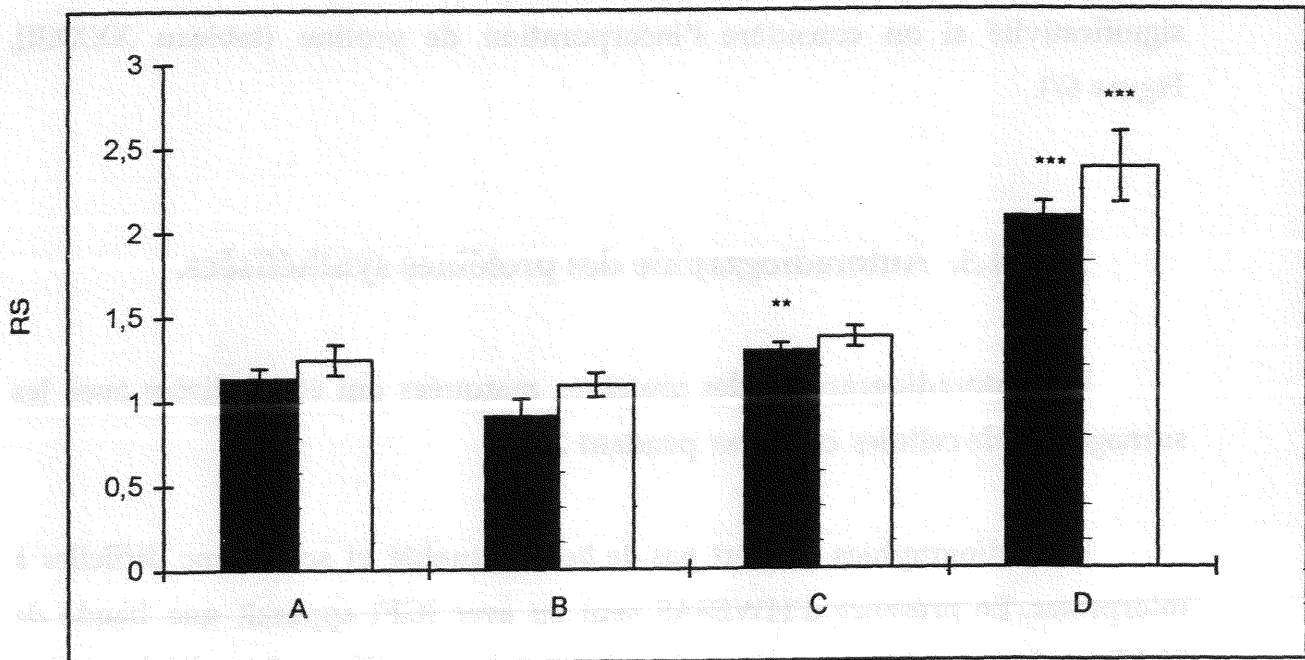


Fig. 65 : Néosynthèse des protéines par mesure de l'incorporation de

■ [³⁵S]-cystéine □ [¹⁴C]-proline

A IGF1 seul B HWESAS seul C IGF1 + HWESAS D SVF 10 %

Les résultats sont exprimés en rapport de stimulation. Les résultats des essais (IGF1 + HWESAS) sont comparés au contrôle (IGF1 seul). ** p < 0,01 *** p < 0,001 (stimulation). L'essai avec SVF (D) est très significativement différent d'IGF1 seul.

Cette première expérience a été confirmée par une seconde faite dans les mêmes conditions en ajoutant cependant les résultats de IGF2 et IGF2 + HWESAS.

- on confirme qu'en présence d'IGF1 seul il y a une augmentation significative de l'incorporation de [³⁵S]-cystéine et [¹⁴C]-proline par rapport au témoin (p < 0,001)

- HWESAS seul est sans action

- IGF1 + HWESAS ont une action synergique sur l'incorporation des acides aminés marqués

- IGF2 (50 ng/ml) seul augmente significativement l'incorporation de [³⁵S]-cystéine et [¹⁴C]-proline

- IGF2 + HWESAS ont également une action synergique. Le résultat est significativement différent d'IGF2 (p < 0,05) si l'on considère l'incorporation de [³⁵S]-cystéine (tableau XXXII, figure 66) ; le résultat n'atteint pas la significativité si on considère l'incorporation de proline (tableau XXXIII, Figure 67).

III-2.4.3. Autoradiographie des protéines synthétisées.

Des autoradiographies des protéines marquées ont été réalisées avec les surnageants de cellules cultivées pendant 24 h.

Les radiographies ne sont pas de bonne qualité et sont donc difficiles à interpréter. En présence d'HWESAS seul ou avec IGF1 apparaît une bande de 53 kDa qui ne semble pas exister dans le témoin négatif ou dans l'échantillon cultivé en présence de 10 % de SVF (marquage à la cystéine, Figure 68). Lorsque les protéines sont synthétisées en présence de [¹⁴C]-proline, on constate seulement que les bandes sont plus intenses en présence d'IGF1 + HWESAS qu'avec IGF1 seul (Figure 69).

III - Résultats

	T	IGF1	IGF1 + HWESAS	IGF2	IGF2 + HWESAS	HWESAS
M (cpm)	21997***	30496***	35767***	28881***	32842***	22272
ET	1266	2062	1839	1505	1618	1905
CV %	5,76	6,76	5,14	5,21	4,93	8,56

Tableau XXXXII : Mesure de l'incorporation de [³⁵S]-cystéine dans des fibroblastes d'embryons de poulets. Les résultats sont la moyenne de 4 réplifications et sont comparés au témoin. *** $p < 0,001$ (stimulation).

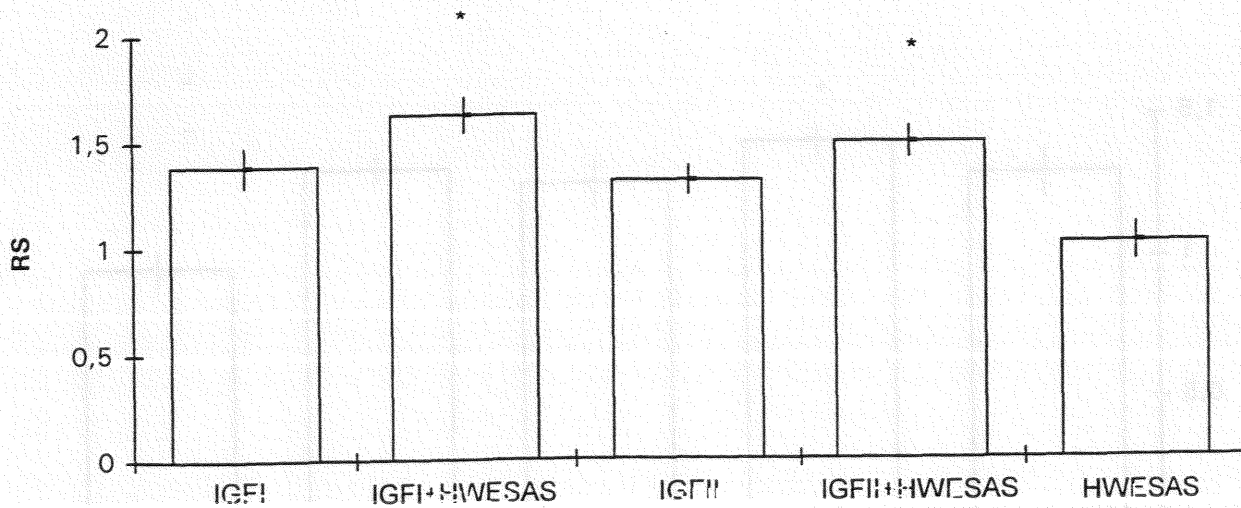


Fig. 66 : Mesure de l'incorporation de [³⁵S]-cystéine. Les résultats sont exprimés en rapport de stimulation. IGF1 ou IGF2 + HWESAS sont comparés respectivement à IGF1 ou IGF2. * $p < 0,05$ (stimulation)

	T	IGF1	IGF1 + HWESAS	IGF2	IGF2 + HWESAS	HWESAS
M (cpm)	11873	15394***	16795***	15155***	15798***	11735
ET	682	953	614	1039	627	770
CV %	5,74	6,19	3,66	6,85	3,97	6,56

Tableau XXXXIII : Mesure de l'incorporation de [¹⁴C]-proline dans des fibroblates d'embryons de poulets Les résultats sont la moyenne de 4 réplifications. Les résultats sont comparés au témoin. *** p < 0,001 (stimulation).

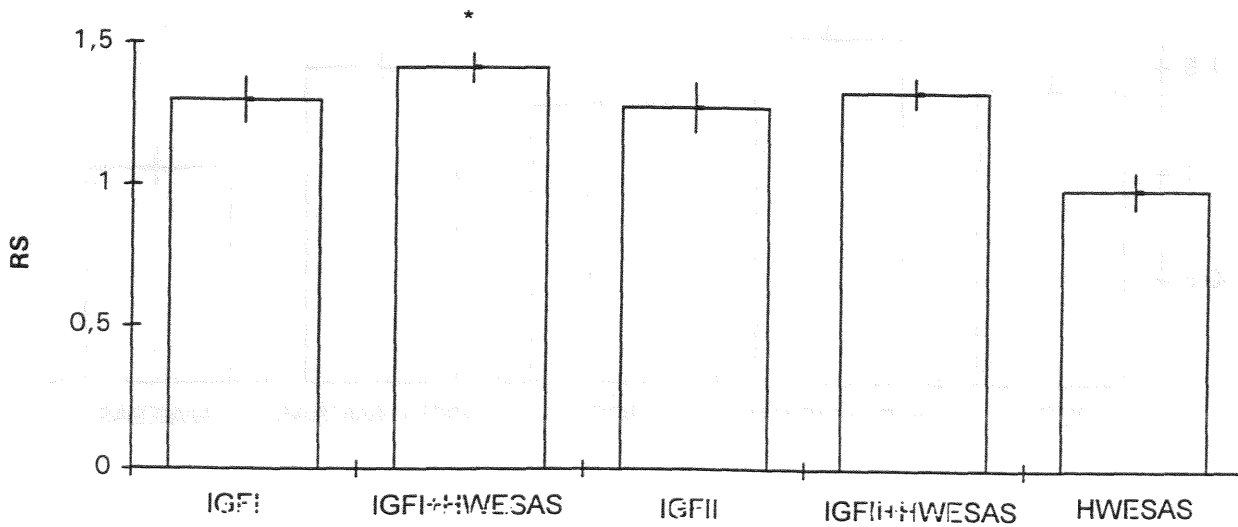


Fig. 67 : Mesure de l'incorporation de de [¹⁴C]-proline. Les résultats sont exprimés en rapport de stimulation. IGF1 ou IGF2 + HWESAS sont comparés respectivement à IGF1 ou IGF2. * p < 0,05 (stimulation).

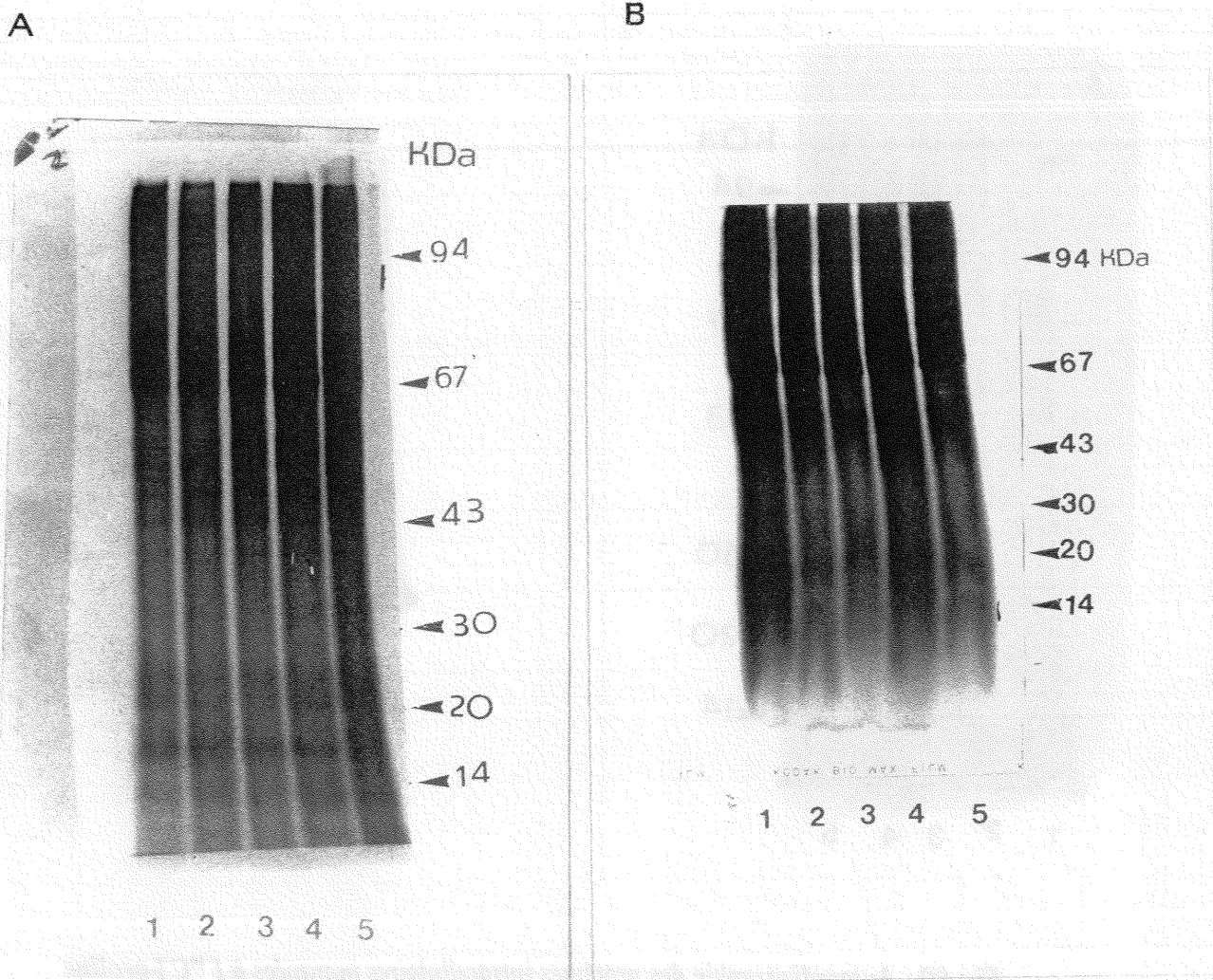
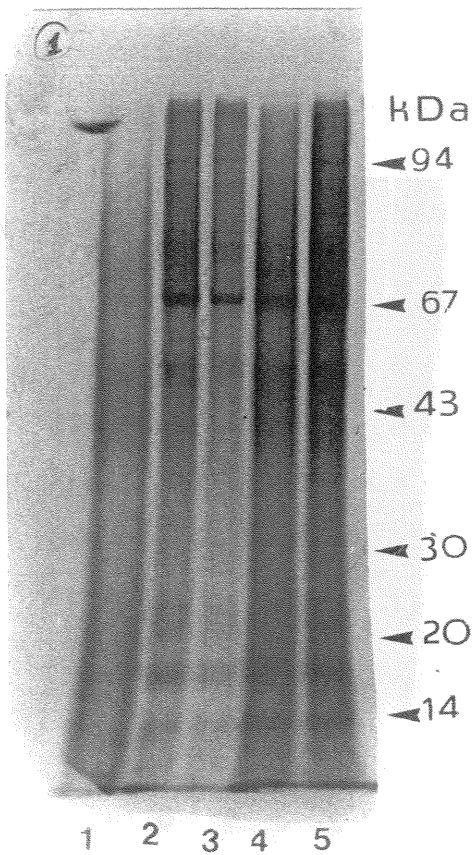


Fig 68 : Autoradiographie des protéines intracellulaires marquées à [³⁵S]-cystéine

- 1 Milieu seul
- 2 IGF1
- 3 IGF1 + HWESAS
- 4 HWESAS
- 5 Milieu + SVF 10 %

- 1 Milieu + SVF 10 %
- 2 HWESAS
- 3 IGF2
- 4 IGF2 + HWESAS
- 5 Milieu seul

A



B

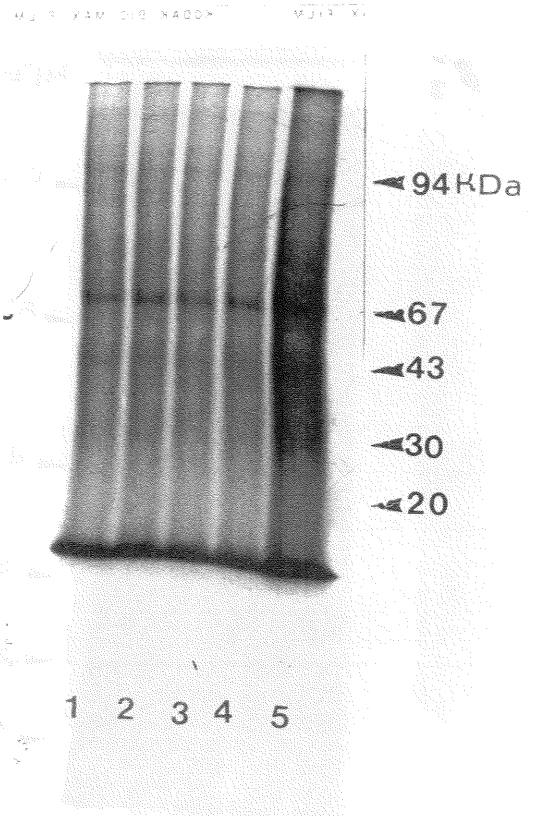


Fig 69 : Autoradiographie des protéines intracellulaires marquées à [14 C]-proline

- 1 Milieu seul
- 2 IGF1 + HWESAS
- 3 IGF1
- 4 HWESAS
- 5 Milieu + SVF 10 %

- 1 Milieu seul
- 2 IGF2
- 3 IGF2 + HWESAS
- 4 HWESA
- 5 Milieu + SVF 10 %

III-2.4.4. Phosphorylation des protéines

III-2.4.4.1. Phosphorylation totale.

Nous avons étudié la phosphorylation des protéines sur des fibroblastes d'embryons de poulets cultivées 24 h en présence d'IGF1 et de HWESAS. Ensuite pour savoir si la phosphorylation des protéines était un phénomène précoce, nous avons réalisé une cinétique en fonction du temps.

Les résultats obtenus à 24 h de culture sont consignés dans la figure 70 et le tableau XXXXIV.

- En présence d'IGF1 (15 ng/ml) il y a une augmentation significative des protéines phosphorylées .
- Il n'y a pas d'augmentation mesurable de la phosphorylation à 24 h en présence du peptide seul
- IGF1 et HWESAS agissent en synergie (la différence avec IGF1 seul est significative $p < 0,01$) sur la phosphorylation des protéines.

Dans cette première expérience, nous constatons que les protéines phosphorylées sont augmentées après 24 h de culture en présence des facteurs de croissance, nous avons par la suite fait des cinétiques de phosphorylation.

Les tableaux XXXXV et XXXXVI et les figures 71-72 résument les résultats de deux expériences.

- La concentration en protéines phosphorylées augmente au cours du temps dans le témoin (milieu seul) et les essais.
- L'IGF1 stimule significativement l'incorporation de [³³P]-ATP, le rapport de stimulation maximum est obtenu à 12 h. La différence est significative avec le témoin dès la quatrième heure (1^{ère} expérience).

	T	IGF1	IGF1 + HWESAS	HWESAS
M (cpm)	31564	57647***	68324***	31212
ET	1265	5429	4956	3812
CV %	4,0	9,4	7,3	12,2

Tableau XXXXIV : Phosphorylation des protéines sous l'action d'IGF1, HWESAS ou d'IGF1 + HWESAS. L'expérience a été faite sur des fibroblastes d'embryons de poulets. *** $p < 0,001$ (stimulation)

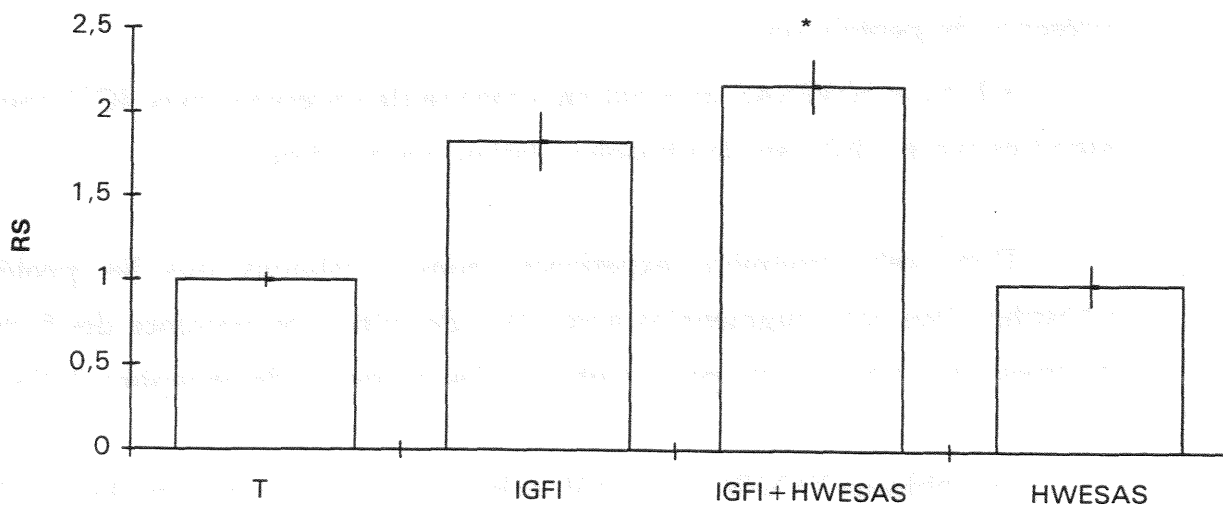


Fig. 70 : Action d' IGF1, HWESAS et IGF1 + HWESAS sur la phosphorylation des protéines. Les résultats sont exprimés en rapport de stimulation. IGF1 + HWESAS est comparé à IGF1 seul. * $p < 0,05$ (stimulation).

III - Résultats

	1/4 h	1/2 h	3/4 h	4 h	12 h	24 h	48 h
T	75	98	160	540	1280	2518	6510
ET	5	5	8	42	84	116	562
CV %	7,32	4,8	5,00	7,84	6,60	4,60	8,63
IGF1 (15 ng/ml)	73	79	192*	737**	2277***	4366***	6640
ET	5	5	15	52	108	240	572
CV %	6,45	5,96	7,76	7,02	4,75	5,50	8,62
IGF1 + HWESAS	72	75	144	864***	2816***	5394***	6575
ET	6	5	5	41	154	339	154
CV %	8,71	7,32	3,81	4,72	5,49	6,28	2,35
IGF2 (50 ng/ml)	68	76	162	659*	2048***	3764***	4166
ET	3	6	19	19	144	147	196
CV %	4,61	8,25	11,62	11,62	7,05	3,92	4,71
IGF2+ HWESAS	71	74	135	810***	2342***	4491***	5338
ET	6	3	9	67	48	246	586
CV %	7,92	4,24	6,39	8,33	2,05	5,48	10,97
HWESAS (7 ng/ml)	69	73	130	556	1382	2567	5960
ET	7	5	5	26	109	265	327
CV %	10,23	7,52	3,62	4,65	7,86	10,20	5,49

Tableau XXXXV : Cinétique de phosphorylation des protéines sous l'action d'IGF1, IGF2, HWESAS, IGF1 + HWESAS et d'IGF2 + HWESAS. L'expérience a été faite sur des fibroblastes d'embryons de poulets (1^{re} expérience). Les résultats sont exprimés en cpm, ce sont la moyenne de 4 réplifications. Les résultats sont comparés au témoin correspondant.

* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$

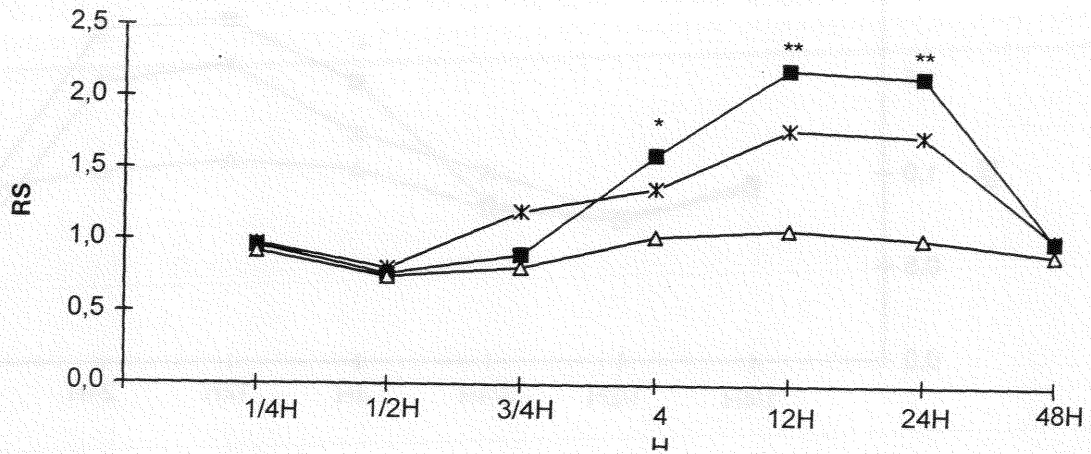
III - Résultats

	1/4 h	1/2 h	2 h	4 h	12 h	24 h	48 h
T	83	108	299	1056	10261	17242	25773
ET	3	10	24	60	469	1731	2121
CV %	3,20	8,85	8,13	5,67	4,57	10,04	8,23
IGF1 (15 ng/ml)	84	104	355*	1484**	19216***	28837***	27462*
ET	4	8	28	178	1199	1738	3402
CV %	4,80	7,83	7,84	11,98	6,24	6,03	12,39
IGF1 + HWESAS	82	112	363	1688***	24671***	33967***	25709
ET	5	13	31	159	2150	2773	1781
CV %	5,86	12,04	8,48	9,42	8,71	8,16	6,93
IGF2 (50 ng/ml)	80	116	325	1270**	16770***	26164***	25195
ET	6	13	26	39	733	1913	2931
CV %	6,97	11,53	8,10	3,04	4,37	7,31	11,63
IGF2+ HWESAS	84	116	311	1594**	21179***	30423***	26588
ET	6	9	24	123	1260	2139	4204
CV %	7,59	7,42	7,61	7,69	5,95	8,30	1,03
HWESAS (7 ng/ml)	72	106	302	1171	10359	17127	23650
ET	10	5	27	129	1401	1483	2240
CV %	14,27	4,70	9,08	11,02	13,53	8,66	9,47

Tableau XXXXVI : Cinétique de phosphorylation des protéines sous l'action d'IGF1, IGF2, IGF1 + HWESAS et d'IGF2 + HWESAS. L'expérience a été faite sur des fibroblastes d'embryons de poulets (2^{ème} expérience). Les résultats sont exprimés en cpm, ce sont la moyenne de 4 réplifications. Les résultats sont comparés au témoin correspondant.

* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ (stimulation)

A)



B)

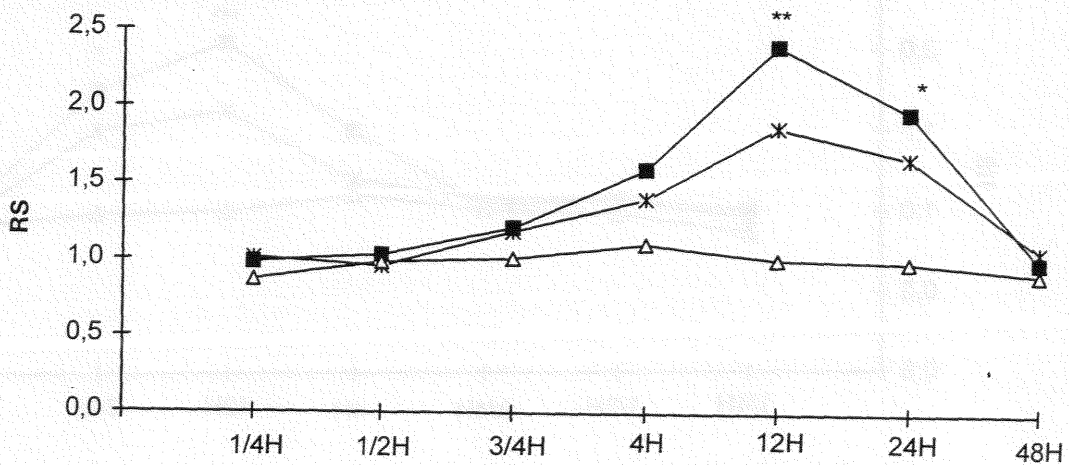
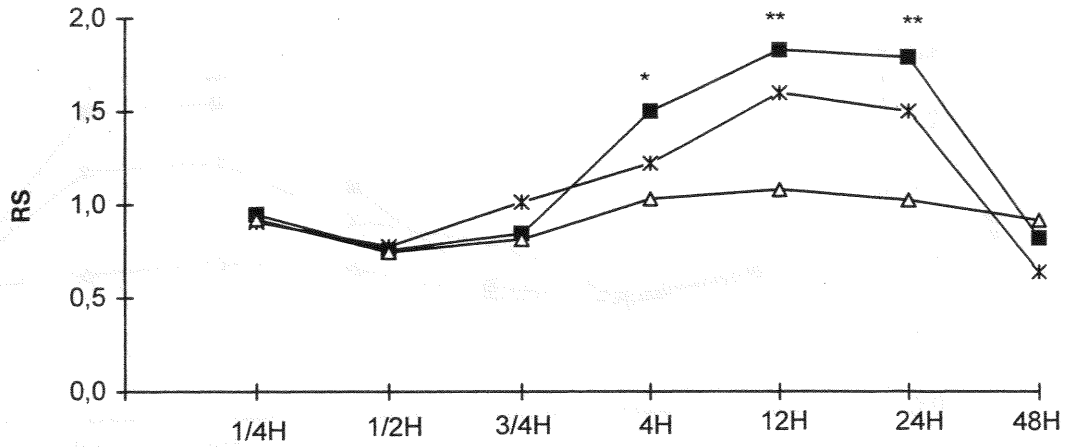


Fig. 71 : Action d'IGF1 et d'IGF1 + HWESAS sur la phosphorylation des protéines. A et B représentent deux expériences différentes. Les résultats sont exprimés en rapport de stimulation. IGF1 + HWESAS est comparé à IGF1 seul. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$.

x IGF1 Δ HWESAS seul ■ IGF1 + HWESAS

A)



B)

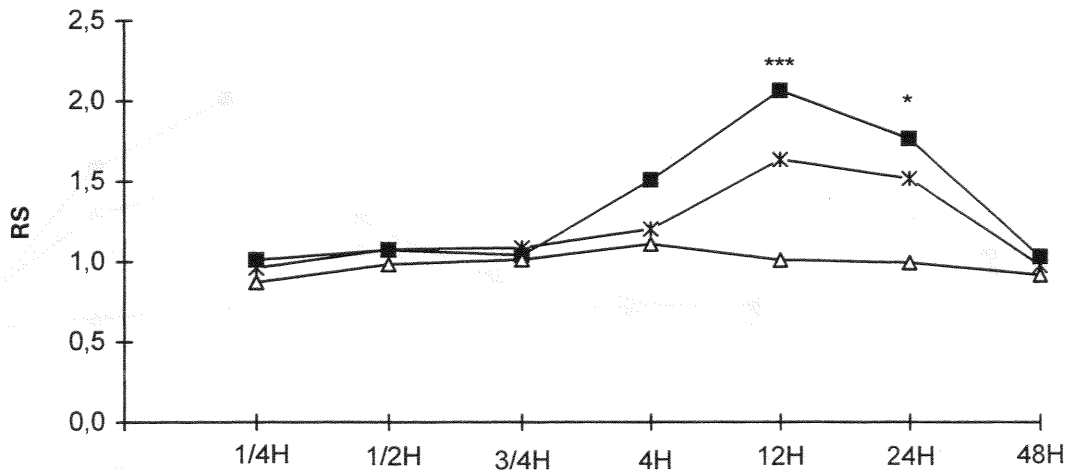


Fig. 72 : Action d'IGF2 et d'IGF2 + HWESAS sur la phosphorylation des protéines. A et B représentent deux expériences différentes. Les résultats sont exprimés en rapport de stimulation. IGF2 + HWESAS est comparé à IGF2 seul.
 * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$.

x IGF2 Δ HWESAS seul ■ IGF2 + HWESAS

- L'IGF2 stimule significativement l'incorporation de [³³P]-ATP. Le RS maximum est également obtenu à 12 h et comme pour IGF1, il commence à être significativement différent du témoin à partir de 4 h.

- HWESAS seul n'a pas d'action significative sur la phosphorylation des protéines.

- IGF1 + HWESAS agissent en synergie. Cette synergie est significative dès 4 h pour la première expérience, elle passe par un maximum de 12 h. A 48 h la phosphorylation est au niveau du témoin (milieu seul).

- IGF2 + HWESAS agissent aussi en synergie. La synergie est significative à partir de 4 h. Le maximum est à 12 ou 24 h selon l'expérience.

Les résultats de ces deux expériences sont complètement concordants. HWESAS n'a pas d'action sur la phosphorylation des protéines, par contre il agit en synergie avec IGF1 ou IGF2.

III-2.4.4.2. Autoradiographie des protéines phosphorylées.

L'autoradiographie a été faite avec les échantillons cultivés 24 h en présence de [³³P]-ATP. Le nombre et l'importance des protéines phosphorylées sont faibles dans le témoin négatif. HWESAS seul n'augmente que faiblement ce taux de phosphorylation ; par contre IGF1 seul et IGF1 + HWESAS augmentent préférentiellement la phosphorylation d'une protéine de 43 kDa mais d'autres protéines de masse moléculaire de 65, 55 et 47 kDa semblent également plus phosphorylées.

Des résultats semblables sont obtenus avec IGF2. Cependant il semble que HWESAS majore plus nettement l'activité sur les phosphorylations d'IGF2 que IGF1. L'action s'exerce préférentiellement sur une protéine de 43 kDa mais aussi sur des protéines de 36, 34, 27, 65, 56, 52 et 46 kDa (Figure 73).

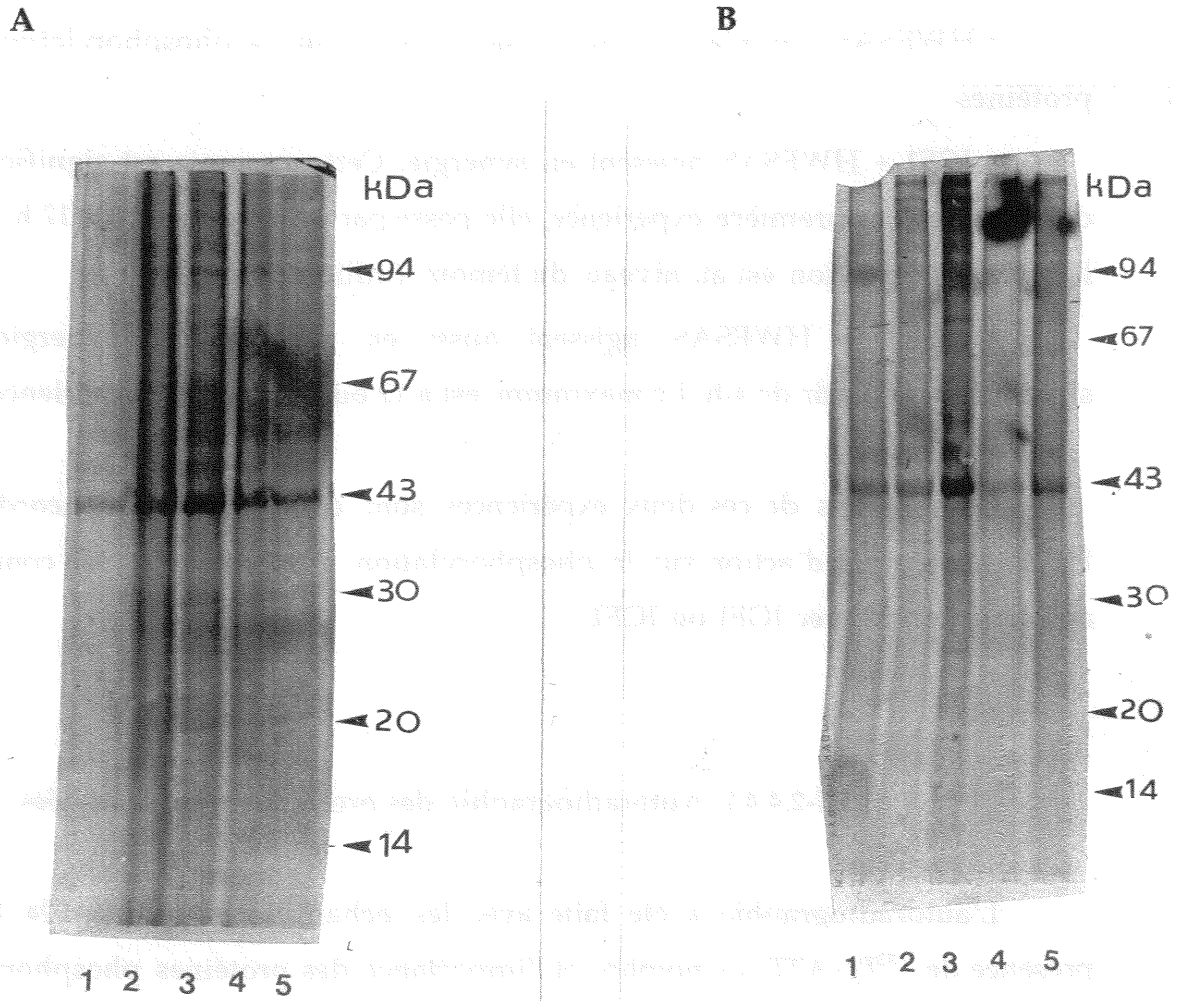


Fig 73 : Autoradiographie des protéines intracellulaires phosphorylées en présence de IGF1 (A) et d'IGF2 (B)

- 1 Milieu seul
- 2 IGF
- 3 IGF + HWESAS
- 4 HWESAS
- 5 Milieu + SVF 10 %

IV - DISCUSSION

IV - I Présence de FCPPM dans les sérums d'animaux

IV- 1.1. Rappel des résultats obtenus avec UF et rétentats de sérums.

La présence de FCPPM a été initialement mise en évidence par la capacité de l'UF (molécules < 1000 Da) de sérum humain à stimuler de façon synergique l'activité de sulfatation soit de facteurs de croissance de masse moléculaire élevée contenus dans le rétentat de sérum soit de somatomédines partiellement purifiées (Heulin 1981, 1981b, 1982 ; Straczek, 1989).

Les somatomédines (ou IGF1) sont également connues pour exercer une activité mitogénique sur de nombreux types de cellules (Minuto, 1988 ; Sieradzki, 1988 ; Dousset, 1997). Des essais ont donc été effectués avec différentes lignées cellulaires afin de déterminer si les FCPPM du sérum humain étaient capables de stimuler cette activité. Quelque soit le modèle expérimental utilisé (chondrocytes d'embryons de poulets, fibroblastes d'embryons de poulets ou humains, lymphocytes humains activés par la PHA), il a été démontré que l'activité somatomédine était stimulée par les FCPPM (Artur, 1987 ; Heulin, 1982, Heulin *et al.*, 1987).

Des travaux furent ensuite réalisés pour déterminer si une activité FCPPM pouvait être détectée dans des sérums d'animaux. Ces expériences étaient faites dans le but de trouver une matière première plus facilement disponible que le sérum humain pour la purification des FCPPM. Ces études ont donc été réalisées avec des UF et des rétentats de sérums de gros animaux. La présence de FCPPM est mesurée à l'aide du test de sulfation dans des cartilages d'embryons de poulets et d'un test d'activité mitogénique utilisant l'incorporation de [³H]-thymidine dans des FEP (Gmira, 1991).

Il a été constaté que l'UF seul préparé à partir de sérum de cheval, de boeuf, de veau foetal et de rat étaient soit légèrement actifs soit inactifs lors du test de sulfatation tandis que ceux de porc et de lapin inhibaient l'incorporation de ³⁵SO₄ dans des cartilages d'embryons de poulets. Lorsque l'UF était associé au

rétentat, l'activité de sulfatation mesurée était similaire à celle du rétentat dans le cas de l'UF de boeuf, de lapin et de rat tandis qu'une synergie était observée entre les deux fractions préparées à partir de sérum de veau foetal ou de porc. Ces résultats laissent supposer l'existence de FCPPM, contenus dans l'UF de certains animaux puisque ce dernier stimule de façon synergique l'activité de sulfatation du rétentat du sérum correspondant comme cela avait été observé avec le sérum humain.

IV-1.2. Action des UF d'origine animale sur la prolifération cellulaire en présence d'IGF1 et d'IGF2.

Certains sérum d'animaux présentent par eux-mêmes ou en synergie avec le rétentat, soit un effet stimulateur, soit inhibiteur sur l'incorporation de [³H]-thymidine. Il nous a paru nécessaire de compléter ces observations en étudiant plus précisément avec quel facteur contenu dans le rétentat de sérum les FCPPM de l'UF agissaient, en choisissant l'activité mitogénique comme modèle expérimental. Les expériences montrent que les FCPPM agissent essentiellement avec les IGFs. Ainsi, Thiebaut (1992) a constaté qu'en présence d'IGF1 (6,25 à 50 ng/ml), l'UF de sérum humain exerce un effet additif à la concentration de 1,25 ou 2,5 % et synergique pour des concentrations de 5 à 10 %. Avec l'IGF2, testé à des concentrations de 12,5 à 100 ng/ml, il existe une synergie quelle que soit la concentration d'UF testée. Un effet potentialisateur a été démontré avec l'EGF tandis qu'aucune stimulation n'a été observée avec le FGF (Rajoelina, 1987).

Pour déterminer si l'interaction responsable de cette synergie entre UF et rétentat de sérums animaux se faisait bien entre les FCPPM et les IGFs et éventuellement de manière préférentielle avec l'un ou l'autre de ces deux facteurs de croissance, des expériences similaires aux premières ont été réalisées mais le rétentat de sérum a été remplacé par de l'IGF1 ou IGF2 humain recombinant. Ces composés ont été respectivement utilisés aux concentrations de 15 ng/ml et 50 ng/ml ; nous avons choisi les concentrations qui entraînent l'activité mitogénique maximum des IGFs sur les FEP (augmentation d'un

facteur 2 environ). Thiebaut (1992) avait déjà déterminé dans un travail précédent que la concentration d'IGF2 donnant l'activité mitogénique maximum était environ trois fois supérieure à celle d'IGF1.

Les résultats que nous avons obtenus avec les différents UF testés seuls sont en accord avec ceux précédemment rapportés (Gmira, 1991). Ils confirment que ces UF préparés à partir de sérum de mammifères peuvent par eux-mêmes stimuler ou inhiber l'incorporation de [³H]-thymidine.

Effet inhibiteur de l'activité mitogénique : Les UF de sérum de rat et de mouton sont inhibiteurs. Gmira (1991) l'avait déjà constaté pour l'UF de rat, l'UF de mouton n'avait pas été testé. L'UF de sérum de veau fœtal a des effets opposés selon la concentration utilisée : il stimule l'activité mitogénique à faible concentration mais l'inhibe à forte concentration. On sait que le sérum de veau fœtal largement utilisé en culture cellulaire contient des inhibiteurs de croissance et habituellement le SVF est chauffé pour les éliminer. Ces inhibiteurs n'ont pas à notre connaissance été décrits en détail ; à partir de nos expériences, on peut en déduire qu'au moins une partie d'entre eux sont de faible poids moléculaire.

Effet stimulateur de l'activité mitogénique : Les UF de cheval, de boeuf, de porc sont mitogéniques à toutes les concentrations testées ; cependant, l'activité de l'UF de boeuf et de porc est inférieure à celle de l'UF humain ; alors que celle de l'UF de cheval est au moins égale sinon supérieure. D'ailleurs, le sérum de cheval est quelquefois utilisé en remplacement du SVF dans les cultures cellulaires (Capiaumont *et al.*, 1995).

L'activité mitogénique de certains UF dépasse l'activité mitogénique d'IGF1 seul (15 ng/ml, RS moyen 1,6) ou d'IGF2 seul (RS moyen 1,65) ; c'est le cas pour le cheval, le boeuf, la souris. L'activité mitogénique de l'UF de porc, de lapin est généralement un peu inférieure à celle des IGFS seuls.

L'addition simultanée des UF de sérums d'animaux à de l'IGF1 ou IGF2 recombinants entraîne des résultats variables parfois différents de ceux obtenus avec le rétentat de sérum de ces mêmes animaux.

L'UF de mouton inhibe fortement l'activité mitogénique d'IGF1 et d'IGF2. Il avait la même action sur les rétentats. Il en est de même de l'UF de rat, inhibiteur de l'activité mitogénique du rétentat, d'IGF1 et d'IGF2. L'UF de SVF inhibe l'activité mitogénique d'IGF1 et d'IGF2 alors qu'il ne modifiait pas l'activité du rétentat.

D'autres UF stimulent l'activité mitogénique d'IGF1 ou (et) d'IGF2. L'UF de porc a un effet synergique sur le rétentat et IGF1 mais il est inactif avec IGF2.

L'UF de boeuf agit en synergie avec IGF2 sans modifier l'effet mitogénique d'IGF1 ou du rétentat.

L'UF de cheval potentialise l'effet d'IGF1 et d'IGF2 ; il stimulait aussi l'action du rétentat. L'UF de souris potentialise également l'action d'IGF1 et d'IGF2.

L'UF de lapin qui avait une très faible activité mitogénique seul est sans action sur IGF1 et IGF2.

Est-ce que de ces différents résultats on peut tirer des conclusions ou au moins émettre des hypothèses sur le fonctionnement des FCPPM ?

Tout d'abord, on peut conclure que certains UF d'animaux contiennent des facteurs de faible masse moléculaire exerçant une activité inhibitrice sur les facteurs de croissance de plus haut poids moléculaire contenus dans le rétentat ou sur des facteurs recombinants comme IGF1 et IGF2 ; c'est le cas des UF de mouton ou de rat. Boffa *et al.* (1985) avaient déjà décrit un effet inhibiteur du sérum de rat sur la prolifération des hépatocytes de rats nouveaux-nés ; ceci serait induit par un facteur de faible masse moléculaire.

La présence de ces molécules inhibant l'activité des FCPPM et des IGFs pourrait être reliée aux IGFBPs. Cette famille de protéines lie spécifiquement les IGFs conditionnant la concentration de la fraction libre considérée comme seule bioactive. Les IGFBPs ont un poids moléculaire compris entre environ 25 et 40 kDa. Mais les IGFBPs sont de façon physiologique clivées par des protéases de

type sérine-protéases (Jones et Clemmons, 1995) tel que l'antigène spécifique de la prostate (Fielder, 1994). Cette protéolyse est un mécanisme de régulation qui libère des fragments d'IGFBP dont le plus petit a une masse moléculaire d'environ 14 kDa ; ce dernier a des affinités variables pour les IGFs (Blum, 1993). La présence de ces fragments dans certains UF pourrait leur conférer une propriété inhibitrice.

Plus intéressant pour nous sont les UF qui stimulent l'activité mitogénique soit de rétentats de sérums d'animaux soit d'IGFs recombinants. Nous avons émis l'hypothèse que la présence de peptides identiques ou proches de ceux trouvés dans l'UF de sérum humain expliquait cette activité. Grâce à l'obtention d'anticorps anti HWESAS (Capiaumont *et al.*, 2000), nous avons pu rechercher ce peptide et nous l'avons identifié dans l'UF de cheval et plus particulièrement de jument, dans les UF de boeuf et de porc ; nous n'avons pas pu trouver ce peptide dans l'UF de mouton, de rat et de lapin ; nous ne l'avons pas recherché chez la souris ; ces résultats sont importants pour nous car ils peuvent nous donner une piste quant à l'origine de ce peptide. Chez l'homme, la séquence HWESAS n'est retrouvée que dans la fraction C3f du complément. La protéolyse de cette molécule pourrait libérer l'hexapeptide.

Cette séquence est retrouvée dans le cytochrome P450 bovin (P450-C21) (Data base swiss PRVT et PIR, Fortal Software).

Les résultats obtenus avec les rétentats d'animaux et les IGFs ne sont pas toujours superposables ; plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer ces différences.

Le rétentat comprend de nombreuses molécules dont le seul point commun est d'avoir une masse moléculaire supérieure à 1000 Da. Outre les IGFs s'ajoutent tous les autres membres de la famille des facteurs de croissance dont la définition était dans un premier temps établie à partir de leur activité mitogénique ; ainsi, le rétentat doit contenir de l'EGF, des FGFs, du PDGF dont les concentrations réciproques peuvent varier selon l'espèce considérée. Leur présence pourrait expliquer pourquoi l'UF de sérum de cheval a une activité synergique avec le rétentat correspondant mais seulement un effet additif avec

IGF1 et IGF2, puisque les FCPPM humains ont aussi un effet potentialisateur sur l'EGF (Thiebaut, 1992).

Une autre alternative susceptible d'expliquer cette disparité d'action de l'UF en présence de rétentat ou d'IGF concerne la nature des IGFs utilisés dans les essais qui sont des IGFs recombinants humains. Les IGFs des autres mammifères présentent, comme cela est souligné dans la littérature, une très importante homologie avec ceux de l'homme. Mais on peut imaginer que les IGFs des différentes espèces, contenus dans le rétentat, peuvent se lier aux récepteurs cellulaires avec une affinité différente, et donc exercer des actions avec une intensité différente de celles des IGFs recombinants utilisés dans les modèles expérimentaux de l'étude.

Un autre aspect qui doit être également abordé est celui de la concentration circulante des IGFs. De nombreuses études font mention chez les animaux de valeurs qui ne sont pas toujours semblables à celles évaluées chez l'homme ; valeurs susceptibles d'intervenir d'une certaine manière dans les activités biologiques des rétentats considérés (Cf. introduction).

En résumé, le sérum de différents mammifères contient des molécules de masse moléculaire < 1000 Da susceptibles de moduler les activités biologiques des facteurs de croissance de haut poids moléculaire et en particulier des IGFs. Ceci a été constaté en considérant les deux actions des IGFs qui sont en général évaluées *in vitro*, l'action sur la synthèse d'ADN et la prolifération cellulaire (activité mitogénique) et les effets anaboliques sur le métabolisme des protéines et des protéoglycanes (activité de sulfatation).

Des interactions entre des facteurs sériques de petit poids moléculaire existant dans le sérum de mammifères et des facteurs de croissance tels les IGFs modulant les effets de ces derniers, ont déjà été décrites dans la littérature.

Dans une étude récente (Monotti *et al.*, 1998), il a été montré que la vasopressine, hormone constituée de 8 AA accroît également l'activité des cellules musculaires en présence d'IGF. A l'inverse l'acide rétinoïque peut se fixer directement sur le récepteur de IGF2 en un site différent de celui fixant le mannose 6P et l'IGF2. La liaison de forte affinité ainsi formée supprime la prolifération cellulaire et favorise l'apoptose (Kang *et al.*, 1997).

Les résultats obtenus avec les UF d'animaux montrent que certains des UF stimulent l'action mitogénique d'IGF1 et d'IGF2. Certains des UF ont un effet potentialisateur sur IGF1 et (ou) IGF2, cela peut ouvrir des voies dans la compréhension des mécanismes impliqués ; on peut supposer que des mécanismes de transduction différents sont impliqués dans la transduction du signal IGF1, IGF2 et HWESAS.

En conclusion, les UF de certains animaux contiennent des petits facteurs de croissance stimulant l'activité d'IGF1 et d'IGF2. Une partie de l'activité mitogénique au moins est due à la présence d'un facteur HWESAS déjà identifié chez l'homme. Pour l'instant, nous n'avons pas recherché dans les UF d'animaux la présence d'un autre peptide mitogénique WGHE aussi identifié chez l'homme.

IV-2. Activité mitogénique de HWESAS et de peptides ayant une relation structurale dans différentes lignées cellulaires.

IV-2.1. Etude sur différentes lignées cellulaires

L'activité mitogénique des IGFs a été mise en évidence depuis longtemps, cette activité s'exerce sur de très nombreuses lignées cellulaires : cellules épithéliales, hématopoiétiques, osseuses, musculaires lisses, chondrocytes et fibroblastes (Cristofalo *et al.*, 1989 ; Goldring et Goldring, 1991 ; Huang et Terstappen, 1992). Les fibroblastes d'embryons de poulets ont été parmi les premières cellules utilisées pour étudier l'activité biologique des IGFs (Morell et Froesch, 1973). De nombreuses lignées de fibroblastes de souris, humains normaux ou transformés répondent également à l'action mitogène des IGFs (Baserga *et al.*, 1997).

Un des peptides isolés du sérum humain HWESAS s'est montré mitogène pour les fibroblastes d'embryons de poulets (RS 1,34), nous avons vérifié si son activité mitogène s'exerçait sur différentes lignées cellulaires comme celle des IGFs. Nous avons constaté qu'il est mitogène pour des fibroblastes de souris 3T6 (RS 1,42), pour des cellules hybridomes Mark-3 (RS 1,11) et pour des cellules MCF7 (RS 3,78). Ces dernières cellules issues d'un cancer du sein requièrent normalement pour bien pousser des concentrations importantes en SVF. Ces résultats sont obtenus pour une concentration de 6 ng en HWESAS (Tableau XXXXVII).

	FEP	3T6	Mark-3	MCF7
HWESAS 6 ng	1,34	1,42	1,11	3,78
IGF1	1,56 ± 0,08	-	-	3,25
IGF2	1,49 ± 0,1	-	-	5,13 IGF ₂ = 25 ng
IGF1 + P	3,18	-	-	2,95
IGF2 + P	1,71	-	-	6,9

Tableau XXXXVII : RS de HWESAS seul ou en combinaison avec les IGF1 ou IGF2. IGF1 est utilisé à la concentration de 15 ng/ml pour les FEP et de 25 ng/ml pour MCF7. IGF2 est utilisé à la concentration de 50 ng/ml pour FEP et 25 ng/ml pour MCF7. HWESAS est toujours utilisé à la concentration de 6 ng/ml.

L'activité mitogénique de ce peptide a été également mesurée en présence d'IGF1 ou d'IGF2 sur des fibroblastes d'embryons de poulets et des cellules MCF7. IGF1 et IGF2 sont mitogéniques pour ces deux lignées cellulaires, on peut d'ailleurs observer que leur activité mitogénique est beaucoup plus importante sur les cellules MCF7 (RS 3,25 et 5,13 pour IGF1 et IGF2) que pour les FEP (RS 1,56 et 1,49) (Tableau XXXXVII). Les cellules MCF7 en culture répondent à IGF1 (Furlanetto et Dicarto, 1984) mais elles synthétisent et sécrètent de l'IGF1 (Huff, 1986).

Dans les FEP l'addition conjointe au milieu de culture de HWESAS et d'IGF1 ou d'IGF2 augmente les RS tandis que pour les cellules MCF7, l'addition

de HWESAS à IGF1 ne modifie pas l'incorporation de [³H]-thymidine. Cette dernière est augmentée lorsque HWESAS est utilisé avec IGF2.

VI-2.2. Les voies de transduction du signal

On sait que la réponse aux IGFs peut varier d'un type de cellule à l'autre. Comme nous l'avons dit dans l'introduction et comme il est rappelé dans la figure 74, la transduction du signal IGF peut prendre différentes voies de signalisation. Par exemple la réponse proliférative dans les cellules des muscles squelettiques en réponse aux IGFs fait intervenir la voie Ras, Raf1, MAP Kinase et ERK (Coolican *et al.*, 1997).

Dans les fibroblastes (expérience faite avec des fibroblastes humains normaux), après l'activation qui suit la liaison du ligand, le récepteur IGF1-RI interagit directement avec IRS-1 qui s'associe avec Grb2, ce complexe va activer en aval p21 Ras et la réponse mitogénique (Petley *et al.*, 1999).

Dans les cellules MCF7, IGF1 active à la fois la voie des MAP Kinases (Chao *et al.*, 1994) et la voie de la phosphatidyinositol 3 kinase (Pi3 kinase) (Dufourny *et al.*, 1997). Cette voie semble d'ailleurs prépondérante car la prolifération des MCF7 est arrêtée lorsqu'on utilise des inhibiteurs de la Pi3 kinase comme le Ly 294002 ou la rapamycine inhibiteur de la p 70^{s6K} alors que l'inhibiteur de la MAP Kinase PD098059 a peu d'effet (Albas *et al.*, 1998).

Nous avons travaillé avec des concentrations d'IGFs qui donnaient la réponse maximum du moins sur les FEP, le fait que l'addition d'HWESAS aux IGFs augmente l'incorporation de [³H]-thymidine observée avec les IGFs seuls laissent à penser que ces deux types de composés n'agissent pas par la même voie de transduction du signal, ce qui est compatible avec le fait que dans ces cellules l'activation de IGF-RI phosphoryle IRS-1 et stimule la capacité d'ancrage de toutes une série de protéines, y compris des protéines Fyn, Syp, Nck dont le rôle est mal connu (Fig. 75).

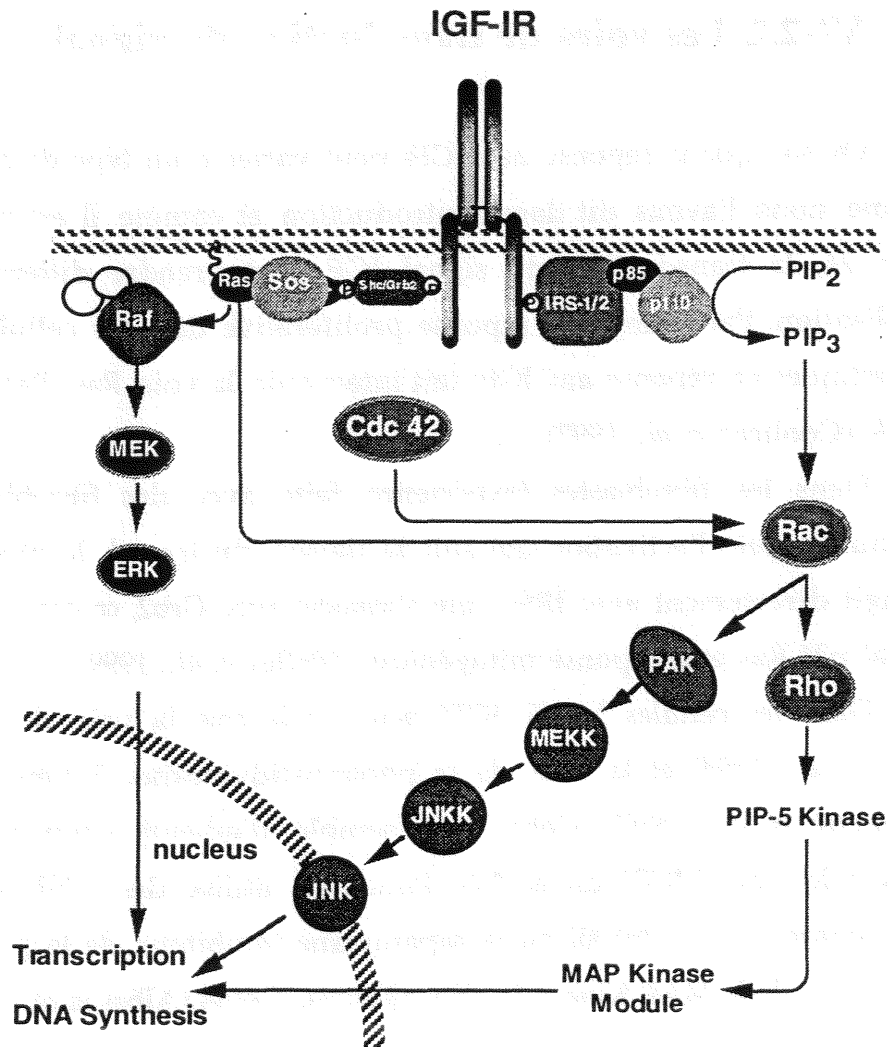


Fig. 74 : Transduction du signal à travers IGF-RI faisant intervenir soit IRS-1 et Pi3 kinase soit la liaison directe de SHC aux récepteurs et activation de la voie des MAP kinase conduisant à la stimulation de l'activité mitogénique (Butler et al., 1998).

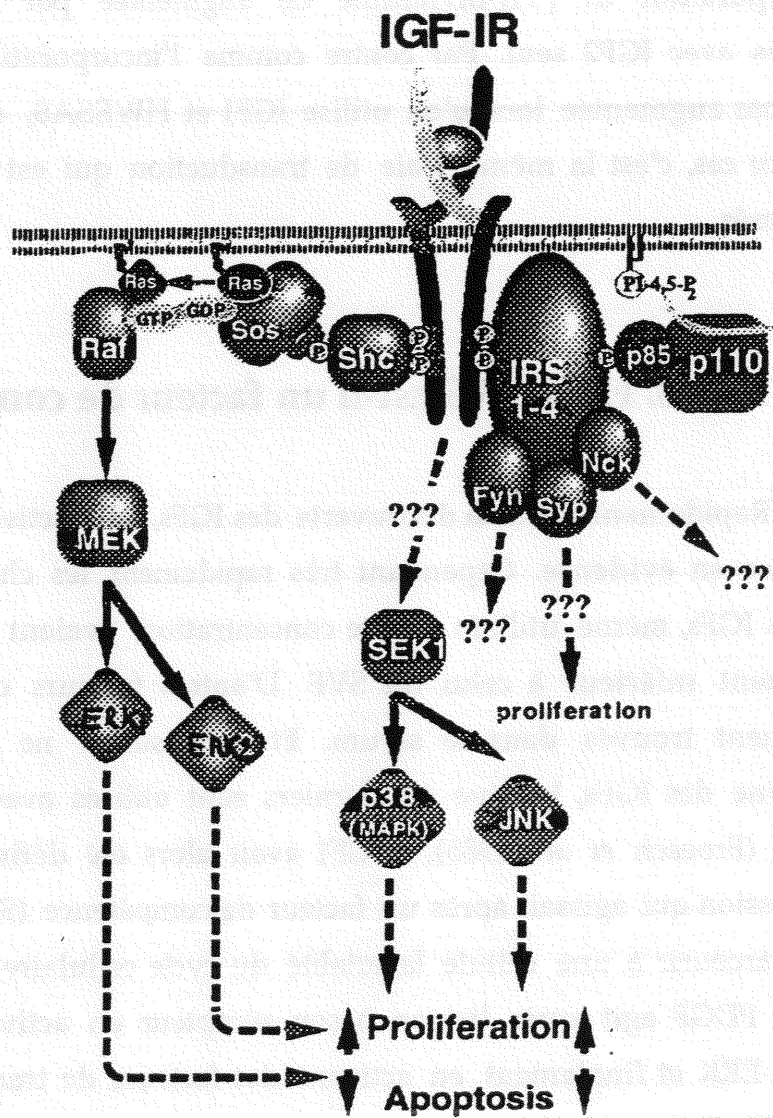


Fig. 75 : Recrutement de différentes protéines par IRS activé (Butler et al., 1998)

Dans les cellules MCF7, IGF2 et HWESAS semblent également agir par des voies différentes, puisque lorsque ces deux composés sont utilisés ensemble, l'incorporation de [³H]-thymidine est augmentée par rapport aux résultats trouvés avec IGF2 seul. Par contre comme l'incorporation de [³H]-thymidine n'est pas augmentée lorsqu'on utilise IGF1 et HWESAS, on peut supposer que dans ce cas, c'est la même voie de transduction qui est utilisée par les deux composés.

IV-2.3. HWESAS est-il un facteur de compétence ?

Rapidement après la découverte des IGFs, leur activité mitogénique avait été mise en évidence. Cependant très rapidement les chercheurs constataient que les IGFs, même utilisés à forte concentration, avaient un effet mitogénique nettement inférieur à celui du SVF. D'autres facteurs de croissance ont été également trouvés dans le sérum. Et si l'insuline ne modifie pas l'action mitogène des IGFs, lorsque ces derniers sont utilisés avec du PDGF, l'effet est additif (Froesch *et al.*, 1985). L'IGF1 avait alors été défini comme facteur de progression qui agissait après un facteur de compétence (Stiles *et al.*, 1979) pour faire parcourir à une cellule la totalité du cycle cellulaire. On sait maintenant que le PDGF agit après liaison à son récepteur en activant la voie Ras, Raf MEKK-ERK et finalement en activant des facteurs de transcription (Baserga *et al.*, 1997). Cette voie de transduction du signal participe aussi à la régulation du cycle cellulaire en intervenant sur la synthèse et la dégradation périodique des cyclines.

Nous avons donc testé si HWESAS pouvait agir à la façon d'un facteur de compétence. Aussi HWESAS a été mis dans le milieu de culture pendant 4 h ou 6 h, enlevé et après rinçage des cellules IGF1 (ou IGF2) a été ajouté.

Il n'y a pas de différence significative entre l'activité mitogénique de IGF1, lorsqu'il est incubé seul ou lorsque les fibroblastes ont été préincubés 4 h avec HWESAS. Par contre HWESAS stimule l'activité d'IGF1 lorsqu'il a été préincubé

6 h. Les résultats avec IGF2 sont moins concluants puisque dans une seule expérience, HWESAS préincubé 6 h augmente l'activité d'IGF2.

Ces résultats recoupent des résultats antérieurs obtenus avec des produits partiellement purifiés. Il fallait qu'un UF de sérum humain soit préincubé au moins 6 h avant d'être éliminé et remplacé par du rétentat de sérum humain pour que l'activité de sulfatation (Heulin *et al.*, 1984) ou l'activité mitogénique (Lamotte, 1989) de ce dernier soient augmentées. Ces expériences confortent l'hypothèse que HWESAS et IGFs n'agissent pas par les mêmes voies de transduction.

IV-2.4. Rôle de la PKC dans la transduction du signal IGF et HWESAS

Les IGFs agissent par les voies de transduction précédemment décrites (Fig. 8, 68, 69). Cependant d'autres voies semblent aussi intervenir. Ainsi Kojima *et al.* (1992) pensent que l'entrée du calcium dans la cellule est un signal mitogénique pour IGF1 dans les cellules Balb C /3T3. Ils appuient leur hypothèse sur le fait que IGF1 stimule la progression des cellules dans le cycle cellulaire seulement lorsqu'il stimule l'entrée du Ca^{2+} . Si l'entrée du Ca^{2+} est perturbée, IGF1 n'est pas actif. Des résultats analogues ont été obtenus sur des cellules thyroïdiennes (Takada *et al.*, 1990)

Outre l'entrée du Ca^{2+} , l'IGF1 augmente l'activité de la PKC. Ceci a été montré sur des cellules Balb C/3T3, des cellules thyroïdiennes, des chondrocytes, des astrocytes (Martinelli *et al.*, 1991 ; Kojima *et al.*, 1992 ; Tranque *et al.*, 1992) et une partie de l'activité mitogénique d'IGF1 passerait par cette voie. Ainsi Valverde *et al.* (1996) ont montré que dans les adipocytes du tissu brun de rats, IGF active Ras qui stimule la prolifération des cellules soit pas l'intermédiaire de Raf1 soit par l'intermédiaire de la PKC ζ . André *et al.* (1999) montrent que les PKC α et λ sont impliquées dans l'induction de la migration des cellules épithéliales du colon par IGF1.

Dans des cellules porcines de muscle lisse en culture, IGF1 régule la distribution subcellulaire de PKC β , ε , η et ζ et la synthèse d'ADN est stimulée sous l'action d'IGF1 parallèlement à l'augmentation de l'activité PKC. IGF1 entraîne la translocation membranaire de PKC β , ε , η et ζ , dans ces cellules, il n'active pas la translocation de la PKC α (Yano *et al.*, 1999).

Les PKC sont une grande famille de sérine/thréonine kinases phospholipides dépendantes intervenant dans la régulation de la croissance, la différenciation cellulaire (Nishizuka, 1995 ; Livneh et Fishman, 1997). Tous les membres de cette famille ont des analogies de structure mais présentent des caractéristiques différentes : elles ont une dépendance plus ou moins marquées vis-à-vis du Ca^{2+} , vis-à-vis d'inhibiteurs. Elles ont une répartition tissulaire et cellulaire particulière. Actuellement 12 isoformes de la PKC ont été identifiées et clonées (Martelli *et al.*, 1999). On les subdivise en plusieurs familles (Dekker et Parker, 1994 ; Stauble *et al.*, 1994 ; Nishizuka *et al.*, 1997). Elles requièrent toutes pour être actives la présence de phospholipides mais différent par leur dépendance à d'autres facteurs.

- Les PKC conventionnelles (cPKC) qui comprennent les isoformes α , β I, β II et γ . Elles sont activées par le Ca^{2+} , les phospholipides acides et le DAG (1,2 diacylglycérol) ou les esters de phorbol.

- Les nouvelles PKC (nPKC). Ce sont les isoformes δ , ε , η , θ activées par les phospholipides acides et le DAG, mais indépendantes du Ca^{2+} .

- Les PKC atypiques (aPKC) c'est-à-dire les isoformes ζ , τ , λ , elles sont dépendantes des phospholipides (PS) mais ne requièrent ni Ca^{2+} ni DAG. PKC τ est l'homologue chez la souris de PKC λ chez l'homme.

- PKC μ a un domaine transmembranaire. Elle est activée par le DAG mais n'a pas d'analogie de structure avec les autres PKC. On l'appelle aussi PKD.

Les figures 76 et 77 donnent une représentation schématique de la structure des PKC. Chaque PKC est formé d'une seule chaîne peptidique ayant

2 domaines bien définis. Le domaine régulateur (amino-terminal) possède les motifs jouant un rôle dans la liaison des phospholipides et du Ca^{2+} et participe dans les interactions protéines-protéines, ce domaine régule l'activité de la PKC et sa localisation. Le domaine C-terminal est le domaine kinasique, il inclut les motifs de liaison de l'ATP et du substrat (Ron et Kazanietz, 1999). Les PKC sont cytosoliques sauf $PKC\mu$ et après activation par le 1,2 diacylglycerol, ou les esters de phorbol, elles sont transloquées vers la membrane mais aussi dans d'autres compartiments cellulaires plasmiques et dans le noyau. Des facteurs de croissance comme IGF1, PDGF, EGF augmentent la concentration de $PKC\alpha$ dans le noyau (Neri, 1994). Le 1,2 DAG provient de l'hydrolyse de phosphatidylinositol membranaire sous l'action d'une phospholipase C. La phospholipase D agissant sur la phosphotidylcholine libère de l'acide phosphatidique qui peut aussi être transformée par une phosphatase en DAG. Les PKC activées phosphorylent un grand nombre de substrats et régulent outre la prolifération et la différenciation cellulaire des processus tels que la sécrétion et l'exocytose, la conductance d'ions, la down régulation de récepteurs (Nishizuka 1986, 1988) et elles jouent un rôle important dans la transduction du signal hormones et facteurs de croissance (Hug et Sarre, 1993).

Chacune des isoformes de PKC a un substrat qui contient une séquence unique et optimale pour l'activité de l'isoforme considérée (Nishizuka *et al.*, 1997). Par ailleurs il a été mis en évidence que les PKC activées lient des protéines d'ancrage parmi lesquelles on peut citer les RACKs (Receptors for Activated C Kinase) qui se situeraient près des substrats des PKC donc ces protéines RACK détermineraient en partie la spécificité des PKC (Mochly-Rosen, 1995 ; Yedovitz *et al.*, 1997 ; Parker, 1999). D'autres protéines interagissant avec les PKC ont été identifiées comme les PICKs. PICK1 interagit spécifiquement avec le domaine catalytique de PKC et est un substrat pour l'enzyme. PICK1 a une localisation périmoléculaire (Staudinger *et al.*, 1995).

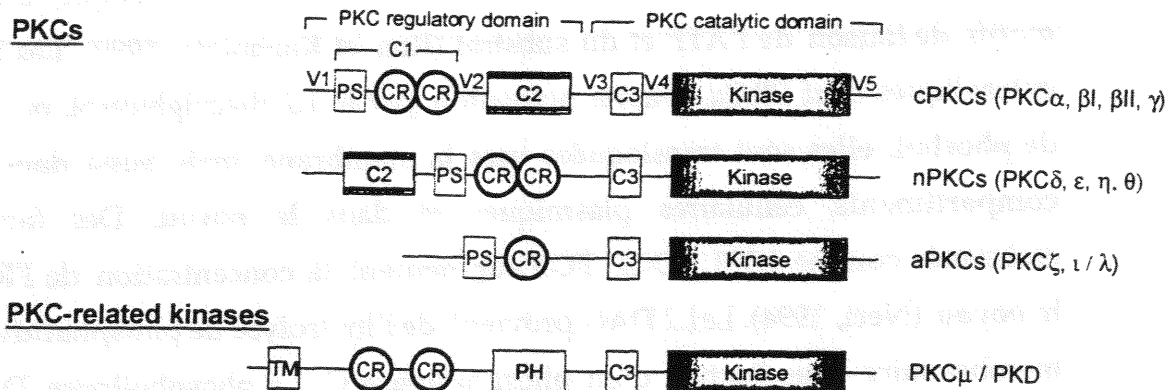


Fig. 76 : Structure des PKC et d'une PKC related kinase. Les esters de phorbol et le DAG se lient aux motifs riches en cystéine (CR).
PS = pseudo substrat, TM = domaine transmembranaire (Ron et Kazanietz, 1999).

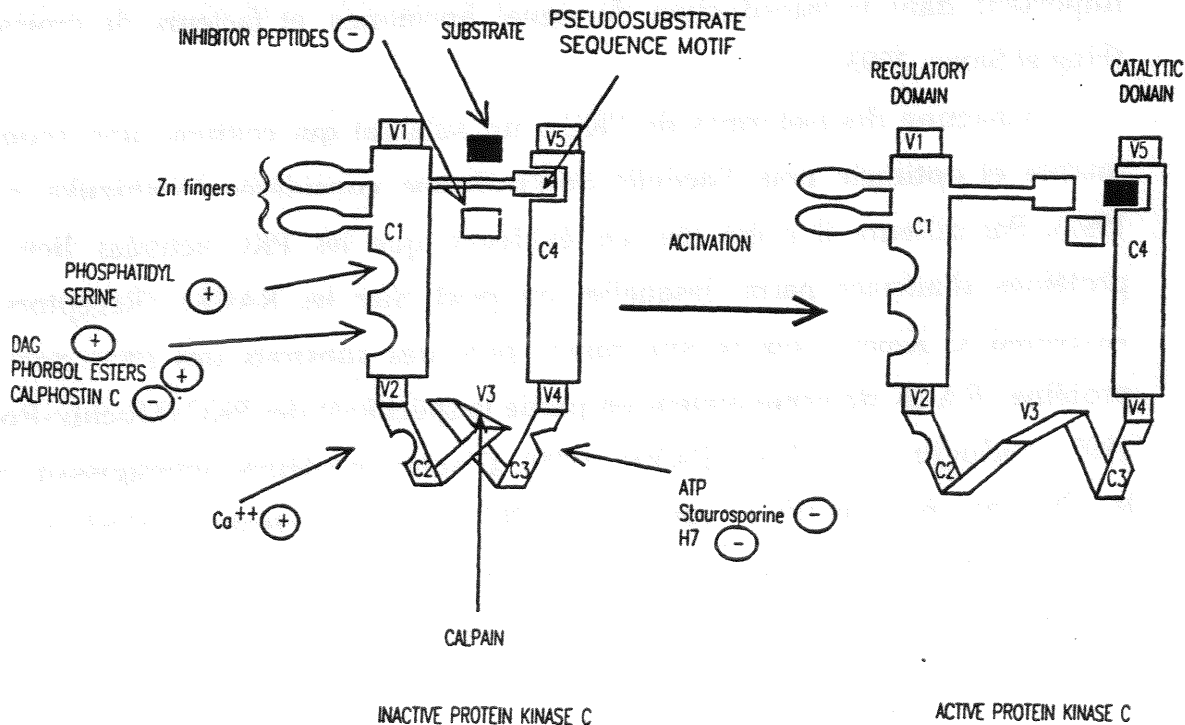


Fig. 77 : Structure des PKC et impact des différents inhibiteurs.

L'activité des PKC peut être inhibée par toute une série d'inhibiteurs plus ou moins spécifiques, on distingue 4 classes d'inhibiteurs :

- Les inhibiteurs de la 1^{ère} classe sont des inhibiteurs compétitifs de la fixation de l'ATP. Parmi ceux-ci on peut citer la staurosporine, le bisindolylmaléimide. Ce dernier composé n'est actif que sur les isoformes α , β I, β II et γ (Poulec *et al.*, 1991). Les inhibiteurs de cette classe peuvent aussi inhiber directement l'action de l'AMPc et du GMPc (Goekjian et Jirousek, 1999).

- Les inhibiteurs de la seconde classe bloquent la liaison de faible affinité entre la PKC et les phospholipides. A ce groupe appartient la polymixine B.

- La troisième classe d'inhibiteurs comprend des peptides pseudosubstrats analogues de séquences du domaine C de l'enzyme. Il ne sont actifs qu'en absence de DAG et comme ils ne traversent pas la membrane plasmique, il faut donc des techniques particulières pour les faire entrer dans les cellules.

- Des inhibiteurs se fixent au domaine C, domaine qui contient le site de liaison des DAG et des esters de phorbol, c'est le cas du gossypol et de la calphostine C, cette dernière n'inhibe pas l'isoforme PKC δ (Hartzell et Rinderknecht, 1996).

- Plus récemment des peptides analogues de la séquence de fixation des protéines RACKs ont été synthétisées et se révèlent être des inhibiteurs assez spécifiques d'une isoforme donnée de PKC (Ron *et al.*, 1999).

Dans le travail présenté ici, nous avons montré par immunoblot en utilisant un immunsérum anti-PKC α que cette isoforme était augmentée dans les fibroblastes de poulets traités par IGF1 et IGF2 par rapport au témoin (milieu seul). HWESAS augmente aussi l'expression de la PKC mais plus faiblement que IGF1 ET IGF2. Par contre les résultats en immuno-blot ne permettent pas de dire si l'addition de HWESAS à IGF1 et IGF2 augmente l'action de ces deux derniers facteurs.

Si on étudie l'incorporation de [³H]-thymidine en présence d'IGF1, IGF2, HWESAS seuls ou en combinaison, en ajoutant dans le milieu de culture un

inhibiteur des isoformes α , β I, β II et γ de la PKC : le bisindolymaléimide, on constate que cet inhibiteur diminue la mitogénèse induite par HWESAS, qu'il a peu d'effet sur celle induite par IGF1 et que paradoxalement il augmente significativement l'incorporation de [3 H]-thymidine observée en présence de IGF2. Par contre lorsque IGF1 ou IGF2 est ajouté à HWESAS dans les milieux de culture, le bisindolymaléimide diminue significativement l'incorporation de [3 H]-thymidine. Il semblerait donc qu'au moins une partie de l'action de HWESAS passerait par une ou plusieurs isoformes de la PKC. Pour l'instant il est difficile d'imaginer le mode d'action réel de HWESAS. En effet, si des peptides inhibiteurs de l'action d'IGF1 ont été décrits (Souroujon et Mochly-Rosen, 1998 ; Garbay et Roques, 1999 ; Cussac *et al.*, 1999) à notre connaissance, aucun peptide activateur n'avait jusqu'alors été identifié et son mode d'action étudié.

IV-2.5. Activité mitogénique d'autres peptides ayant une relation structurale avec HWESAS

Nous avons testé l'activité mitogénique d'autres peptides soit seuls soit en combinaison avec IGF1.

Une tyrosine a été fixée soit à l'extrémité N-terminale soit à l'extrémité C-terminale de HWESAS. Nous avons fait préparer de tels peptides pour éventuellement les marquer à 125 I et les utiliser pour un dosage radio-immunologique, le peptide YHWESAS seul n'a pas d'activité mitogénique sur les FEP. Les peptides YHWESAS et HWESASY stimulent significativement l'activité mitogénique d'IGF1 et d'IGF2 pour des concentrations en peptide inférieures à 12 ou 25 ng/ml selon les cas. Lorsque nous avons étudié l'activité mitogénique de HWESAS, nous avons constaté que pour obtenir un anticorps il fallait que la partie COOH terminale soit libre et les anticorps ainsi obtenus reconnaissent YHWESAS mais pas HWESASY (Capiaumont *et al.*, 2000). Compte-tenu de la masse moléculaire du peptide, nous n'avons pas pu établir une modélisation et déterminer la relation structure -activité.

Le WEGF est le deuxième peptide que nous avons caractérisé et identifié dans le sérum humain. Ce peptide seul a également une activité mitogénique légèrement inférieure à celle de HWESAS. Il stimule de façon très significative l'activité mitogénique d'IGF1, il est moins efficace en combinaison avec IGF2 que HWESAS.

Le peptide de 17 aa a été testé car c'est le seul peptide d'origine humaine qui contienne la séquence HWESAS. Cette séquence correspond au C3f qui provient du C3 un des composants du complément. Le peptide de 16 aa provient de la désarginination du côté COOH du peptide de 17 aa.

Le C3 est une β globuline synthétisée chez l'homme principalement par le foie, elle est formée de deux chaînes : 1 chaîne α (110 kDa) et 1 chaîne β (75 kDa) relié par des ponts disulfures (Lambris, 1993). Le C3 représente le point de convergence de 2 voies d'activation du complément : la voie classique principalement activée par les complexes antigène-anticorps et la voie alterne activée par des cellules ou des particules possédant des caractéristiques de surface particulières. Le C3 est clivé par des convertases en deux fragments C3a et C3b. Le facteur C3b peut être catabolisé par le facteur I (C3b inactivateur) en présence d'un cofacteur (le facteur H). Ce clivage libère un petit fragment le C3f, peptide de 2000 Da (chez l'homme) de structure $\text{NH}_2\text{-SSKKITHRIHWESASLLR-COOH}$ (Garen *et al.*, 1989), il contient donc la séquence HWESAS. Cette séquence n'est pas retrouvée dans la protéine C3 de la souris du rat, du lapin, du cochon d'Inde, de la lamproie (Mavroidis *et al.*, 1995). Ces auteurs ne donnent pas la séquence du C3f chez de gros animaux, c'est pour nous un sujet à explorer de façon plus systématique car en relation avec des travaux antérieurs, nous avons formulé l'hypothèse que chez l'homme la séquence HWESAS provient du C3f et serait peut-être formé dans le rein (Jacob *et al.*, 1995; Song *et al.*, 1998). Il faut donc que nous déterminions si cette même séquence existe dans le C3f des animaux chez lesquels on a identifié HWESAS.

IV - 3. ACTIVITES METABOLIQUES DE HWESAS

Le rôle métabolique des IGFs a été étudié tant *in vitro* qu'*in vivo* depuis de nombreuses années. Classiquement ces effets sont divisés en deux catégories :

- **effets à court terme**, « insulin-like » parmi lesquels on peut classer la captation du glucose, la synthèse du glycogène et des lipides dans le tissu adipeux

- **effets à long terme** tels que la stimulation de la synthèse des protéines, des ARN et de l'ADN ou la prolifération cellulaire (Humbel, 1990). Dans ce travail nous avons étudié l'action de HWESAS sur différentes activités métaboliques des IGFs.

IV-3.1. Entrée du glucose dans la cellule.

Le rôle des IGFs dans le métabolisme du glucose a été très largement étudié. *In vivo* on sait que l'injection d'IGF1 entraîne une hypoglycémie tant chez l'animal que chez l'homme (Guler *et al.*, 1987 ; Alexander et Carey, 1999). L'injection d'IGF1 augmente l'utilisation périphérique du glucose, diminue sa production hépatique et augmente la synthèse de glycogène hépatique et musculaire (Laager *et al.*, 1993 ; Moxley *et al.*, 1999). *In vitro* il a été démontré, il y a déjà longtemps, qu'IGF1 augmentait la captation du glucose par différentes cellules (Knight *et al.*, 1981). On sait que l'entrée du glucose dans les cellules se fait grâce à des transporteurs qui appartiennent à deux familles de protéines.

- Les SGLT (sodium glucose cotransporteurs) qui sont impliqués dans le transport actif du glucose. Ils jouent un rôle important dans l'absorption intestinale et la réabsorption du glucose (Guerre-Milo, 1995)

- Les Glut qui assurent la diffusion facilitée du glucose. Ce sont des protéines d'environ 50 kDa présentant 12 segments transmembranaires. Les Glut comportent plusieurs isoformes (Glut 1, Glut 2, Glut 3, Glut 4, Glut 5) dont l'expression peut être ubiquitaire ou spécifique des tissus. Ainsi Glut 4 est

exprimé seulement dans les muscles squelettiques, le myocarde et le tissu adipeux (Pessin et Bell, 1992 ; Bastard *et al.*, 1998) ; ce sont des tissus sensibles à l'insuline (Cushman et Wardzala, 1980 ; Gould et Holman, 1993). Dans les tissus Glut 4 est intracellulaire, stocké dans un compartiment particulier et sous l'action de l'insuline et des IGFs, il est transloqué au niveau de la membrane (Rea et James, 1997).

Plusieurs voies de transduction du signal insuline ou IGF semblent impliquées dans le transport du glucose. L'insuline et IGF1 augmentent la génération de DAG et la voie de la PKC, ceci a été montré dans des myocytes BC3H (Farese *et al.*, 1985 ; Farese *et al.*, 1989). IGF1 régulent l'expression d'IRS1 dans les adipocytes 3T3-L1 (Rice et Garner, 1999). D'autres auteurs ont montré que la voie de la Pi3K interviendrait dans le transport du glucose à court terme après activation des récepteurs à IGF (Okada *et al.*, 1993 ; Sheperd *et al.*, 1998 ; Urs *et al.*, 1999) Les expériences ont été faites aussi sur des adipocytes 3T3-L1. De plus l'insuline et l'IGF1 régulent positivement à plus long terme l'expression du gène Glut 4, cette action passerait aussi par la voie Pi3 kinase mais sans implication de p70^{S6K}. Ces expériences ont été faites sur des adipocytes (de tissu adipeux brun de rat (Valverde *et al.*, 1999).

Compte-tenu de l'action des IGFs sur l'entrée du glucose nous avons vérifié si HWESAS modifiait cette activité métabolique des IGFs. Dans un travail antérieur Thiebaut (1992) avait déjà testé l'action d'une fraction partiellement purifiée à partir d'UF de sérum humain, sur les fibroblastes d'embryons de poulets. Dans ces expériences elle montrait que l'incorporation maximale de glucose était obtenue pour une concentration de 350 ng/ml d'IGF (environ 50 nM) et de 700 ng/ml d'IGF2 (environ 100 nM). Les concentrations donnant la réponse maximale varient en fonction du type cellulaire et de l'espèce d'origine. Ainsi la réponse maximale est obtenue avec des concentrations d'IGF1 comprises entre 50 et 100 ng/ml (environ 7 à 14 nM) pour des myocytes BC3H-1 (Farèse *et al.*, 1989) ou des fibroblastes humains (Maassen et Van der Zon, 1990) ; l'incorporation du glucose dans des adipocytes est multipliée par 2,5 pour 1.4 ou 14 nM d'IGF1 (Valverde *et al.*, 1996). Cependant il faut noter que IGF-I à 100 nM ne stimule pas l'entrée du glucose dans les cellules d'hépatome H411 E (Yan *et al.*, 1999). D'une façon générale l'incorporation

maximale de glucose nécessite dans les myocytes ou les adipocytes moins d'IGF1 que dans les FEP mais nous sommes dans les mêmes conditions expérimentales que Cynober *et al.* (1985) qui utilisent aussi des FEP. On constate que HWESAS, comme les fractions partiellement purifiées à partir d'UF de sérum humain, utilisé seul ne stimule que très faiblement l'incorporation du glucose, il faut atteindre une concentration de 2 000 ng/ml. Par contre l'addition simultanée de IGF1 (350 ng/ml) et de HWESAS (2000 ng/ml) fait passer le rapport de stimulation d'IGF1 (par rapport au milieu seul) de 1,53 à 2,70. Les résultats obtenus avec IGF2 vont dans le même sens, cependant les concentrations d'IGF2 donnant la réponse maximale sont plus élevées. Ceci n'est pas surprenant car IGF-RI par lequel passe la stimulation de l'incorporation de glucose a une plus faible affinité pour IGF2 que pour IGF1 et la concentration en HWESAS donnant la réponse maximale en présence d'IGF2 est elle aussi plus élevée (3 500 ng/ml).

Les concentrations d'HWESAS utilisées dans ces essais sont très largement supérieures à celles pour lesquelles on avait une réponse mitogénique. Ces concentrations restent cependant compatibles avec les données physiologiques. En effet les concentrations trouvées dans le plasma humain normal par tests immunologiques sont en moyenne de 3 µg/ml (Capiaumont *et al.*, 2000). Comme pour l'activité de sulfatation, on remarque que HWESAS n'a pas d'activité par lui-même (ou seulement une faible activité) mais qu'il agit en synergie avec IGF1 et IGF2 ce qui peut laisser penser que la présence simultanée de ces composés active différentes voies de transduction. Dans ces expériences nous n'avons pas cherché à identifier les voies de transduction stimulée, cela fera l'objet de recherches ultérieures au laboratoire.

IV-3.2 Entrée des acides aminés et synthèse protéique

Le contrôle par les hormones et les facteurs de croissance de l'entrée des aa dans la cellule est une étape clef de la régulation de la synthèse protéique et de la croissance cellulaire. Dans le transport des aa, l'insuline et les IGFs jouent un

rôle important (Knight *et al.*, 1981). Selon les types cellulaires IGF1 agit en se liant à ses propres récepteurs ou aux récepteurs de l'insuline ce qui explique que les cellules répondent à des concentrations différentes d'IGF1 (Chaiken *et al.*, 1986 ; Bolinder *et al.*, 1987). L'action des IGFs (et plus particulièrement d'IGF1) a été démontré sur animal entier ou chez l'homme (Jacob *et al.*, 1998 ; Alexander et Carey, 1999) comme sur des cellules isolées (Chaiken *et al.*, 1986).

En utilisant des FEP comme modèle expérimental, nous montrons que IGF1 et IGF2 stimulent l'entrée dans les cellules de l'acide α amino isobutyrique, analogue non métabolisable d'aa. Cependant comme pour la mesure de l'entrée du glucose, nous n'avons une réponse que pour des concentrations supraphysiologiques des IGFs mais ce sont les concentrations que Cynober *et al.* (1985) utilisent pour des FEP. Par contre Jeffrey et Pain (1993) montrent que IGF1 à 10^{-11} M stimulent la synthèse protéique mesurée par incorporation de [35 S]-méthionine. Comme dans leur étude la réponse à l'insuline se produit pour des concentrations de 10^{-7} , ils en concluent que l'action de l'insuline et d'IGF1 passe par l'intermédiaire de IGF-RI. D'autres auteurs pensent au contraire qu'au moins une partie de l'action métabolique de IGF1 serait en relation avec sa liaison aux récepteurs à insuline (Laager *et al.*, 1993).

Dans notre expérience nous trouvons que la réponse à IGF1 n'est pas statistiquement différente à celle d'IGF2. Ces résultats confirment ceux de Thiebaut (1992) travaillant également avec des FEP.

HWESAS a par lui seul une faible activité sur l'entrée des aa dans les FEP. Par contre il agit en synergie avec IGF1 et IGF2, son action est plus importante sur IGF1 puisque pour une concentration de 1 500 ng/ml d'HWESAS le rapport de stimulation est de 2,67 (il était de 1,61 avec IGF1 seul), alors que ce rapport de stimulation est maximal pour 3 500 ng/ml d'HWESAS en présence de IGF2 et il est de 2,11 (le rapport de stimulation d'IGF2 seul était de 1,43).

Les résultats obtenus pour l'entrée des aa se superposent à ceux obtenus pour l'entrée du glucose et ceci semble confirmer que IGFs et HWESAS agissent par des voies de transduction du signal différentes.

Nous avons aussi testé l'action de HWESAS seul ou en combinaison avec les IGFs sur la synthèse des protéines. L'action sur la synthèse des protéines est considérée comme un effet à long terme des IGFs. En effet l'augmentation de la synthèse protéique est parallèle à l'activité mitogénique des facteurs de croissance puisque avant de se diviser les cellules doivent doubler leur contenu cellulaire.

Dans ces expériences on a mesuré soit le contenu global en protéines des cellules (mesure des protéines par l'acide bicinchoninique) soit les protéines nouvellement synthétisées (mesure de l'incorporation d'acides aminés marqués). Nos expériences montrent que IGF1 et IGF2 augmentent le contenu cellulaire en protéines totales, la différence avec le milieu seul devient significative à partir de la 12^{ème} heure. Pour IGF1 (15 ng/ml) le rapport de stimulation est de 1,20 à la 12^{ème} heure et de 1,37 à la 24^{ème} heure ; pour IGF2 (50 ng/ml) ces rapports sont légèrement plus faibles : 1,13 à la 12^{ème} et 1,29 à la 24^{ème} heure. On constate que les concentrations employées sont les mêmes que celles pour lesquelles on observe une augmentation de [³H]-thymidine dans les cellules et sont beaucoup plus faibles que celles nécessaires pour mesurer l'entrée du glucose ou des aa. HWESAS seul (7 ng/ml) n'a pas d'action sur le contenu global en protéines même mesuré à 24 h alors qu'il stimulait significativement par rapport au milieu seul l'incorporation de [³H]-thymidine dans les FEP. Cette différence peut s'expliquer par la différence de sensibilité des tests. Par contre dès la 4^{ème} heure et jusqu'à la 12^{ème} heure de culture, la concentration en protéines totales intracellulaires augmente significativement lorsque les cellules sont cultivées en présence d'IGF1 (15 ng/ml) et HWESAS (7 ng/ml) comparée à IGF1 seul. Des résultats identiques sont obtenus avec IGF2.

Des auteurs ont posé la question de savoir si l'action des IGFs sur les protéines résultaient d'une protection des protéines contre la protéolyse, d'une augmentation de la synthèse ou des deux phénomènes conjoints. Les expériences de Jacob *et al.* (1989) faites chez les rats sont en faveur d'une diminution de la protéolyse, il en est de même pour les résultats de Boyle *et al.* (1998) chez le fœtus de mouton. Laager *et al.* (1993) aboutissent à des conclusions identiques avec des expériences menées chez l'homme. Par contre les résultats

de Russel-Jones *et al.* (1994) obtenus aussi chez l'homme indiquent qu'IGF1 administré en I.V. augmente la synthèse protéique. Des expériences faites chez la brebis conduisent les auteurs (Douglas *et al.*, 1991) à conclure qu'il y a à la fois une diminution de la protéolyse et une augmentation de la synthèse protéique, IGF1 étant plus efficace qu'IGF2. De plus IGF1 régule au moins chez le fœtus la distribution des aa entre les différents tissus, régulant par ce mécanisme la croissance préférentielle de certains tissus (Jensen *et al.*, 2000).

Pour étudier le rôle des IGFs et de HWESAS sur la synthèse de nouvelles protéines, nous avons incubé les cellules (FEP) en présence d'acides aminés marqués, nous avons choisi la [³⁵S]-cystéine qui marque l'ensemble des protéines et la [¹⁴C]-proline car on sait que les IGFs stimulent la synthèse du collagène. Le collagène, protéine de la matrice extracellulaire synthétisée par les fibroblastes est particulièrement riche en proline.

On constate que IGF1 (15 ng/ml) stimule significativement l'incorporation de [¹⁴C]-proline (RS 1,24) et de [³⁵S]-cystéine (RS 1,13) dans les protéines des fibroblastes. Il en est de même pour IGF2, le rapport de stimulation est de 1,27 pour la [¹⁴C]-proline et de 1,31 pour [³⁵S]-cystéine. Dans ces expériences l'addition de HWESAS seul (6 ng/ml) n'entraîne aucune stimulation de l'incorporation des deux acides aminés. HWESAS stimule aussi l'effet d'IGF2 sur l'incorporation de [³⁵S]-cystéine mais pas sur celle de proline.

Nous avons déjà montré à propos de la synthèse des protéoglycanes, autres macromolécules de la matrice extracellulaire, que les molécules contenues dans l'UF de sérum humain étaient indispensables pour que IGF1 stimule la synthèse des « core protéines », que IGF2 n'avait pas besoin de la présence des molécules de l'UF pour stimuler l'étape de sulfatation (Maachi *et al.*, 1995).

Comme nous l'avons développé dans l'introduction, l'activité métabolique des IGFs passent par leur liaison au récepteur spécifique à activité tyrosine kinase IGF-RI. La liaison est suivie d'une phosphorylation de substrat endogène incluant IRS-1, IRS-2, Shc. La phosphorylation de substrats forment

des sites d'ancrages pour des molécules comme la Pi3-K ou Grb2, SoS ce qui conduit à l'activation de ces voies de transduction (Petley *et al.*, 1999).

Nous avons donc testé si HWESAS agissait sur la phosphorylation induite par IGF1 ou IGF2. Dans une première expérience nous avons mesuré l'incorporation de [³³P]-ATP après 24 h de culture des FEP. Dans ces conditions il y a une augmentation significative de l'incorporation de [³³P]-ATP en présence d'IGF1 (RS = 1,82), HWESAS seul (7 ng/ml) n'a aucune action, alors qu'il stimule l'effet d'IGF1 (RS = 2,16). Cette phosphorylation à long terme stimulée par HWESAS est en accord avec les résultats obtenus pour la mesure de l'activité mitogénique. Dans ce cas, ce pourrait être la voie IRS-Grb₂-SoS et activation de la cascade Ras/Raf MAP Kinase qui serait impliquée (LeRoith *et al.*, 1998). Nous avons également fait une cinétique de la fixation de [³³p]-ATP sur les protéines de FEP. Sous l'action d'IGF1 seul (15 ng/ml), elle devient significative dès la 45^{ème} minute (RS = 1,20), elle passe par un maximum à la 12^{ème} heure (RS = 1,77) et reste en plateau jusqu'à la 24^{ème} heure (RS = 1,73).

Les résultats diffèrent un peu avec IGF2 (50 ng/ml), l'incorporation de [³³P]-ATP est significativement augmentée par rapport au témoin à partir de la 4^{ème} heure (RS = 1,22), il passe par un maximum à 12 h (RS = 1,6) et diminue à 24 h (RS = 1,49). HWESAS seul (7 ng/ml) n'a aucun effet sur la phosphorylation des protéines ce qui confirme le résultat précédent. Par contre, comme dans l'expérience précédente HWESAS ajouté à IGF1 ou IGF2 augmente significativement l'activité de ces derniers sur la phosphorylation des protéines.

IV-3.3. Apoptose

L'apoptose est un processus normal de mort cellulaire se produisant au cours de la vie embryonnaire et de la vie adulte. On constate qu'au cours de l'apoptose, la cellule subit des changements morphologiques. Dans un premier temps, la membrane plasmique reste intacte mais perd son asymétrie, les molécules de phosphatidyl sérine qui sont normalement sur la surface interne

de la membrane plasmique sont exposées sur la surface externe, la chromatine se condense, l'ADN est dégradé et donne en électrophorèse un profil caractéristique en échelle. Il y a formation de corps apoptotiques qui sont *in vivo* phagocytés par des cellules adjacentes (Ricci et Auberge, 1998).

La mitochondrie joue un rôle important et précoce dans le processus apoptotique. En effet les cellules qui vont entrer en apoptose subissent une diminution du potentiel transmembranaire mitochondrial associé à l'ouverture des mégapores PTPC (complexe du pore de transition de perméabilité) qui peuvent laisser passer à travers la membrane interne de la mitochondrie des molécules jusqu'à 1 500 Da incluant le Ca_2^{++} , le glutation. La membrane mitochondriale externe devient complètement perméable ce qui entraîne la libération de toutes les protéines intermembranaires solubles (SIMP₁), parmi les SIMP on trouve de puissantes protéines apoptotiques comme les procaspases 2, 3, 9, le cytochrome C qui interagit avec le factor Apaf-1 ; ce complexe active la caspase 9. On peut citer aussi le factor AIF (apoptosis inducing factor) qui est transloqué vers le noyau et fragmente le DNA (Kroemer *et al.*, 1997 ; Green et Reed, 1998 ; Mignotte *et al.*, 1998 ; Jocoto *et al.*, 2000).

L'apoptose peut être induite positivement par liaison d'un ligand à un récepteur membranaire apoptotique ou elle peut être induite négativement par perte d'un signal suppresseur.

La figure 78 donne un schéma simplifié des voies de signalisation impliquées dans l'apoptose. Sur cette figure, deux récepteurs liés à l'apoptose sont représentés : le récepteur Fas (ou CD 95 ou Apo-1) et le récepteur TNF-R1. Ces récepteurs contiennent un domaine de 80 aa appelé death domaine (DD) (Tartaglia *et al.*, 1993).

La fixation du TNF α trimérique au récepteur TNF-R1 (55 kDa) induit la trimérisation du récepteur ce qui permet à DD d'acquérir une configuration permettant le recrutement de la protéine TRADD (TNF-R associated protein with DD) et de la protéine FADD (Fas associated protein with DD). La fixation du ligand sur le récepteur Fas entraîne également la trimérisation du récepteur et le recrutement direct de FADD. L'ensemble forme le DISC (death inducing

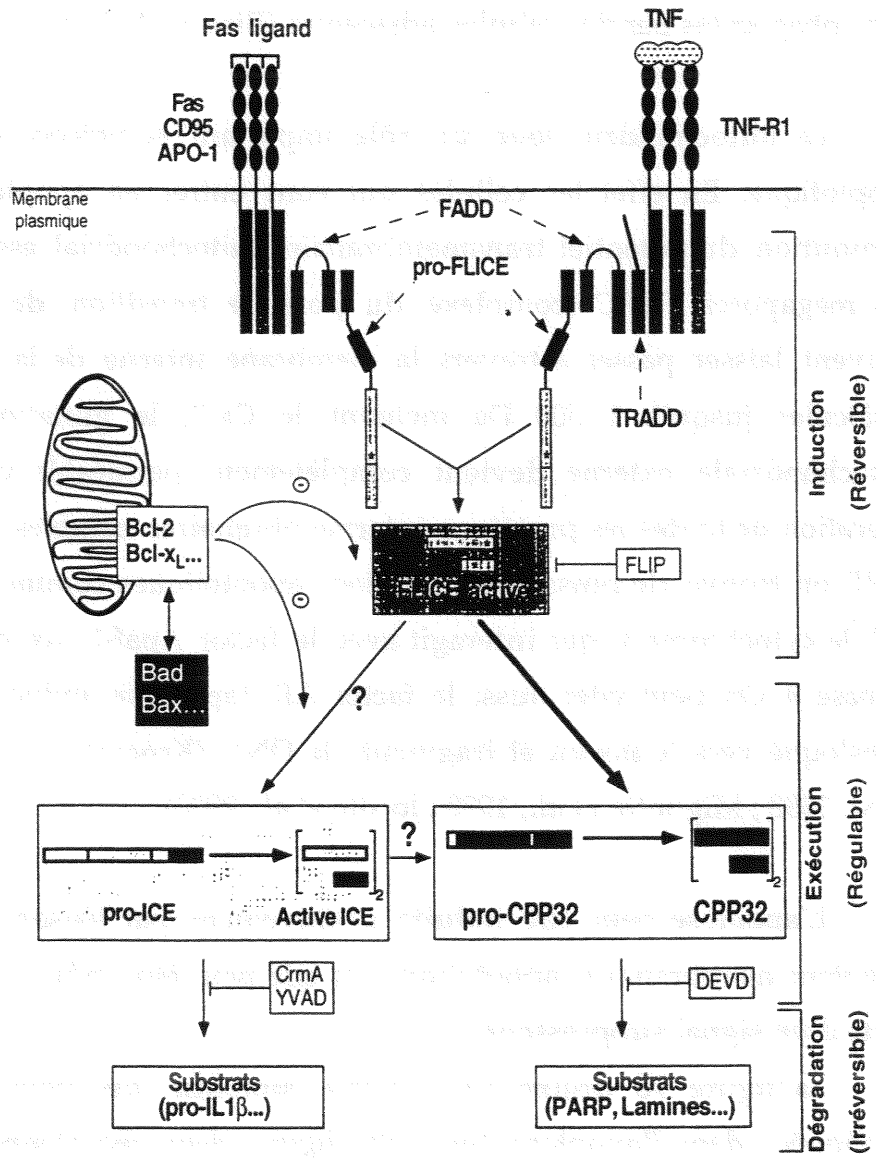


Fig. 78 : Schéma des voies apoptotiques (Ricci et Auberger, 1998). La fixation des ligands sur leurs récepteurs induit la trimérisation des récepteurs et le recrutement direct ou pas de FADD qui active FLICE (caspase 8), laquelle active en cascade, une série de caspases. Ces cystéine-protéases dégradent toutes une série de substrat.

signaling complex) qui va recruter la forme zymogène de la protéine Flice/Mach $\alpha 1$ qu'on appelle maintenant caspase 8. Les caspases sont une famille de cystéine-protéases qui clivent de nombreux substrats. Les caspases sont actuellement classées en 3 familles :

les caspases 1, 4, et 5, homologues de ICE (interleukine 1 β converting enzyme). Les caspases 3, 6, 7, 8, et 10 homologues de CCP32 et les caspases 2, 9. Toutes ces caspases sont activées par protéolyse; il peut y avoir autoactivation (Mignon *et al.*, 1998). Les caspases clivent des protéines structurales nucléaires (laminine), des protéines du cytosquelette (actine), des enzymes liées à l'ADN. Une CAD (caspase activated desoxyribonuclease) et un ICAD (inhibitor of caspase activated desoxyribonuclease) ont été identifiés par Enari (1977). Les caspases peuvent dégrader aussi des protéines de signalisation (MEKKI, PKC δ , PAK₂).

En résumé, l'apoptose peut se subdiviser en trois phases : induction, exécution, dégradation (Figure 78).

- Il existe de très nombreux signaux différents d'induction physiologique ou pathologique intra comme extracellulaires : traitement des cellules par des substances cytotoxiques, par les glucocorticoïdes, par le TNF α , etc. Cette phase est réversible.

- La phase d'exécution est la phase de régulation. La régulation se fait par les protéines de la famille Bcl₂. Dans cette famille, il existe des protéines proapoptotiques (Bax, Bad, Bik, Bak) et des protéines anti-apoptotiques (Bcl₂ et Bcl-XL). Ces protéines forment des homo ou des hétérodimères pouvant former des pores, comme ces protéines Bcl₂ et Bcl-XL sont localisées sur la membrane externe de la mitochondrie, elles régulent la perméabilité de la membrane mitochondriale, l'événement précoce de l'apoptose.

Les protéines de la famille des Heat Shock proteins en particulier HSP70 et HSP22 jouent également un rôle régulateur dans la décision mort ou survie (Polla *et al.*, 1998). Ces protéines sont antiapoptotiques.

- L'absence de facteurs de croissance est un inducteur d'apoptose et de nombreux travaux font état du rôle protecteur des récepteurs IGF-R1 activés pour la survie cellulaire. L'action protectrice des IGFs s'exerce plus spécialement

au niveau du système nerveux central (Gluckman *et al.*, 1992 ; Beck, 1994) ou des cellules hématopoïétiques (Rodriguez-Tarduchy, 1992). c'est le récepteur IGF-R1 qui est le facteur limitant de la protection, ainsi une surimpression de ces récepteurs protège les cellules contre l'apoptose par le TNF α (Wu *et al.*, 1996).

Les résultats que nous obtenons en utilisant des fibroblastes d'embryons de poulets sur le rôle des IGFs et de HWESAS en tant que protecteur de l'apoptose ne sont pas très démonstratifs. Lorsque l'on mesure la phase sub-GO du cycle cellulaire, IGF1 et IGF2 utilisés seuls diminuent le pourcentage des cellules dans cette phase exerçant un léger effet protecteur, HWESAS n'a aucune action et n'améliore pas celle de IGF1 et IGF2. Si on mesure la fixation d'annexine-FITC sur des fibroblastes adhérentes, le mélange IGF1 + HWESAS semble aussi efficace que le sérum de veau 10 %, tandis que HWESAS seul n'a pas d'effet protecteur. Il faut rappeler que nous utilisons des IGFs recombinants humains dont l'affinité pour les FEP peut être moindre que celle pour les cellules hématopoïétiques ou des SNC. Le nombre de ces récepteurs sur les FEP également être plus faible.

V - CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Depuis de nombreuses années les chercheurs du laboratoire de Biochimie Médicale de la Faculté de Médecine travaillent sur des facteurs de croissance de petits poids moléculaire (FCPPM) qui amplifient l'action des IGF1 et IGF2. Ces facteurs ont été identifiés, isolés et caractérisés au laboratoire ; il s'agit de deux peptides HWESAS et WGHE. Notre travail de thèse s'inscrit dans ces recherches.

Une première partie de ce travail a été la recherche des FCPPM dans les ultrafiltrats (UF) de sérums animaux. Ces UF ont été testés seuls ou en association avec IGF1 et IGF2 et c'est l'activité mitogénique mesurée par l'incorporation de [³H]-thymidine dans des fibroblastes d'embryons de poulets que nous avons retenue comme test de mise en évidence des FCPPM.

De l'ensemble de ces expériences, on peut retenir que :

- les UF de cheval, de boeuf, de porc, de souris testés seuls ont une activité mitogénique significative. Ce sont des résultats semblables à ceux obtenus avec les UF de sérums humains. L'activité mitogénique du sérum de lapin est faible.
- les UF de mouton et de rat sont très significativement inhibiteurs de l'incorporation de [³H]-thymidine.
- les résultats obtenus avec l'ultrafiltrat de SVF sont plus ambigus, il présente une activité mitogénique à la plus faible concentration utilisée et devient inhibiteur à plus fortes concentrations.

Lorsque l'UF est testé en présence d'IGF1, on constate que :

- les UF de cheval, de porc, de souris augmentent significativement l'action d'IGF1. C'est ce que nous obtenons aussi avec l'UF humain.
- L'UF de boeuf ne stimule IGF1 que pour une seule dose (2,5 %).
- L'UF de lapin est sans effet.

- L'UF de sérum de veau foetal est sans effet sur IGF1 à faible concentration, inhibiteur à plus forte concentration. Les UF de mouton et de rat sont fortement inhibiteurs à toutes les doses testées.

Les résultats obtenus avec les UF de sérum animaux testés en présence d'IGF2 sont très proches des précédents :

- L'UF de cheval et de souris stimulent l'activité d'IGF2.
- L'UF de boeuf a une action plus importante sur IGF2 que sur IGF1.
- Par contre, l'UF de porc actif avec IGF1 est inactif avec IGF2.
- Les UF de sérum de veau foetal, de mouton et de rat sont inhibiteurs comme avec IGF1.

Les résultats laissent penser que les UF qui ont une activité mitogénique et qui stimulent l'activité d'IGF1 et d'IGF2 contiennent aussi les peptides isolés de l'UF humain. Grâce à un anticorps spécifique dirigé contre HWESAS obtenu au laboratoire, nous avons pu montrer que l'UF de sérum de jument contenait de 5 à 28 mg/l d'HWESAS alors que le poulain ou le cheval n'en contiennent qu'environ 1 mg/l.

La concentration de HWESAS dans l'UF de boeuf ou de génisse est comprise entre 2,5 et 5 mg/l, l'UF de porc en contient 20 mg/l, il est indétectable dans le sérum de mouton.

Il semble donc bien y avoir une relation entre les activités mitogéniques des UF d'animaux et la présence du peptide HWESAS. Ces UF peuvent contenir d'autres mitogènes, en particulier WGHE que nous n'avons pas pu rechercher ou des inhibiteurs.

La deuxième partie du travail a été consacrée à vérifier si les peptides de synthèse HWESAS et WGHE et d'autres peptides apparentés reproduisaient bien l'activité de l'UF humain et des fractions purifiées obtenues à partir de sérums humains. Diverses activités biologiques ont été testées.

V-1. Activité mitogénique.

L'activité des **peptides seuls** a été mesurée sur plusieurs lignées cellulaires : fibroblastes d'embryons de poulets, cellules 3T6, cellules hybridomes Mark-3, cellules MCF7 et avec un ou plusieurs des peptides : HWESAS, YHWESAS, HWESASY, WGHE, un peptide de 17 aa contenant la séquence HWESAS et sa forme désarginée de 16 aa.

Les peptides ont tous une activité mitogénique mais que le maximum d'activité est obtenu avec des doses différentes pour chacun des peptides et que les lignées cellulaires sont plus ou moins sensibles à l'effet mitogène de ces peptides. Les FEP lignée primaire sont beaucoup plus sensibles que les cellules transformées ou issues de cellules cancéreuses.

Lorsque les peptides sont testés **avec IGF1** et si l'on considère les résultats obtenus sur les fibroblastes d'embryons de poulets, on observe que HWESAS et WGHE de synthèse stimulent l'action d'IGF1 comme le faisait l'UF ou les fractions purifiées. Le peptide de 17 aa est faiblement activateur, celui de 16 aa est inhibiteur alors que seul il avait une action mitogène importante.

Les résultats obtenus avec HWESAS modifiés sont intéressants. Le blocage de l'extrémité N-terminale diminue l'activité du peptide alors que le blocage de l'extrémité C-terminale est sans effet.

Lorsqu'ils sont en association avec **IGF2** :

- HWESAS et WGHE de synthèse stimulent l'activité d'IGF2 mais plus faiblement que celle d'IGF1
 - YHWESAS et HWESASY se comportent de la même façon et stimulent l'activité d'IGF2 du moins à faibles doses
 - les peptides de 17 et 16 aa sont stimulateurs,
- donc les peptides testés n'agissent pas de façon identique sur IGF1 et sur IGF2.

Nous avons montré précédemment que les UF de sérum humain pouvaient être utilisés séquentiellement avec les IGFs. Le peptide de synthèse HWESAS mis dans le milieu de culture (au moins pendant 6 h) avant d'être enlevé et remplacé par IGF1 ou IGF2, a encore un effet stimulateur sur l'activité mitogénique de ces derniers.

La protéine kinase C est impliquée dans l'activité mitogénique d'IGF1 et IGF2. L'expression de cette enzyme est augmentée lorsque les cellules sont cultivées en présence d'IGF1 ou d'IGF2. Elle l'est aussi mais dans une moindre mesure en présence d'HWESAS. L'utilisation d'un inhibiteur de la PKC (le bispindolylmaléimide) diminue l'action mitogène de HWESAS, dans une faible mesure celle d'IGF1 et paradoxalement stimule celle d'IGF2. Par contre l'inhibiteur de la PKC diminue significativement la mitogénicité d'IGF1 + HWESAS ou d'IGF2 + HWESAS.

V-2. Transport transmembranaire et synthèse protéique.

Des travaux déjà anciens sur les IGFs ont montré que ces facteurs de croissance augmentaient l'entrée du glucose et des acides aminés dans la cellule et qu'ils augmentaient la synthèse protéique.

HWESAS seul n'a pas d'action sur le transport transmembranaire des nutriments (oses et aa) alors qu'il agit en synergie avec IGF1 et IGF2. HWESAS est également sans action sur la synthèse protéique alors qu'il stimule l'action d'IGF1 ou IGF2, son effet sur la synthèse protéique est significatif dès la 12^{ème} heure. Ces résultats sont confirmés par l'incorporation d'acides aminés marqués.

Sous l'action d'IGF1 et d'IGF2, des protéines sont phosphorylées, cette activité de phosphorylation est stimulée par la présence conjointe d'HWESAS alors que seul, il est sans effet. On observe qu'une protéine de 43 kDa est fortement phosphorylée sous l'action des facteurs de croissance.

V-3. Effet des peptides sur l'apoptose.

Les IGF1 et IGF2 sont connus pour protéger les cellules contre l'apoptose, nous avons testé si le peptide HWESAS modifiait cette propriété. Pour mesurer l'effet sur l'apoptose, deux méthodes ont été utilisées, l'étude du cycle cellulaire avec en particulier le pourcentage des cellules en phase sub-G0/G1 et la mesure de la fixation de l'annexine V. HWESAS par lui-même n'exerce pas de protection significative contre l'apoptose, associé à IGF1 il exerce une certaine protection mais qui est moindre que celle du SVF 10 % + Gln 4 mM.

Dans ce travail nous avons montré que HWESAS (et d'autres peptides de synthèse apparentés) stimulait différentes activités biologiques des IGFs. Il reste à comprendre comment ce peptide peut agir.

La voie principale par laquelle les IGFs agissent passe par la liaison à un récepteur tyrosine kinase, la phosphorylation du récepteur puis la phosphorylation d'IRS1 (ou IRS2) et l'activation en cascade par phosphorylation de protéines, en particulier celles de la famille des MAP kinases, qui conduit à la transcription de gène précoce comme C-myc C-fos. Nous devons maintenant étudier le rôle de HWESAS sur chacune des étapes de la transduction du signal en étudiant

- l'effet de HWESAS sur la liaison des IGFs à leurs récepteurs
- son action sur l'activité tyrosine kinase des récepteurs activés
- l'activation des MAP kinases.

Parallèlement à cette étude de Biochimie fondamentale sont continués les travaux sur le dosage immunologique d'HWESAS dans les sérums d'animaux et dans les sérums humains chez des sujets normaux et dans différentes pathologies pour comprendre le rôle *in vivo* de ce peptide.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. ADAM S., SAUDERS M., STE, MARIE A., ROSEN D., SOMMER A. (1997) Administration of rhIGF-I/IGFBP-3 (somatokine) stimulates bone formation in elderly women. *J. Bone Min. Res.*, 12 (S1).
2. ADAM S., ROSENS D., SOMMER A. (1998) RhIGF-I/IGFBP-3 (somatokine) therapy for the treatment of osteoporosis. *In* Molecular mechanisms to regulate the activities of insulin-like growth factors. Takano K., Hizuka N., Takahashi S.I. (Eds), Elsevier, 327-330.
3. ALBAS J., SLAGER-DAVIDOV R., STEENBERG Ph.H., SUSSENBACH J.S. VAN DER BURY B. (1998) The role of MAP kinase in TPA mediated cell cycle arrest of human breast cancer cells. *Oncogene*, 16, 131-139.
4. ALEXANDER A.N., CAREY H.V. (1999) Oral IGF-1 enhances nutrient and electrolyte absorption in neonatal piglet intestine. *Am. J. Physiol.*, 277 (Gastro. Intest. Liver. Physiol. 40), 619-625.
5. ANDRE F., RIGOT V., REMACLE-BONNET M., LUIS J., POMMIER G., MARVALDI J. (1999) Protein kinases C γ and δ are involved in insulin like growth factor-I induced migration of colonic epithelial cells. *Gastroenterology*, 166, 64-77.
6. ARAY T., BUSBY W., CLEMMONS D.R. (1996) Binding of insulin-like growth factor (IGF)I or II to IGF-binding protein-2 enables it to bind to heparin and extra-cellular matrix. *Endocrinology*, 137, 4571-4575.
7. ARMSTRONG D.G., HOGG CO., CAMPBELL B.K., WEBB R. (1996) Insulin-like growth factor (IGF) binding protein production of primary cultures of ovine granulosa and thecal cells. The effect on IGF1, gonadotropin and follicle size. *Biol. Reprod.*, 55, 1163-1171.
8. ARTUR M., HEULIN M.H., LASBENNE A., LAMOTTE F., STRACZEK J., BELLEVILLE F., NABET P. (1987) Activité de sulfatation et mitogénique des facteurs de croissance du sérum humain. Importance des composés de poids moléculaires inférieurs à 1 000 Da dans l'expression globale des activités de ce sérum sur trois types cellulaires différents. *C.R. Soc. Biol.*, 181, 513-520.
9. BAKER C.J., LIU J.P., ROBERTSON E.J., EFSTRATIADIS A. (1993) Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell*, 75, 73-82.

10. **BALA R.M., HANKINS C., SMITH G.R.** (1975) A somatomedin assay using normal rabbit cartilage in clinical studies. *J. Physiol. Pharmacol.*, 53, 403-409.
11. **BALLARD F.J., JOHNSON R.J., OWENS P.C., FRANCIS G.L., UPTON F.M., Mc MURTRY J.P., WALLACE J.C.** (1990) Chicken insulin-like growth factor-I : amino acid sequence, radio-immunoassay and plasma levels between strains and during growth. *Gen. Comp. Endocrinol.* 79, 459-468.
12. **BANG P., BRISMAR K., ROSENFELD R.G.** (1994) Increased proteolysis of insulin-like growth factor-binding protein-3 (IGFBP-3) in non insulin-dependent diabetes mellitus serum with elevation of a 29 kilodalton (Kda) glycosylated IGFBP-3 fragment contained in the approximately 130 to 150 kDa ternary complex. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 78, 1119-1127.
13. **BARINAGA M.** (1998) Study suggests new way to gang prostate cancer risk. *Science*, 279, 475.
14. **BASERGA R., HONGO A., RUBINI M., PRISCO M., VALENTINIS B.** (1997) The IGF-1 receptor in cell growth transformation and apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta*, 1332, 105-126.
15. **BASTARD J.P., JARDEL C., GUERRE-MILO M., HAINQUE B.** (1998) Les transporteurs d'hexoses chez l'homme: leur rôle dans l'insulinosensibilité des tissus périphériques. *Rev. Med. Intern.*, 19, 108-118.
16. **BAUER M., PARVIZI N.** (1996) Pulsatile and diurnal secretion of GH and IGF-I in the chronically catheterized pig fetus. *J. Endocrinol.*, 149, 125-133.
17. **BAUMRUCKER C.R., BLUM J.W., GREEN M.H.** (1994) Effects of rhGF1 in neonatal calves : I derigue blood coupoment and fat development. *J. Anim. Sci*, 69 (Suppl. 1) 296 (Abstz).
18. **BAUMRUCKER C.R., HADSELL D.L, BLUM J.W.** (1994) Effects of dietary insulin-like growth factor 1 on growth and insulin-like growth factor receptors in neonatal calf intestin. *J. Anim. Sci*, 72 , 428-433.
19. **BAXTER R.C., ZALTSMAN Z., TURTLE J.R.** (1984) Immunoreactive somatomedin-C/insuline-like growth factor-1 and its binding protein in human milks. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 58, 955-959.
20. **BAXTER R.C., MARTIN J.L.** (1989a) Binding proteins for the insulin-like growth factors : structure, regulation and function. *Prog. Growth Factor Res.*, 1, 149-168.
21. **BAXTER R.C., MARTIN J.L.** (1989b) Structure of the Mr 140 000 growth hormone-dependent insulin-like growth factor binding proteins complexe by reconstitution and affinity-labelling. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 86, 6898-6902.

22. **BAXTER R.C., MARTIN J.L.** (1989c) Radioimmunoassay of growth hormone-dependent insulin-like growth factor binding protein in human plasma. *J. Clin. Invest.*, 78, 1504-1512.
23. **BECK KD.** (1994) Functions of brain-derived neurotrophic factors insulin-like growth factor-1 and basic fibroblasts growth factor in the development and maintenance of dopaminergic neurons. *Prog. Neurobiol.*, 44, 497-516.
24. **BECK KD., POWELL-BRAXTON L., WIDMER H.R., VALVERDE Y., HELTI F.** (1995) IGF1 gene disruption results in reduced brain size, CNS hypomyelination and loss of hippocampal granule and striatal parvalbumin containing neurons. *Neuron*, 14, 717-730.
25. **BINOUX M., HOSSENLOPP P.** (1988) Insulin-like growth factor (IGF) and IGF-binding proteins. Comparison of human serum and lymph. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 67, 509-514.
26. **BINOUX M.** (1996) Protéines de liaison des IGFs, leur rôle dans la régulation de la croissance. *Médecine thérapeutique*, 2, 33-39.
27. **BLUM W.F., ALBERTSSON-WIKLAND K., ROSBERG S., RANKE M.B.** (1993) Serum levels of insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF binding protein 3 reflect spontaneous growth hormone secretion. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 76 : 1610-1616.
28. **BOFFA G.A., LAMBIN P., RINS E., NADAL C.** (1985) Effet inhibiteur de l' α 2 macroglobuline humaine et d'un peptide libéré par la trypsine sur la transition G1-S des hépatocytes. *C.R. Acad. SCI Paris*, t 300 série III N°2, 31-36.
29. **BOLINDER J., LINDBLAD A., ENGFELDT P., ARNER P.** (1987) Studies of acute effects of insulin-like growth factors I and II in human fat cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 65, 732-737.
30. **BONFINI L., MIGLIACCIO E., PELLICI P.G.** (1996) Not all she's road lead to Ras. *Trends Biochem.*, 21, 257-261.
31. **BOREL J.P., MAQUART F., LE PEUCH C., RANDOUX A., GILLERY P., BELLON G., MONBOISSE J.F.** (1997) *Biochimie dynamique*, De Boeck Université, pp 351.
32. **BOYLE D.W., DENNE S.C., MOOREHEAD H., LEE W., BOWSHER R.R., LIECHTRY E.A.** (1998) Effect of rhIGF-1 infusion on whole fetal and fetal skeletal muscle protein metabolism in sheep. *Am. J. Physiol.*, 275, 1082-1091.

33. **BRISSENDEN J.E., UTIRCH A., FRANCKE U.** (1984) Human chromosomal mapping of genes insulin-like growth factors I and II and epidermal growth factor. *Nature*, 310, 781-784.
34. **BROWER V.** (1998) Prostate cancer link sours IGF1. *Nature Biotechnol.*, 16, 223.
35. **BUEB J.L., GALLOS A., SCHNEIDER J.C., PARINI J.P., TSCHIRHART E.** (1995) A double labelling fluorescent assay for concomitant measurement of $[CO_2^{2+}]$ and O_2 -production in human macrophages. *Biochem. Biophys. Acta*, 1244, 79-84.
36. **BUONOMA F.C., RUFFIN D.S., BRENDEMEULH J.P., VEENHUIZEN J.J. SARTIN J.L.** (1996) The effects of bovine somatotropin and porcine somatotropin on growth factor and metabolic variables in horses. *J. Anim. Sci*, 74, 886-894.
37. **BUTLER A.A., YAKAR S., GEWOLB I., KARAS H., OKUBO Y., LeROITH D.** (1998) Insulin-growth factor -1 receptor signal transduction at the interface between physiology and cell biology comparative. *Biochem. Physiol.*, 121, 19-26.
38. **CAPIAUMONT J., LEGRAND C., DOUSSET B., BELLEVILLE F., NABET P.** (1995) Hybridoma culture in polyether sponge with bovine whey *in vitro* cell. *Dev. Biol. Anim.*, 31, 412-414.
39. **CAPIAUMONT J.** (1999) Production d'anticorps monoclonaux dirigés contre des peptides de 3, 4, 6 acides aminés identifiés dans le sérum humain. Essai de mise au point d'un dosage immunologique du peptide HWSAS. Thèse de Doctorat du 3^{ème} Cycle, Université Henry-Poincaré, Nancy-1.
40. **CAPIAUMONT J., JACOB C., SAREM M., NABET P., BELLEVILLE F., DOUSSET B.** (2000) Assay of a seric human hexapeptide (HWESAS) using a monoclonal antibody and ELISA. *Clin. Chim. Acta*, 293, 89-103.
41. **CHAIKEN R.L., MOSES A.C., USHER P., FLIERS J.S.** (1986) Insulin stimulation of amino isobutyric acid transport in human skin fibroblasts is mediated through both insulin and type I insulin-like growth factor receptors. *J. Clin. Endocrinol.*, 63, 1181-1185.
42. **CHAN J.M., STAMPFER M.J., GIOVANNUCCI E., GANN P.H., MA J., WILKINSON P., HENNEKENS C.H., POLLAK M.** (1998) Plasma insulin-like growth factor I and prostate cancer risk : a prospective study. *Science*, 279, 563-566.
43. **CHAO T.S., FOSTER D.A., RAPP L.R., ROSNER M.R.** (1994) Differential Raf requirement for activation of mitogen activated protein kinase by growth factors, phorbol esters and calcium. *J. Biol. Chem.*, 269, 7337-7341.
44. **CHEATHAM B., KAHN C.R.** (1995) Insulin action and the insulin signaling network. *Endocri. Rev.*, 16, 117-142.

45. CHEATHAM L., MONFAR M., CHOU M.M., BLENIS J. (1995) Structural and functional analysis of pp^{70S6K}. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 92, 11696-11700.
46. CHEN N.X., HAUSMAN G.J., WRIGHT J.T. (1996) Hormonal regulation of insulin-like growth factor binding protein and insulin-like growth factor I (IGF-I) secretion in porcine stromal vascular cultures. *J. Anim. Sci*, 74, 2369-2375.
47. CHEVENNE D., PORQUET D. (1995) Hormone de croissance (GH) et insulin-like growth factor 1 (IGF1) dans les états nutritionnels. *Ann. Biol. Clin.*, 53, 527-538.
48. CHOU M.M., HOU W., JOHNSON J., GRAHAM L.K. LEE M.H. CHEN C.S. NEWTON A.C., SCHAFFHAUSEN B.S., TOKER A. (1998) Regulation of protein kinase C zeta by Pi3-kinase and PDK-1. *Curr. Biol.*, 8, 1069-1077.
49. CHUN S.Y., BILLIG H., TILLY J.L. FURUTA I., TSAFRIRI A., HSUEH A.J.W. (1994) Gonadotropin suppression of apoptosis in cultured preovulatory follicles : mediatory role of endogenous insulin-like growth factor-I. *Endocrinology*, 135, 1845-1853.
50. CLAIRMONT K.B., CZECH M.P. (1991) Extracellular release as the major degradative pathway of the insulin-like growth factor II/mannose 6-phosphate receptor. *J. Biol. Chem.*, 266, 12131-12134.
51. CLEMMONS D.R., SMITH-BANK A., UNDERWOOD L.E. (1992) Reversal of diet-induced catabolism by infusion of recombinant insulin-like growth factor 1 in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 75, 234-238.
52. CLEMMONS D.R., JONES J.I., BUSBY W.H., WRIGHT G. (1993) Role of insulin-like growth factor binding proteins in modifying IGF actions. *Ann. N.Y. Acad. Sci*, 692, 10-21.
53. COHICK W.S., MC GUIRE M.A., CLEMMONS D.R., BAUMAN D.E. (1992) Regulation of insulin-like growth factor binding proteins in serum and lymph of lactating cows by somatotropin. *Endocrinology*, 130 (3), 1508-1514.
54. CONLON M.A., FRANCIS G.L., TOMAS F.M., WALLACE J.C., HOWALL G.S., BALLARD F.J. (1995) Continuous 14 day infusion of IGFI increases the growth of normal female rats but exhibits a lower potency than IGF1. *J. Endocrinol.*, 144, 91-98.
55. COOLICAN S.A., SAMUEL D.S., EWTON D.Z., MEWADE F.J., FLORINI J.R. (1997) The mitogenic and myogenic actions of insulin-like growth factors utilize distinct signaling pathways. *J. Biol. Chem.*, 272, 6653-6662.

56. **COPPOLA D., FERBER A., MIURA M., SELL C., D'AMETROSIO C., RUBIN R., BASERGA R.** (1994) A functional insulin-like growth factor I receptor is required for the mitogenic and transforming activities of the epidermal growth factor receptor. *Mol. Cell. Biol.*, 14, 4588-4595.
57. **CORVOL M.T., DUMONTIER M.F. MAROTEAUX P., RAPPAPORT R., GUYDA M., POSNER B.I.** (1978) Culture de cartilage de croissance humain normal et pathologique. Action de dérivés de la vitamine D et de la somatomédine. *Arch. Franç. Pédiat. (Suppl)* 35, 57-64.
58. **CREWS F.T., MCELHANEY R., FREUND G., BALLINGER W.E., RAIZADA M.K.** (1992) Insulin-like growth factor I receptor binding in brains of Alzheimer's and alcoholic patients. *J. Neurochem.*, 58, 1205-1210.
59. **CRISTOFALO V.J., PHILLIPS P. D., SORGER T., GERHARD G.** (1989) Alterations in the responsiveness of senescent cells to growth factors. *J. Gerontol.* , 44, 55-62.
60. **CUSHMAN S.W., WARDZALA L.J.** (1980) Potential mechanism of insulin action on glucose transport in the isolated rat adipose cell: apparent translocation of intra-cellular transport system to the plasma membrane. *J. Biol. Chem.*, 255, 4758-4762.
61. **CUSSAC D., VIDAL M., LEPRINCE C. LIU W.Q., CORNILLE F., TIRABOSCHI G., ROQUES B.P., GARBEY C.** (1999) A Sos-derived peptidimer blocks the Ras signaling pathway by binding both Grb₂ SH3 domains and displays antiproliferative activity. *FASEB J.*, 13, 31-38.
62. **CWYFAN-HUGHES S.C., COTTERILL A.M., MOLLOY A.R., CASSELL T.B., BRANDE N., HINDS C.J., WASS J.A., HOLLY J.M.** (1992) The induction of specific protease for insulin-like growth factor-binding protein following major heart surgery. *J. Endocrinol.*, 135, 135-145.
63. **CYNOBER L. ANSEL C., CHATELAIN P., VANBOURDOLLE M., AGNERAY J., EKINDJAN G.** (1985) Insulin-like growth factor/somatomedin action on 2 deoxyglucose and alpha-amino isobutyrate uptake in chick embryo fibroblasts. *J. Biochem.*, 264, 19700-19705.
64. **DAI Z., XING Y., BONEY C.M., CLEMMONS D.R. D'ERCOLE J.** (1994) Human insulin-like growth factor-binding protein (hIGFBP-1) in transgenic mice : characterization and insights into the regulation of IGFBP-I expression. *Endocrinology*, 135, 1316-1327.
65. **DAUGHADAY W.H., HALL K., RUBEN M.S., SALMON W.D., VAN DER BRANDE J.L. VAN WYK J.J.** (1972) Somatomedin : proposed designation for sulphation factor. *Nature*, 235, 107.

66. DAUGHADAY W., ROTWEIN P. (1989) Insulin-like growth factors I and II. Peptide messenger ribonucleic acid and gene structures, serum and tissue concentrations. *Endocrinol. Rev.*, 10, 68-91.
67. DAWE S.R., FRANCIS G.L., MC NANEARA P.Y., WALLACE J.C., BALLARD F.J. (1988) Purification, partial sequences and properties of chicken insulin-like growth factors. *J. Endocrinol.*, 117, 173-181.
68. DEKKER L.V., PARKER P.J. (1994) Protein kinase C - a question of specificity. *Trends Biochem. Sci*, 19, 73-77.
69. DEPAGTER-HOLTHUIZEN P., JANSEN M., VAN SCHAIK F.M.A., VAN DER KAMMEN R.A., OOSTERWIJK C., VAN DEN BRANDE J.L., SUSSENBACK J.S. (1987) The insulin-like growth factor II gene contains two specific promoters. *FEBS Letter*, 214, 259-264.
70. DEPAGTER-HOLTHUIZEN P., JANSEN M., VAN DER KAMMEN R.A., VAN SCHAIK F.M., SUSSENBACK J.S. (1988) Differential expression of the human insulin-like growth factor II gene. Characterization of the IGFII mRNAs and an mRNA encoding a putative IGFII associated protein. *Biochim. Biophys. Acta*, 950, 282-292.
71. D'ERCOLE A.J. (1993) Expression of insulin-like growth factor-1 in transgenic mice. *Ann. NY Acad. Sci*, 692, 149-160.
72. DONNADIEU M., SCHIMPF R.M., GARNIER P., CHAUSSAIN J.L., JOB J.C. (1980) Somatomedine, transferrine et régulation de la croissance chez l'enfant. *Path. Biol.*, 28, 373-374.
73. DORE S., KAR S., QUIRION R. (1997) Emploi thérapeutique de l'IGF-1 dans le traitement de maladies neurodégénératives. *Med. Sci*, 13, 557-565.
74. DOUGLAS R.G., GLUCKMAN P.D., BALL K., BREIER B., SHAW J.H.F. (1991) The effects of infusion of insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF-II, and insulin on glucose and protein metabolism in fasted lambs. *J. Clin. Invest.*, 88, 614-622.
75. DOUSSET B. (1997) Etude de certains facteurs de croissance en biologie humaine. Thèse de Doctorat du 3^{ème} Cycle, Université Henry-Poincaré, Nancy-1.

76. DOUSSET B., STRACZEK J., MAACHI F., LE NGUYEN D., JACOB C., CAPIAUMONT J., NABET P., BELLEVILLE F. (1998) Purification from human plasma of a hexapeptide that potentiates the sulfatation and mitogenic activities of insulin-like growth factors. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 247, 587-591.
77. DUANE C. (1998) Nutritional and developmental regulation of insulin-like growth factors in fish. *J. Nutr.*, 128, 306 S-314 S.
78. DUANE C., CLEMMON D.R. (1998) Differential expression and biological effects of insulin-like growth factor binding protein-4 and -5 in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.*, 273, 16836-16842.
79. DUFOURNY B., ALBAS J., Van TEEFFELEN H., Van SCHAIK F., Van Der BURG B., STEENBERGH P., SUSSENBACH J. (1997) Mitogenic signaling of insulin-like growth factor in MCF-7 human breast cancer cells requires phosphatidylinositol 3-kinase and is independent of mitogen activated protein kinase. *J. Biol. Chem.*, 272, 31163-31163.
80. DUNGER D.B., CHEETHAM T.D., CROWNE E.C. (1995) Insulin-like growth factors (IGFs) and IGF-I treatment in the adolescent with insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism.*, 44 : suppl 4, 119-123.
81. DUTIL E.M., TOKER A., NEWTON A.C. (1998) Regulation of conventional protein kinase C isozymes by phosphoinositide-dependent kinase 1 (PDK-1). *Curr. Biol.*, 8, 1366-1375.
82. EL FARRICHA O. (1991) Facteurs de croissance de petit poids moléculaire (FCCPPM) : essais de purification et de caractérisation, origine et variations physiopathologiques. Thèse Docteur Université Nancy I.
83. ENARI M., SAKAHIRA H., YOTOHAMA H., OKAWA K., IWAMATSU A., NAGATA S. (1997) A caspase activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature*, 391, 43-50.
84. FARESE R.V., STANDAERT M.L., BARNES D.E., DAVIS J.S., POLLET R.J. (1985) Phorbol ester provokes insulin-like effects on glucose transport, amino acid uptake, and pyruvate deshydrogenase activity in BC3H-1 cultured myocytes. *Endocrinology*, 116, 2650-2655.
85. FARESE R.V., NAIR G.P., SIERRA C.G., STANDAERT M.L., POLLET R.J., COOPER D.R. (1989) Insulin-like effects of epidermal growth factor and insulin-like growth factor-1 on [³H] 2-deoxyglucose uptake diacylglycerol generation and protein kinase C activation in BC3H-1 myocytes. *Biochem. J.*, 261, 927-934.
86. FEIGE J.J., QUIRIN N., SOUCHELNITSKIY S. (1996) TGFβ, un peptide biologique sous contrôle : formes latentes et mécanismes d'activation. *Med. Sci*, 12, 929-939.

87. FIELDER P.J., ROSENFELD R.G., GRAVES H.C.B., GRANDBOIS K., MAACK C.A., SAWAMURA S., OGAWA Y., SOMMERR A., COHEN P. (1994) Biochemical analysis of proctate specific antigen proteolysed insulin-like growth factor binding protein-3. *Growth Regul.*, 1, 164-172.
88. FLORINI J.R., EWTON D.Z., ROOF S.L. (1991) Insulin like growth factor-I stimulates terminal myogenic differentiation by induction of myogenin gene expression. *Mol. Endocrinol.*, 5, 718-724.
89. FLORINI J.R., EWTON D.Z. (1995) Actions of anabolic hormones and growth factors on cultured neonatal heart cells. *Growth Regul.*, 5, 28-35.
90. FLYUBJERG A., OUKOVH., ALBERTI G. (1993) Wiley (Eds) New-York, 1-22.
91. FORNE T., FEIL R. (1997) Dérèglement de la voie des facteurs de croissance de type insuline dans les syndromes d'anomalies de croissance. *Med. Sci*, 13, 711-715.
92. FRANCIS G.L., READ L.C., BALLARD F.J., BAGLEY C.J., UPTON F.M., GRAVESTOCK P.M., WALLACE J.C. (1986) Purification and partial sequence analysis of insulin-like growth factor I from bovine colostrum. *Biochem. J.*, 233, 207-213.
93. FROESCH E.R., ZAPF J. AUDHYA T.K., BEN-PORATH E., SEGEN B.J., GIBSON K.D. (1976) Nonsuppressible insulin-like activity and thyroid hormones: major pituitary-dependent sulfation factors for chick embryo cartilage. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 73, 2904-2908.
94. FROESCH E.R., SCHMID C., SCHWANDER J., ZAPF J. (1985) Actions of insulin-like growth factors. *Annu. Rev. Physiol.*, 47, 443-467.
95. FROGER-GAILLARD B., HOSSENLOPP P., ADOLPHE M., BINOUX M. (1989) Production of insulin-like growth factor and their binding proteins by rabbit articular chondrocytes : relationship with cell multiplications. *Endocrinology*, 124, 2365-2372.
96. FRYKLUND L., LITHINE K., SIEVERTSSON H., WESTTERMARK B. (1974) Isolation and characterizatrion of polypeptides from human plasma enhancing the growth of human normal cells in culture. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 61, 950-956.
97. FRYSTYK J., SJAERBAEK C., DINESEN B., ORSKOV H. (1994) Free insulin-like growth factors (IGF-I and IGF-II) in human serum. *FEBS letter*, 348 : 185-191.
98. FURLANETTO R.W., DICARTO J.N. (1984) Somatomedine C receptors and growth effects in human breast cells maintanied in long term tissue culture. *Cancer Res.*, 44, 2122-2128.

99. **GARBAY C., ROQUES B.P.** (1999) Le blocage de l'interaction Grb2-SOs par un peptide dimérique inhibe la prolifération cellulaire dans un modèle tumoral. *Med. Sci*, 15 (6-7), 903-904.
100. **GIRBAU M., GOMEZ J.A., LESNIAK M.A., DE PABLO F.** (1987) Insulin and IGF-I both stimulate metabolism, growth and differentiation in the postneurula chick embryo. *Endocrinology*, 121, 1477-1482.
101. **GLUCKMAN P. KLEMPT N., GUAN J., MALLARD C., SIRIMANNE E., DRAGUNOW M., KLEMPT M., SINGH K., WILLIAMS C., NIKOLICS K.** (1992) A role for IGF-1 in the resene of CNS neurons following hypoxic-ischemie injury. 182, 593-599.
102. **GMIRA S.** (1991) Etudes sur les facteurs de croissance de faible poids moléculaire à activité mitogénique chez différentes espèces animales: détermination de leur composition en acides aminés, purification à partir du plasma humain. Thèse de Thèse de Doctorat du 3ème Cycle, Université Henry-Poincaré, Nancy-1.
103. **GOEKJIAN P.G., JIROUSEK M.R.** (1999) Protein Kinase C in the treatment of disease: signal transduction pathways, inhibitors and agents in development. *Curr. Med. Chem.*, 6, 877-903.
104. **GOLDRING M.B., GOLDRING S.R.** (1991) Cytokines and cell growth control. *Crit. Rev. Eukaryot Gene Expr.*, 1, 301-326.
105. **GOULD G.W., HOLMAN G.D.** (1993) The glucose transporter family: structure, function and tissue specific expression. *J. Biochem.*, 295, 329-341.
106. **GOWAN L.K. HAMPTON B., HILL D.J., SCHLUETER R.J., PERDUE J.F.** (1987) Purification and characterization of an unique high molecular weight form of insulin-like growth factor II. *Endocrinology*, 121, 449-458.
107. **GREEN D.R., REED J.C.** (1998) Mitochondrie and apoptosis. *Science*, 281, 1309-1312.
108. **GUERRE-MILO M.** (1995) Les transporteurs d'hexoses. *Med. Sci*, 8, 1111-1119.
109. **GUEVARA-AGUIRRE J.** (1996) Insulin-like growth factor I. An important intrauterine growth factor. *N. Engl. J. Med.*, 335 (18), 1389-1391.
110. **GULER H.P., ZAPF J., FROESCH E.R.** (1987) Short-term metabolic effects and half lives of intravenously administered insulin-like growth factor-I in healthy adults. *N. Engl. J. Med.*, 317, 137-140.

111. GULER H.P., SCHMID C., ZAPF J., FROESCH E.R. (1989a) Effects of recombinant insulin-like growth factor-1 on insulin secretion and renal function in normal human subjects. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 86, 2868-2872.
112. GULER H.P., ZAPF J., SCHMID C., FROESCH E.R. (1989b) Insulin-like growth factors I and II in healthy man : estimations of half lives and production rate. *Acta Endocrinol.*, 121, 753-758.
113. GUTTERIDGE J.M.C. (1993) Free radicals in disease processes : a compilation of cause and consequence. *Free Rad. Res. Comm.*, 19, 141-158.
114. HALL K. (1970) Quantitative determination of the sulfatation factor activity in human serum. *Acta Endocrinol.*, 63, 338-350.
115. HALL K. (1972) Human somatomedin determination occurrence biological activity and purification. *Acta Endocrinol.* 163 (Suppl), 1-52.
116. HALL K., JOHANSSON B.L., POVOA G., THAME B. (1989) Serum level of insulin-like growth factor (IGF) I, II and IGF binding proteins in diabetic adolescents treated with continuous subcutaneous insulin infusion. *J. Inter Med.*, 225, 273-278.
117. HALLIWELL B. (1994) Free radicals and antioxidants : a personal view. *Nutr. Rev.*, 52, 253-265.
118. HANTAI D., AKAABOUNE M., LAGORD C., MURAWSKY M., HOUEYOU L.J., FESTOFF B.W., VAUGHT J.L., RIEGER F., BLONDET B. (1995) Beneficial effects of insulin-like growth factor-I on wobbler mouse motoneuron disease. *J. Neurol. Sci*, 129, 122-126.
119. HARA K., YONEZAWA K., SAKAN H., ANDO A., KOTANI K., KITOMMAMEDA H., STEPHENS L., JACKSON T.R., KASUGA M. (1994) 1-pi3 kinase is required for insulin stimulated glucose transport but not for Raf activation in CHO cells. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 91, 7415-7419.
120. HARTZELL H.C., RINDERKNECHT A. (1996) Calphostin C; a widely used protein kinase C inhibitor directly and potently blocks L-type Ca channels. *Am. J. Physiol.*, 270, 1293-1299.
121. HASELBACHER G.F., SCHWAB M.E., PASI A., HUMBEL R.E. (1985) Insulin-like growth factor II (IGFII) in human brain : regional distribution of IGFII and of higher molecular mass forms. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 82, 2153-2157.

122. HERNANDEZ-SANCHEZ C., BLAKESLEY V., KALEBIC T., HELMAN L., LeROITH D. (1995) The role of the tyrosine kinase domain of the insulin-like growth factor I receptor in intracellular signaling, cellular proliferation and tumorigenesis. *J. Biol. Chem.*, 270, 29176-29181.
123. HEULIN M.H., ARTUR M., MALAPRADE D., STRACZEK P., PIERSON M., STOLTZ J.F., BELLEVILLE F., PAYSANT P., NABET P. (1981a) Evidence for the presence in human serum of an ultrafiltrable factor activating somatomedins. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 99, 644-653.
124. HEULIN M.H., ARTUR M., STRACZEK P., MALAPRADE D., PIERSON M., STOLTZ J.F., BELLEVILLE F., PAYSANT P., NABET P. (1981b) Mise en évidence d'une substance ultrafiltrable dans le sérum humain activant la somatomédine. *A. CR. Soc. Biol.*, 295, 83-90.
125. HEULIN M.H. (1982) Mise en évidence d'un facteur sérique de petit poids moléculaire nécessaire au dosage biologique des somatomédines. Thèse de doctorat du 3^{ème} Cycle, Université Nancy I.
126. HEULIN M.H., ARTUR M., STRACZEK P., BELLEVILLE F., NABET P., HERMANN M.D., LEBEURRE M.D., SCHIMPF R.M. (1982) Effect of low molecular weight human serum factors and human somatomedin peptides on human lymphocyte culture. *J. Cell. Sci.*, 57, 129-137.
127. HEULIN M.H., ARTUR M., GESCHIER C., STRACZEK J., VESCOVI G., BELLEVILLE F., PAYSANT P., NABET P. (1984) The biological assay of human somatomedin A : improvement by small molecular weight natural molecules. *Acta Endocrinol. Copenh.*, 106, 43-51.
128. HEULIN M.H., RAJOELINA J., ARTUR M., GESCHIER C., STRACZEK J., LASBENNES A., BELLEVILLE F., NABET P. (1987) Isolation and characterization of a low molecular weight growth promotion factor from human plasma. *Life Sci*, 41, 297-304.
129. HOBBA G.D., FORBES B.E, PARKINSON E.J., FRANCIS G.L., WALLACE J.C. (1996) The Insulin-like growth factor (IGF) binding site of bovine insulin-like growth factor binding protein-2 (bIGFBP-2) probed by iodination. *J. Biol. Chem.*, 271, 30529-30536.
130. HOFFMAN A.R., MARCUS R., HINZ R.L., BUTTERFIELD G., THOMPSON J., GHIRON L., LIEBERMAN S., DALL'AGIO E., CEDA G.P. (1995) Effects of recombinant human insulin-like growth factor I in aging. *In* GHRH, GH and IGF-I Basic and clinical advances (Eds) RM Blackman, Harman S.M., Roth J., Shapiro J.R. Serono Symposia, USA, Spring Verlag, New-York.

131. **HOSSENLOPP P., SEGOVIA B., LASSARRE C., ROGHANI M., BREDON M., BINOUX M.** (1990) Evidence of enzymatic degradation of insulin-like growth factor-binding proteins in the 150 kDa complex during pregnancy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 71: 797-805.
132. **HUANG S., TERSTAPPEN L.W.** (1992) Formation of haematopoietic microenvironment and haematopoietic stem cells from single human bone marrow stem cells. *Nature*, 360, 745-749.
133. **HUFF K.K., KAUFMAN D., GABBAY K.H., SPENCER E.M., LIPPMAN M.E., DICKSON R.B.** (1986) Secretion of an insulin-like growth factor-1 related protein by human breast cancer cells. *Cancer Res.*, 46, 4613-4619.
134. **HUG H., SARRE T.F.** (1993) Protein kinase C isoenzymes: divergence in signal transduction ? *J. Biochem.*, 241, 329-343.
135. **HUMBEL R.** (1990) Insulin-like growth factors I and II, a review. *Eur. J. Biochem.*, 190, 445-452.
136. **HUSSAIN M.A., SCHMITZ O., MENGEL A., GLOTZ Y., CHRISTIANSEN J.S., ZAPF J., FROESCH E.R.** (1994) Comparison of the effects of growth hormone and insulin-like growth factor I on substrate oxydation and on insulin sensitivity in growth hormone deficient humans. *J. Clin. Invest.*, 94, 1126-1133.
137. **HUSSENET F., DOUSSET B., GERVAIS P., CAPIAUPONT J., SCHUHMACHER A., NABET P., KESSLER M.** (1996) Serum insulin-like growth factor-1 and binding proteins (IGFBP-1 and IGFBP-3) concentrations after renal transplantation in adults. *Transplantation Proc.*, 28, 3615-3620.
138. **IAKANO K., HIZUKA N., SHIZUME K., ASAKAWA K., FUKUDA I., DEMURA H.** (1991) Repeated sc administration of recombinant human insulin-like growth factor-1 (IGF-1) to human subjects for seven days. *Growth Reg.*, 1, 23-28.
139. **IGNEY F.H., KRAMMER P.H.** (1999) Apoptosis - signals and diseases. *Biochimica*, 3, 24-27.
140. **INMAN W.H., COLOWICK S.P.** (1987) Growth factor stimulatoin of sugar uptake. *Methods Enzymol.*, 146, 399-402.
141. **INOUE H., OTSU K., YONEDA M., KIMATA K., SUZUKI S., NAKANISHI Y.** (1986) Glycosaminoglycan sulfotransferase in human and animal sera. *J. Biol. Chem.*, 261, 4460-4469.

142. JACOB C., MAACHI F., EL FARRICHA O., DOUSSET B., BELLEVILLE F., NABET P. (1993) The role of the kidney in the expression of low molecular weight growth factors (LMW-GF) activity. *Clin. Nephrol.*, 39, 327-334.
143. JACOB C., HUBERT J., MAACHI F., PUNGA-MAOLE A., DOUSSET B., JUNKE E., BELLEVILLE F. (1995) Role of the kidney in the production of a low molecular weight growth factor (MW < 1000 Da) : Experimental study in the pig. *Renal Failure*, 17, 339-347.
144. JACOB R., BARETT E., PLEWE G., FAGIN K.D. , SHERWIN R.J. (1989) Acute effects of insulin-like growth factor I on glucose and aminoacid metabolism in the awake fasted rat: comparison with insulin. *J. Clin. Invest.*, 83, 1717-1723.
145. JACOTOT E., FERRI K.F., KROEMER G. (2000) Apoptosis and cell cycle: distinct checkpoints with overlapping upstream control. *Pathol. Biol.*, 48, 271-279.
146. JANSEN M., VAN SCHAIK F.M.O, VAN TOL H., VAN DEN BRANDE J.L., SUSSENBACH J.S. (1985) Nucleotide sequences of cDNAs encoding precursors of human insulin-like growth factor II (IGF2) and IGF2 variant. *FEBS Lett.*, 179, 243-246.
147. JEFFREY I.W., PAIN V.M. (1993) Stimulation by insulin of protein synthesis in cultured chick embryo fibroblasts. *Biochimie*, 75, 791-796.
148. JENSEN E.C., Van ZIJL P., EVANS P.C., HARDING J.E. (2000) Effect of IGF-1 on serine metabolism in fetal sheep. *J. Endocrinol.*, 165, 261-269.
149. JONES J.I., CLEMMONS D.R. (1995) Insulin-like growth factors and their binding proteins : biological actions. *Endocri. Rev.*, 16, 3-34.
150. JUNG Y., MIURA M., YUAN J. (1996) Suppression of interleukin-1 beta converting enzyme mediated cell death by insulin-like growth factor. *J. Biol. Chem.*, 271, 5112-5117.
151. JUUL A., BANG P., HERTEL N.T., MAIN K., DALGAARD P., JORGENSEN K., MULLER J., HALL K., SKAKKEBACK N.E. (1994) Serum insulin-like growth factor-I in 1,030 healthy children, adolescents and adults: relation to age, sex, stage of puberty, testicular size and body mass index. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 78, 744-752.

152. KABURAGI Y., SATOH S., TAMEMOTO H. YAMAMOTO-HONDA R., TOBE K., VEKI K., YAMAUCHI T., KONO-SUGITA E. , SEKIHARA H. , AIZAWA S., CUSHMAN S.W., AKANUMA Y., YAZAKI Y., KADOWAKI T. (1997) Role of insuline receptor, substrate-1 and PP60 in the regulation of insulin induced glucose transport and GLUT 4 translocation in primary adypocytes. *J. Biol. Chem. J.*, 272, 25839-25844.
153. KALETO M., RUTTER W.J., MILLER A.D. (1990) Over expression of the human insulin-like growth factor I receptor promotes ligand dependent plastic transformation. *Mol. Cell Biol.*, 10, 464-473.
154. KALLINCOS N.C., WALLACE J.C., FRANCIS G.L., BALLARD F.J. (1990) Chemical and biological characterization of chicken insulin-like growth factor II. *J. Endocrinol.*, 124 (1), 89-97.
155. KANG. J.X., LI Y., LEAF A. (1997) Manose-6-phosphate/insulin-like growth factor-II receptor is a receptor for retinoic acid. *RNA S*, 94 (25), 13671-13676.
156. KIESS W., GREENSTEIN L.A., WHITE R.M., LEE L., RECHLER M.M., NISSLEY S.P. (1987) Type II insulin-like growth factor receptor is present in rat serum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 7720-7724.
157. KIESS W., KRESSLER U., SCHMITT S. FUNK B. (1993) Growth hormon and insulin-like growth factor 1 in human and experimental diabetes. Flyvbjerg A., Orskov H., Alberti G. (Eds) New-York Wiley, pp 1-22.
158. KIND K.L., OWENS J.A., LOK F., ROBINSON J.S., QUINN K.J., MUNDY L., GILMOUR R.S., OWENS P.C. (1996) Intravenous infusion of insulin-like growth factor I in fetal sheep reduces hepatic IGF1 and IGF2 mRNAs. *Am. J. Physiol.*, 276, (6 pt2) R1632-R1637.
159. KIRBY C.J. ,THATCHER W.W., COLLIER R.J., SIMMEN F.A., LUCY M.C. (1996) Effect of growth hormon and pregnancy on expression of growth hormon receptor insulin-like growth factor-1 and insulin-like growth factor binding protein-2 and -3 genes in bovine uterus ovary and oviduct. *Biol. Reprod.*, 55, 996-1002.
160. KITA K., TOMAS F.M., OWENS P.C., KNOWLES S.E., FORBES B.E., UPTON Z., BALLARD F.J. (1996) Influence of nutrition on hepatic IGF-I mRNA levels and plasma concentration of IGF-I and IGF-II in meat type chickens. *J. Endocrinol.*, 149, 181-190.
161. KNIGHT A.B., RECHLER M.M., ROMANUS J.A., Van OBBERGHEN, SCHILLING E.E., NISSLEY S.P. (1981) Stimulation of glucose incorporation and amino-acid transport by insulin and an insulin-like growth factor in fibroblasts with defective insulin receptors cultured from a patient with leprechaunism/. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 78, 2554-2558.

162. KODAVAKI T., YAMAUCHI T., TOBE K., UEKI K., TAMEMOTO H., KABURAGI Y., YAMAMOTO-HONDA R., TUSHIMA T., YAZAKI Y. (1998) Signal transduction mechanism and growth hormone. *In* Molecular mechanisms to regulate the activities of insulin-like growth factors. K. TAKANO, N. HIZUKA, N. TAKAHASSI SI (eds), Elsevier Science B.V. pp 279-290.
163. KOJIMA I., MOGAMI H., OGATA E. (1992) Oscillation of cytoplasmic free calcium concentration induced by insulin-like growth factor-I. *A m. J. Physiol.*, 262, E307-E311.
164. KOJIMA I., MOGAMI H., SHIBATA H., OGATA E. (1993) Role of calcium entry and protein kinase C in the progression activity of insulin-like growth factor-1 in Balb/C 3T3 cells. *J. Biol. Chem.*, 268, 10003-10006.
165. KOPPLE J.D., DING H., GAO X.L. (1995) Altered physiology and action of insulin-like growth factor 1 in skeletal muscle in chronic renal failure. *Am. J. Kidney Dis.*, 26, 248-255.
166. KORNFELD S. (1992) Structure and function of the mannose 6-phosphate/insulin like growth factor II receptors. *Annu. Rev. Biochem.*, 61, 307-330
167. KROEMER G., ZAMGAMI N., SUSIN S.A. (1997) Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol. Today*, 18, 44-51.
168. KULIK G, KLIPPEL A., WEBER M.J. (1997) Antiapoptotic signaling by the insulin-like growth factor I receptor, phosphotidyl inositol 3-kinase and Akt. *Mol. Cell Biol.*, 17, 595-606.
169. KUPFER S.R., UNDERWOOD L.E. BAXTER R.C. CLEMMONS D.R. (1993) Enhancement of the anabolic effects of growth hormone and insulin-like growth factor-1 by the use of both agents simultaneously. *J. Clin. Invest.*, 91, 391-396.
170. KUZUYA H., MATSUURA N., SAKAMOTO M., MAKINO H., SAKAMOTO Y., KADOWAKI T., SUZUKI Y., KOBAYASHI M., AKAZAWA Y., NOMURA M., YOSHIMASA Y., KASUGA M. (1993) Trial of insulin-like growth factor I therapy for patients with extreme insulin resistance syndromes. *Diabetes*, 42, 696-705.
171. LAAGER R., NINNIS R., KELLER U. (1993) Comparison of the effects of recombinant human insulin-like growth factor-1 and insulin on glucose and leucine kinetics in humans. *J. Clin. Invest.*, 92, 1903-1909.
172. LAMBRIS J.D. (1993) The chemistry, biology and phylogeny of C₃. *In* Complement Today (Eds Cruse J.M., Lewis R.E. Karger) , pp 16-45.

173. LAMOTTE F. (1989) Caractérisation et purification de facteurs de petit poids moléculaire à activité mitogénique. Thèse de Doctorat du 3ème Cycle, Université Henry-Poincaré, Nancy-1.
174. LAMSON G., GIUDICE L.C., ROSENFELD R.G. (1991) IGF binding proteins: structural and molecular relationships. *Growth factors*, 5, 19-28.
175. LARON Z., ERSTER B., KLINGER B., ANIN S. (1988) Effect of acute administration of insulin-like growth factor I in patients with Laron-type dwarfism. *Lancet*, 2, 1170-1172.
176. LARON Z., KLINGER B., JENSEN J.T., ERSTER B. (1991) Biochemical and hormonal changes induced by one week of administration of rIGF-1 to patients with Laron type dwarfism. *Clin. Endocrinol.*, 35, 145-150.
177. LARON Z., ANIN S., KLIPPER-AURBACH Y., KLINGER B. (1992). Effects of insulin-like growth factor on linear growth, head circumference, and body fat in patients with Laron-type dwarfism. *Lancet*, 39, 1258-1261.
178. LARSSON O., LATHANI C., ZICKERT P., ZETTERBERG A. (1989) Cell cycle regulation of human diploid fibroblasts : possible mechanisms of platelet derived growth factor. *J. Cell. Physiol.*, 139, 477-483.
179. LAU M.N.H., STEWART C.E.H., LIU Z., BHATT H., ROTWEIN P. STEWART C.I. (1994) Loss of the imprinted IGF2/cation independent mannose-6-phosphate receptor results in fetal overgrowth and perinatal mortality. *Genes Dev.*, 2953-2963.
180. LAVAN B.E, FANTIN U.R., CHANG E.T., LANE W.S., KELLER S.R., LIENHARD G. (1997a) A novel 160 kDa phosphotyrosine protein in insulin treated embryonic kidney cells is a new member of the insulin receptor substrate family. *J. Biol. Chem.*, 272, 21403-21407.
181. LAVAN B.E., LANE W.S., LIENHARD G. (1997b) The 60 kDa phosphotyrosine protein in insulin-treated adipocytes is a new member of the insulin receptor substrate family. *J. Biol. Chem.*, 272, 11439-11443.
182. LE BOUC Y. (1992) Insulin-like growth factors structure, fonction regulation. In Baud L. ed. Mediateurs : Aspects moléculaires et physiopathologiques, Paris Pradel, pp 75-86.
183. LE BOUC Y. (1996) Biologie des IGF. In Maladie de la croissance. Médecine Thérapeutique, 2, 22-31.

184. **LE GOOD J.A., ZIEGLER W.H., PAREKH D.B., ALESSI D.R., COHEN P., PARKER P.J.** (1998) Protein kinase C isotypes controlled by phosphoinositide 3-kinase through the protein kinase PDK1. *Science*, 281, 2042-2045.
185. **LENNARD S.N., STEWART F., ALLEN W.R.** (1995) Insulin-like growth factor II gene expression in the fetus and placenta of the horse during the first half of gestation. *J. Reprod. Fertil.*, 103, 169-3179.
186. **LeROITH D., WERNER H., BEITNER-JOHNSON D., ROBERTS C.T.** (1995) Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. *Endocrinol. Rev.*, 16, 143-163.
187. **LeROITH D.** (1997) Insulin-like growth factors. *N. Engl. J. Med.*, 336, 9, 633-640.
188. **LeROITH D, KOVAL A.P., BUTLER A.A., YAKAR S., KARAS M., STANNARD B.S., BLAKESLEY V.A.** (1998) The insulin-like growth factor 1 receptor and cellular signaling: implications for cellular proliferation and tumorigenesis. In *Molecular mechanisms to regulate the activities of insulin-like growth factors*. K. TAKANO, N. HIZUKA, N. TAKAHASSI SI (Eds), Elsevier pp 285-290.
189. **LI S., FERBER H., MIURA M., BASERGA R.** (1994) Mitogenicity and transforming activity of the insulin-like growth factor I receptor with mutations in the tyrosine kinase domain. *J. Biol. Chem.*, 269, 32558-32564.
190. **LIVNEH E., FISHMAN D.D.** (1997) Linking protein kinase C to cell cycle control. *Eur. J. Biochem.*, 248, 1-9.
191. **MAACHI F., STRACZEK J., JACOB C., BELLEVILLE F., NABET P.** (1995) A seric low molecular weight factor modulates IGFs effects on chick cartilage metabolism. *Life Sci*, 56, 2273-2284.
192. **MAASSEN J.A., Van Der ZON G.C.** (1990) Coupling of insulin-responsive glucose transport to receptors for insulin-like growth factor 1 in primary human fibroblasts. *Eur. J. Biochem.*, 190, 553-557.
193. **MAILE L.A., HOLLY J.M.** (1999) Insulin-like growth factor binding protein (IGFBP) proteolysis: occurrence, identification, role and regulation. *Growth Horm. IGF Res.*, 9, 85-95.
194. **MALOZOWSKI S., STADEL B.** (1994) Risks and benefits of insulin-like growth factors. *Ann. Intern. Med.*, 121, 549.
195. **MALVEN P.V., HEAD H.H., COLLIN R.J., BUONOMO F.C.** (1987) Periparturient changes in secretion and uptake of insulin and in concentration of insulin and insulin-like growth factors in milk of dairy cows. *J. Dairy Sci*, 70, 2254-2265.

196. MARTE B.M., DOWNWARD J., DEPREZ J. (1997) Connuting phosphoinositide 3-kinase to cell survival and beyond. Phosphorylation and activation of heart 6 phosphofructokinase. 2 kinase by proteins kinase B and other kinases of the insulin signaling cascade. *Trends Biochem. Sci.*, 22, 355-358.
197. MARTINELLI A.M., NERI L.M., GILMAN R.S., BARTER P.J., HUSKISSON N.S., MANZOLI F.R. (1991) Temporal changes in intracellular distribution of protein kinase C in swiss 3T3 cell during mitogenic stimulation with insulin-like growth factor 1 and bombesine: translocation to the nucleus following rapid changes in nuclear phosphoinositides. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 177, 480-487.
198. MARTELLI A.M., SANG N., BORGATTI P., CAPITANI S., NERI L.M. (1999) Multiple biological responses activated by nuclear protein kinase C. *J. Cell Biochem.*, 74, 499-521.
199. MATSUDA M., HASIMOTO Y., MUROYA K. HASEGAWA H., KMATA T., TANAKA S., NAKAMURA S., HATTORI S. (1994) CRK protein binds to two guanine nucleotide-releasing proteins for the Ras family and modulates nerve growth factor-induced activation of Ras in PC12 cells. *Mol. Cell Biol.*, 14, 5495-5500.
200. MAVROIDIS M., SUNYER O.S., LAMBRIS J.D. (1995) Isolation, primary structure and evolution of the third component of chicken complement and evidence for a new member of the $\alpha 2$ macroglobulin family. *J. Immunol.*, 1511, 2134-2174.
201. Mc CARTHY T.L., JI C., casinghino S., CENTRELLA M. (1998) Alternate signaling pathways selective regulate binding of insulin-like growth factor I and II on fetal rat bone cells. *J. Cell Biochem.*, 68, 446-456.
202. Mc CUSTER R.H., COHICK W.S., BURBY W.H. CLEMMONS D.R. (1991) Evaluation of the developmental and nutritional changes in porcine insulin-like growth factor binding protein-1 and -2 serum level by immunoassay. *Endocrinology*, 129, 2631-2638.
203. Mc GUINNESS M.C., COGBURN L.A. (1990) Measurement of developmental changes in plasma insulin-like growth factor-I levels of broiler chicken by radioreceptor assay and radioimmunoassay. *General and comparative Endocrinol.*, 79, 446-458.
204. Mc MORRIS F.A., MC KINNON R.D. (1996) Regulation of oligodendrocyte development and CNS myelination by growth factors-prospects for therapy of demyelination disease. *Brain pathol.*, 6, 313-329.
205. Mc QUILLAN D.J., HANDLEY C.J., CAMPBELL M.A., BOLIS S., MILWAYS V.E., HERINGTON A.C. (1986) Stimulation of proteoglycan biosynthesis by serum and insulin-like growth factor I in cultured bovine articular cartilage. *Biochem. J.*, 240, 423-430.

206. **MIGNON A., ROUQUET N., JOULIN. V.** (1998) Les caspases, les protéases à cystéine de l'apoptose : un enjeu thérapeutique pour demain ? *Med. Sci*, 14, 9-17.
207. **MIGNOTTE B., ZAMZAMI N., petit P.X., VAYSSIERE J.L., KROEMER G.** (1998) Contrôle mitochondrial de l'apoptose : la mort cellulaire programmée est-elle apparue à la suite de l'avènement endosymbiotique à l'origine des mitochondries. *Med. Sci*, 14, 54-60.
208. **MINUTO F., DEL MONTE P., BARRECA A., ALAMO A., CARIOLA G., GIORDANO G.** (1988) Evidence for autocrine mitogenic stimulation by somatomedin C/insulin growth factor I on an established lung cancer. *Cancer Res.*, 48, 3716-3719.
209. **MOCHLY-ROSEN D.** (1995) Localization of protein kinase by anchoring proteins: a theme in signal transduction. *Science*, 268, 247-251.
210. **MONACO M.H., DONAVON S.M.** (1997) Moderate food restriction reduces serum IGF1 and alters circulating IGF binding protein profiles in lactating rats. *J. Endocrinol.*, 152, 303-316.
211. **MONOTTI S., SCHITCHITANO B.M., NERVI C., SCARPA S., LUCARELLI M., MOLINARO M., ADAMO S.** (1998) Vasopressin and insulin-like growth factors synergistically induce myogenesis in serum free medium. *Cell growth differ.* 9, 155-163.
212. **MORELL B., FROESCH E.R.** (1973) Fibroblasts as an experimental tool in metabolic and hormone studies. II Effects of insulin and non suppressible insulin-like activity (NSILA) on fibroblasts in culture. *Eur. J. Clin. Invest.*, 3, 119-123.
213. **MORGAN D.O., EDMAN J.C., STANDRING D.N., FRIED V.A., SMITH M.C., ROTH R.A., RUTTER W.J.** (1987) Insulin-like growth factor II receptor as a multifunctional binding protein. *Nature (Lond.)*, 301-307.
214. **MOSES A.C., NISSLEY S.P., SHORT P.A., RECHLER M.M., WHITE R.M., KNIGHT A.B., HIGA O.Z.** (1980) Increased levels of multiplication stimulating activity and insulin-like growth factor in fetal rat serum. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 77, 3649-3653.
215. **MOXLEY R.T., ARNER P., MOSS A., SKOTTNER A., FOX M., JAMES D., LIVINGSTON J.N.** (1990) Acute effects of insulin-like growth factor I and insulin on glucose metabolism in vivo. *Am. J. Physiol. (Endocrinol. Metab. 22)*, E561-E567.

216. MURPHY M.F., FELICE K., GAWEL M., GELINAS D., KRATZ R., LAI E., LANGE D., NATTER H., RUDNICKI S. (1995) Als/North America Myotrophin group. A double-blind, placebo controlled study of myotrophin (CEP-151) in the treatment of amyotrophie lateral sclerosis. *Am. Neurol. Ass. Abstr.*, 38, 335.
217. MYERS M.G. Jr, WANG L.M., SUN X., ZHANG Y., YENUSH L., SCHLESSINGER J., PIERCE J.H., WHITE M.F. (1994) Role of IRS-1-GRB-2 complexes in insulin signaling. *Mol. Cell Biol.*, 14, 3577-3587.
218. NERI L.M., BILLI A.M., MANZOLI L., RUBBINI S., GILMOUR R.S. COCCO L., MARTELLI A.M. (1994) Selective nuclear translocation of protein kinase C alpha in Swiss 3T3 cells treated with IGF-I, PDGF and EGF. *FEBS Lett.*, 347, 63-68.
219. NICKERSON T., HUYNH H., POLLAK M. (1997) Insulin-like growth factor binding protein-3 induces apoptosis in MCF7 breast cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 237, 690-693.
220. NICOLETTI I., MIGLIORATI G., PAGLIACCI M.C., RICCARDI C.A. (1991) A rapid simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J. Immunol. Methods*, 139, 271-280.
221. NISHIKAWA K., TOKER A., JOHANNES F.J., SONGYANG Z., CANTLEY L.C., (1997) Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *J. Biochem. Chem.*, 272, 952-960.
222. NISHIZUKA Y. (1986) Studies and perspectives of protein kinase C. *Science*, 233, 305-312.
223. NISHIZUKA Y. (1988) The heterogeneity and diffirential expression of multiple species of the protein kinase C. *Biofactors*, 1, 17-20.
224. NISHIZUKA Y. (1992) Intracellular signaling by hydrolysis of phospho lipids and activation of protein kinase V. *Science*, 258, 607-614.
225. NISHIZUKA Y. (1995) Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J.*, 9, 484-496.
226. NURASAWA K., NAKAMURA T. SUZUKI K., MATSIOKA Y., LEE L.J. TANAKA H., SEINO Y. (1995) The effects of recombinant human insulin-like growth factor (rhIGF)-1 and rhIGF-1/IGF binding protein-3 administration on rat osteopenia induced by ovariectomy with concomittant bilateral sciatic neurectomy. *J. Bone Min. Res.*, 10, 18, 53-1864.
227. ODDY H.V., OWENS P.C. (1996) Insulin-like growth factor I inhibits degradation and improves retention of protein in hind limb muscle of lambs. *Am. J. Physiol.*, 276 (6 pt1) E 973-E982.

228. OESTERLE E.C., TSUE T.T., RUBEL E.W. (1997) Induction of cell proliferation in avian inner ear sensory epithelia by insulin-like growth factor I and insulin. *J. Comp. Neurol.*, 380, 262-274 Verifier
229. OH Y., MULLER H.L., NG L., ROSENFELD R.G. (1995) Transforming growth factor β induced cell growth inhibition in human breast cancer cells in mediated through insulin-like growth factor-binding protein - 3 action. *J. Biol. Chem.*, 270, 13589-13592.
230. OKADA T., KAWANO Y., SAKAKIBARA T., HAZEKI O., UI M. (1994) Essential role of phosphatidylinositol 3-kinase in insulin-induced glucose transport and antilipolysis in rat adipocytes. Studies with a selective inhibitor wort-mannin. *Oncogene*, 269, 3568-3573.
231. OWENS J.A., KIND K.L., CARBONE F., ROBINSON J.S., OWENS P.C. (1994) Circulating insulin-like growth factors I and II and substrates in fetal sheep following restriction of placental growth. *J. Endocrinol.*, 140, 5-13.
232. PAHLAM S., MEYERSON G., LINDGREN E., SCHALLING M., JOHANSSON I. (1991) Insulin-like growth factor I shifts from promoting cell division to potentiating maturation during neuronal differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 88. 9994-9998.
233. PAO C.I., FARMER P.K., BEGOVIC S., VILLAFUERTE B.C., WU G.J., ROBERTSON D.G., PHILLIPS L.S. (1993) Regulation of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and IGF binding protein gene transcription by hormones and provision of amino acids in rat hepatocytes. *Mol. Endocrinol.*, 7, 1561-1568.
234. PARKER P.J. (1999) Inhibition of protein kinase C. Du we, can we and should we. *Pharmacol. Ther.*, 82, 263-267.
235. PESSIN J.E., BELL G.I. (1992) Mammalian facilitation glucose transporter family: structure and molecular regulation. *Annu. Rev. Physiol.*, 54, 911-930.
236. PETLEY T., GRAFF K., JIANG W., YANG H., FLORINI J. (1999) Variation among cell types in the signaling pathways by which IGF-1 stimulate specific cellular responses. *Horm. Metab. Res.*, 31, 70-76.
237. PHILLIPS L.S., HERRINGTON A.C., DAUGHADAY W.H. (1974) Somatomedin stimulation of sulfate incorporation in porcine costal cartilage discs. *Endocrinology*, 94, 856-863.
238. PIERSON R.W., TEMIN H.M. (1972) The partial purification from calf serum of a fraction with multiplication stimulating activity for children fibroblasts in cell culture and with non-suppressible insulin-like activity. *J. Cell Physiol.*, 79, 319-330.

239. **POLLA B.S., BANZET N., DALL'AVA, ARRIGO A.P., VIGNOLA A.M.** (1998) Les mitochondries, carrefour entre vie et mort cellulaire : rôles des HSP et conséquence sur l'inflammation. *Med. Sci*, 14, 18-25.
240. **PROSSER C.G., MCLAREN R.D.** (1992) Insulin-like growth factor binding protein of equin serum. *Biochem Biophys. Res. Commun.*, 189, 1255-1260.
241. **QUIN J.D., FISHER B.M., PATERSON K.R., INOUE A., BEASTALL G.H., McCUISSH A.C.** (1990) Acute response to recombinant insulin-like growth factor I in a patient with Mendenhall's syndrome. *N. Engl. J. Med.*, 323, 1425-1426.
242. **QUIN X., STRONG D.D., BAYLINK D.J., MOHAN S.** (1998) Structure-function analysis of the human insulin-like growth factor binding protein K. *J. Biol. Chem.*, 273, 23509-23516.
243. **RAJOELINA J.** (1987) Essai de purification et de caractérisation d'un facteur de croissance de petits poids moléculaire à partir de fractions sanguines humaines (FCPPM). Thèse de Doctorat de l' Université Henry Poincaré, Nancy I.
244. **REA S., JAMES D.E.** (1997) Perspectives in diabetes moving Glut 4 the biogenesis and trafficking of Glut 4 storage vesicles. *Diabetes*, 46, 1667-1677.
245. **REBER K., LISKE R.** (1976) Radioimmunoassay for non suppressible insulin-like activity. *Hormone Res.*, 7, 201-213.
246. **REGINSTER J.Y., ZHENG S.X.** (1996) Interleukine 1 et métabolisme osseux. *La Revue du Praticien*, 46, 672-674.
247. **RESNICOFF M. ABRAHAM D., YUTANAWIBOONCHAI W., T-ROTMAN H.L., KAJSTURA J., RUBIN R., ZOLTOCK P., BASERGA R.** (1995) The insulin-like growth factor-I receptor protects tumor cells from apoptosis *in vivo*. 55, 2463-2469.
248. **RICCI J.E., AUBERGER P.** (1998) Récepteurs de surface et signaux intracellulaires impliqués dans la régulation de l'apoptose. *Immunoanal. Biol. Spec.*, 13, 339-349.
249. **RICE K.M., GARNER C.W.** (1994) Correlation of the insulin-like receptor substrate-1 with insulin responsive deoxyglucose transport in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 198, 523-530.
250. **RICE K.M., GARNER C.W.** (1999) IGF-1 regulates IRS-1 expression in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 255, 614-617.
251. **RINDERKNECHT E., HUMBEL R.E.** (1976) Polypeptides with non suppressible insulin-like and cell-growth promoting activities in human serum : isolation chemical characterization and some biological properties of form I and II. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 73, 2365-2369.

252. RINDERKNECHT E., HUMBEL R.E. (1978a) Primary structure of human insulin-like growth factor II. *FEBS Lett.*, 89, 283-286.
253. RINDERKNECHT E., HUMBEL R.E. (1978b) The aminoacid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. *J. Biol. Chem.*, 253, 2769-2776.
254. ROBINSON R.S., MANN G.E., GADD T.S., LAMMING G.E., WATHES D.C. (2000) The expression of the IGF system in the bovine uterus throughout the estrous cycle and early pregnancy. *J. Endocrinol.*, 165, 231-243.
255. RODRIGUEZ-TARDUCHY G. , COLLINS M.K., GARCIA I., LOPEZ-RIVAS A. (1992) Insulin-like growth factor-1 inhibits apoptosis in IL-3 dependent hemopoietic cells. *J. Immunol.*, 149, 535-540.
256. ROMAGNOLI E., MINISOLA S., CARNEVALE U. SCARDA A., ROSSO R., SCARNECCHIA L., PACITTI M.T., MAZZUOLI G. (1993) Effect of estrogen deficiency on IGF-I plasma levels : relationship with bone mineral density in perimenopausal women. *Calcif. tissue Int.*, 53, 1-6.
257. RON D., CHEN C.H., CALDWELL J., JAMIESON L., ORR E., MOCHLY-ROSEN D. (1991) Cloning of an intracellular receptor for protein kinase, a homolog of the beta subunit of G proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 91, 839-843.
258. RON D., KAZANIETZ M.G. (1999) New insights into the regulation of protein kinase C and novel phorbol ester receptors. *FASEB J.*, 13, 1658-1676.
259. RONGE H., BLUM J.W. (1988) Somatomedin C and other hormones in dairy cows around parturition, in newborn calves and in milk. *J. Anim. Physiol. Nutr.*, 60, 168.
260. ROSENFELD R.G., ROSENBLOOM A.L, GUEVARA-AGUIRRE J. (1994) Growth hormone (GH) insensitivity due to primary GH receptor deficiency. *Endocr. Rev.* 15, 369-390.
261. ROSENFELD R.G., ROSENBLOOM A.L., GUEVARA-AGUIRRE J. (1995) Use of recombinant IGF1 in syndromes of GH insensitivity. In GHRH, GH and IGF-1. Basic and clinical advances (Eds) Blackman M.R., Harman S.M. Roth J., Shapiro J.R. (Eds) Serono Symposia USA, Springer Verlag, New-York, 136-142.
262. ROTHE G., VALET G. (1994) Flow cytometric assays of oxidative activity in phagocytes. *Methods Enzymol.*, 233, 539-548.

263. RUSSEL-JONES D.L., UMPLEBY A.M., HENNESSY T.R., BOWES S.B., SHOJACE-MORADIE F., HOPKINS K.D., JACKSON N.C., KELLY J.M., JONES R.H., SONKSEN P.H. (1994) Use of leucine clamp to demonstrate that IGF-1 actively stimulates protein synthesis in normal humans. *Am. J. Physiol.*, 267 (Endocrinol/Metab. 30), E591-E598.
264. SALMON W.D., DAUGHADAY W.H. (1957) A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfates incorporation by cartilage *in vitro*. *J. Lab. Clin. Med.*, 49, 825-836.
265. SALMON W.D., DU VALL M.R. (1970) A serum fraction with « sulfatation factor activity » which stimulates « *in vitro* » incorporation of leucine and sulfate into protein polysaccharid complexes, uridine into RNA, and thymidine into DNA of costal cartilage from hypophsectomised rats. *Endocrinology*, 86, 721-726.
266. SANTOS F., OREGA G., REY C., GARCIA-VINCENT S., MALAGA S. (1991) Growth hormone metabolism in uremia. *Child. Nephrol. Urol.*, 11, 130-133.
267. SARA V.R., HALL K. (1990) Insulin-like growth factors and their binding proteins. *Physiol. Rev.*, 70, 591-614.
268. SASAOKA T, ISHIKIM., SAWA T. (1996) Comparison of the insulin-like growth factor 1 mitogenic intracellular signaling pathways. *Endocrinology*, 137, 4427-4434.
269. SCHAEFER F. (1995) Pathogenic mechanisms underlying the variable response to recombinant human growth hormone in children with chronic renal failure. *B.J.C.P.*, 85 (Suppl), 23-25.
270. SCHAEFER F., BAUMMANN G., HAFFNER D., FAUNT L.M., JOHNSON M.L., MERCADO M., RITZ E., MELHS O., VELDHUIS J.D. (1996) Multifactorial control of the elimination kinetics of unbound (free) growth hormone (GH) in the human regulatory by age, adiposity renal function and steady state concentrations of GH in plasma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 81, 22-31.
271. SCHIMPF R.M., DONNADIEU M. (1973) Quantitative determination of somatomedin in human serum. ³⁵S uptake by embryonic chick cartilage. *Biomedicine*, 19, 142-147.
272. SCHOENLE E.J., ZENOBI P.D., TORRESANI T., WERDER E.A., ZACHMANN M., FROESCH E.R. (1991) Recombinant human insulin-like growth factor I (rhIGF1) reduces hyperglycemia in patients with extreme insulin resistance. *Diabetologia*, 34, 675-679.
273. SCHRIEVER E., SCHMIDET A., BREITHARDT G., BUDDECKE E. (1996) Human recombinant insulin-like growth factors I and II. Stimulate the expression of basic fibroblast growth factor but suppress the division of bovine coronary smooth muscle cells. *Atherosclerosis*, 122, 255-263.

274. **SESSIONS S.B., EMLER C.A., SCHALCH D.S.** (1987) Interaction of insulin-like growth factor II with rat chondrocytes : receptor binding, internalization and degradation. *Endocrinology*, 12, 2108-2116.
275. **SHEPHERD P.R., WITHERS D.J., SIDDLE K.** (1998) Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insuling signalling. *Biochem J.*, 333, 471-490.
276. **SHIMASAKI S., LING N.** (1991) Identification and molecular characterization of insulin-like growth factor binding proteins (IGFBP-1, -2, -3, -4, -5 and -6). *Prog. Growth Factor Res.*, 3, 243-266.
277. **SIEGFRIED J.M., KASPRZYK P.G., TRESTON A.M., MULSHINE J.L., QUINN K.A., CUTTITA F.** (1992) A mitogenic peptide amide encoded within the E peptide domain of the insulin-like growth factor IB prohormone. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 89, 8107-8111.
278. **SIERADZKI J., FLECK H., CHATTERJEE A.K., SCHATZ H.** (1988) Stimulatory effect of insulin-like growth factor-I on [³H]-thymidine incorporation, DNA content and insulin biosynthesis and secretion of isolated pancreatic rat islets. *J. Endocrinol.*, 117, 59-62.
279. **SIEVERTSSON H., FRYKLUND L., UTHNE K., HALL K., WESTERMARK B.** (1975) Isolation and chemistry of human somatomedins A and B. *Adv. Metab. disor.* 8, 47-60.
280. **SIMMEN F.A. BADINGA L. GREEN M.L. KWAK I., SONG S., SIMMEN R.C.M.** (1998) The porcine insulin-like growth factor system : at the interface of nutrition growth and reproduction. *J. Nutr.*, 128, 315S-320S.
281. **SMITH W.J. UNDERWOOD L.E., CLEMMONS D.R.** (1995) Effects of caloric or protein restriction on insulin-like growth factor-I (IGFI) and IGF binding proteins in children and adults. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 80, 443-449.
282. **SONG D., ZHON W., SHEERIN S.H., SUCKS S.H.** (1998) Compartemental localisation of complement component transcripts in the normal human kidneys. *Nephron.*, 78, 15-22.
283. **SOOS M.A., FIELD C.E., SIDDLE K.** (1993) Purified hybrid insulin-like growth factor I receptors bind insulin-like growth factor I, but not insulin with high affinity. *Biochem. J.*, 290, 419-426.
284. **SOUROUJON M.C., MOCHLY-ROSEN D.** (1998) Peptide modulators of protein-protein interactions in intracellular signaling. *Nature Biotechnology*, 16, 919-924.

285. SPENCER E.M., CHAN K. (1995) A 3-dimensional model for the insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs); supporting evidence using the structural determinants of the IGF binding site on IGFBP-3. *Prog. Growth Factor Res.*, 6, 209-214.
286. SPICER L.J., HAMILTON T.D., KEEFER B.E. (1996) Insulin-like growth factor I enhancement of steroidogenesis of bovine granulosa cells and thecal cells : dependence on novo cholesterol synthesis. *J. Endocrinol.*, 15, 365-373.
287. STAUBLE B, BOSCOBOINIK D., TASINATO A., AZZI A. (1994) Modulation of activator protein-1 (AP-1) transcription factor and protein kinase C by hydrogen peroxide and DX tocopherol in vascular smooth muscle cells. *Eur. J. Biochem.*, 226, 393-402.
288. STAUDINGER J., ZHOU J., BURGESS R., ELLEDGE S.T., OLSON E.N. (1995) PIKC1: a perinuclear binding protein and substrate for protein kinase C isolated by the yeast two-hybrid system. *J. Cell. Biol.*, 128, 263-271.
289. STEVENSEN K.R., WATHES D.C. (1996) Insulin-like growth factors and their binding proteins in the ovine oviduct during the oestrus cycle. *J. Reprod. Fertil.*, 108, 31-40.
290. STEWART C.E.H., ROTWEIN P. (1996) Growth differentiation and survival : multiple physiological functions for insulin-like growth factors. *Physiol. Rev.*, 76, 1005-1026.
291. STILES C.D., CAPON G.T., SCHER C.D., ANTONIADES H.N., VAN WYK J.J. PLEDGER W.J. (1979) Dual control of cell growth by somatomedins and platelet derived growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 76, 1279-1283.
292. STOLTZ J.F., NABET P., BELLEVILLE F., STREIFF F., STRACZEK J., GESCHIER C., HEULIN M.H. (1985) Purification à l'échelle pilote de peptides à activité de croissance à partir de sous fractions de plasma humain. *Biosciences*, 4, 117-118.
293. STRACZEK J., HEULIN M.H., DOUSSET B., GESCHIER C., STOLTZ J.F., BELLEVILLE F., NABET P., ZAPF J. (1989) Purification and characterization on three molecular forms of somatomedins : insulin-like growth factors from human Cohn paste IV. Colloque INSERM, Stoltz JF, Rivat C., Libbey J. (Eds), London, 175, 115-122.

294. STRACZEK J., HEULIN M.H., CHENUT A.M., LASBENNES A., GESCHIER C., BELLEVILLE F., NABET P. (1990a) Purification and characterization on three molecular forms of insulin-like growth factors II from human Cohn paste IV. *J. Chromatogr. Biomed. Appl.*, 532, 237-248.
295. STRACZEK J., HEULIN M.H., DENOROY L, BARENTON B., BLANCHARD M., CHENUT A.M., CHARRIER J., MARTIAL J., BELLEVILLE F., NABET P. (1990b) Application of preparative high performance liquid chromatography to the purification of a fetal ovine insulin-like growth factors II. *J. Chromatogr. Biomed. Appl.*, 533, 35-46.
296. STRACZEK J., MAACHI F., LE NGUYEN D., BECCHI M., HEULIN M.H., NABET P., BELLEVILLE F. (1995) Purification from humans serum of a tetrapeptide that potentiates insulin-like growth factor-I activity in chick embryo cartilages. *FEBS Lett.*, 373, 207-211.
297. STRAUS D.S., TAKEMOTO C.D. (1990) Effect of dietary protein deprivation on insulin-like growth factor (IGF)-I and II binding protein-2 and serum albumin gene expression in rat. *Endocrinology*, 127, 1849-1860.
298. SUIKKARI A.M., BAXTER R.C. (1991) Insulin-like growth factor (IGF) binding protein-3 in pregnancy serum binds native IGF-1 but not iodo-IGF-1. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 73, 1377-1379.
299. SUN X.J., WANG L.M., ZHANG Y., YENUSH L., MYERS M.G., GLASHEEN E.J.R., LANE W.S., PIERCE J.H., WHITE M.F. (1995) Role of IRS-2 in insulin and cytokine signaling. *Nature (Lond.)*, 377, 173-177.
300. SUSIN S.A., LORENZO H.K., ZAMZAMI N., MARZO I., SNOW B.E., BROTHERS G.M., MANGION J., JACOTOT E., SNOW B.E., LOEFFLER M., LAROCLETTE N., GOODLETT D.R., AEBERSOLD R., SIDEROUSKI D.P., PENNINGER J.M., KROEMER G. (1999) Molecular characterization of mitochondrial apoptosis - inducing factor. *Nature (Lond.)*, 397, 441-446.
301. SUSSENBACH J., STEEBERGH P., HOLTHUIZEN P. (1992) Structure and expression of the human insulin-like growth factor genes. *Growth Reg.*, 2, 1-9.
302. TAKADA K., AMINO N., TADA H., MIGAI K. (1990) Relationship between proliferation and cell cycle dependent Ca^{2+} influx induced by a combination of Thyrotropin and insulin-like growth factor-1. *J. Clin. Invest.*, 86, 1548-1555.
303. TAKANO K., HIZUKA N., SHIZUME K. ASAKAWA K., FUKUDI I., DEMURA H. (1991) Repeated sc administration of recombinant human insulin-like growth factor-1 (IGF-I) to human subjects for seven days. *Growth Reg.*, 1, 23-28.

304. TARTAGLIA L.A., HARES T.M., WONG G.H., GOEDDEL D.V. (1993) A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell*, 74, 5, 845-853.
305. TAYLOR S.I. (1992) Molecular mechanisms of insulin resistance : lesson from patients with mutations in the insulin-receptor gene. *Diabetes*, 41, 1473-1490.
306. TENG K.K., LANDER H., FAJARDO J.E., HANAFUSA H., HEMPSTEAD B.L., BIRGE R.B. (1995) V-Crk modulation of growth factor-induced PCK cell differentiation involves the Svc homology 2 domain of V-Crk and sustained activation of the Ras/mitogen-activated protein kinase pathway. *J. Biol. Chem.*, 270, 20677-20685.
307. THIEBAUT N. (1992) Facteurs de croissance plasmatiques humains de petits poids moléculaire (< 1 000 Da/FCPPM) à activité mitogénique : étude des interactions FCPPM/IGF et modes d'action au niveau cellulaire. Thèse de Doctorat du 3^{ème} Cycle, Université Henry-Poincaré, Nancy-1.
308. TOULLEC D., PIANETTI P., COSTE H., BELLEVERGIUE P., GRAND-PERRET T., AJAKANE M., BAUDET V., BOISSIN P., BOURSIER E., LORIOLE F., DUHAMAE L., CHARON D., KIRILOVSKY J. (1991) The bisindolylmaleimide GF 109203X is a potent and selective inhibitor of protein kinase C. *J. Biol. Chem.*, 266, 15771-15781.
309. TRANQUE P.A., CALLE R., NAFTOLIN F., ROBBINS R. (1992) Involvement of protein kinase C in the mitogenic effect of insulin-like growth factor-1 on rat astrocytes. *Endocrinology*, 131, 1948-1954.
310. TROJAN J., JOHNSON T.R., RUDIN S.D., BLOSSEY B.K., KELLEY K.M., SHEVELEY A., ABDUL-KARIM F.W., ANTHONY D.D., TYKOCINNSKI M.L., ILAN J.U., ILAN J.O. (1992) Gene therapy of murine teratocarcinoma : separate functions for insulin-like growth factor I and II in immunogenicity and differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 89, 4874-4878.
311. TURKALJ I, KELLER U., NINNIS R., VOSMEER S., STAUFFACHER W. (1992) Effect of increasing dose of recombinant human insulin-like growth factor-I on glucose, lipid and leucine metabolism in man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 75, 1186-1191.
312. ULLRICH A., GRAY A., TAM A.W., YAN-FENG T., TSUBAKAWA M., COLLINS C., HENZEL W., LEBON T., KATHURIA S., CHEN E., JACOBS S., FRANCKE U., RAMACHANDRAN J., FUJITA-YAMAGUCHI Y. (1986) Insulin-like growth factor I receptor primary structure : comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity. *Embo J.* 5, 2503-2512.
313. UPTON Z., FRANCIS G.L., KITA K., WALLACE J.C., BALLARD F.J. (1995) Production and characterization of recombinant chicken insulin-like growth factor-II from Escherichia Coli. *J. Molecular Endocrinol.*, 14, 79-90.

314. **URS B., COPE D.L., KALLOO-HOSEIN H.E., HAYWARD A.C., WHITEHEAD J.P., O'RAHILLY S., SIDDLER K.** (1999) Difference in signaling properties of the cytoplasmic domains of the insulin receptor and insulin-like growth factor receptor in 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.*, 274, 30864-30873.
315. **VACCARELLO M.A., DIAMOND F.B.J., GUEVARA-AGUIRRE M.D.** (1993) Hormonal and metabolic effects and pharmacokinetics of recombinant insulin-like growth factor-1 in growth hormone receptor deficiency (GHRD)/ Laron syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 77, 273-280.
316. **VALVERDE A.M., TERNEL T., LORENZO M., BENITO M.** (1996) Involvement of Raf-1 kinase and protein kinase C in insulin-like growth factor 1 induced brown adipocyte mitogenic signaling cascades: inhibition by cyclic adenosine 3'5' monophosphate. *Endocrinology*, 137, 3832-3841.
317. **VALVERDE A.M., NAVARRO P., TERUEL T., CONEJO R., BENITO M., LORENZO M.** (1999) Insulin and insulin-like growth factor 1 up-regulate GLUT 4 gene expression in fetal brown adipocytes in a phosphoinositide 3-kinase-dependent manner. *Biochem. J.*, 337, 397-405.
318. **VAN DEN BRANDE J.L., DUCAJU M.V.L.** (1974) An improved technique for measuring somatomedin activity "in vitro". *Acta Endocrinol.*, 233-242.
319. **VAN WYK J.J., UNDERWOOD L.E., HINTZ R.E., CLEMMONS D.R., VOINA S.J., WEAVER R.P.** (1974) The somatomedins : a family of insulin-like hormones under growth hormone control. *Recent Prog. Horm. Res.*, 30, 259-295.
320. **VILLIERS C.** (1995) C3, protéine du complément une molécule aux multiples capacités. *M/S*, 11, 1419-1429.
321. **WALKER J., VAN WYCK J.J., UNDERWOOD L.E.** (1992) Stimulation of statural growth by recombinant insulin-like growth-1 in a child with growth hormone insensitivity syndrome (Laron type). *J. Pediatr.*, 121, 641-646.
322. **WERNER H., LeROITH D.** (1995) Insulin-like growth factor I receptor : structure, signal transduction, and function. *Diabetes Rev.*, 3, 28-37.
323. **WHITE M.F., KAHN C.R.** (1994) The insulin signaling system. *J. Biol. Chem.* 269, 1-4.
324. **WIDMER U., ZAPF J., FROESCH E.R.** (1982) Is extrapancreatic tumor hypoglycemia associated with elevated levels of insulin-like growth factor II ? *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 55, 833-839.
325. **WIDMER U., ZAPF J., FROESCH E.R.** (1983) Somatomedins and hGH activity. *Pediatr. Adolesc. Endocrinol.*, 12, 133-146.

326. WILLIS D.H., LIBERTI J.P. (1985) Post receptor actions of somatomedin on chondrocyte collagen biosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta*, 844, 72-80.
327. WILTON P. (on behalf of the Kabi Pharmacia study group). (1992) Treatment with recombinant insulin-like growth factor-1 of children with growth hormone receptor deficiency (Laron syndrom). *Acta Paediatr. Scand.* (Suppl.), 282, 137-141.
328. WOLF E., KRAMER R., BLUM W.F., FOLL J., BREM G. (1994) Consequence of postnatally elevated insulin-like growth factor-II in transgenic mice : endocrine changes and effects on body and organ growth. *Endocrinology*, 135, 1877-1886.
329. WRIGHT J.T., HAUSMAN G.J. (1995) Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) induced stimulation of porcine preadipocyte replication. *In Vitro Cell Dev. Biol.*, 31, 404-408.
330. WU Y., TEWARI M., CUI S., RUBIN R. (1996) Activation of the insulin-like growth factor-I receptor inhibits tumor necrosis factor induced cell death. *J. Cell Physiol.*, 168, 499-509.
331. YAMAMOTO H., MURPHY L.J. (1995) Enzymatic conversion of IGF-I to des(1-3) IGF-I in rat serum and tissues: a further potential site of growth hormone regulation of IGF-I action. *J. Endocrinol.*, 146, 141-148.
332. YAN L., LIKES H., Mc DIARMID H., WERNER J., ZAHRADKA P. (1999) Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) -dependent activation of pp42/44 mitogen- activated protein occurs independently of IGF-1 receptor kinase activation and IRS-1 tyrosine phosphorylation. *Eur. J. Biochem.*, 266, 1147-1157.
333. YANO K. A.M., BAUCHAT J.R., LIIMATTA M.B., CLEMMONS D.R., DUAN C. (1999) Down regulation of protein kinase C inhibits insulin-like growth factor-1 induced vascular smooth muscle cell proliferation, migration, and gene expression. *Endocrinology*, 140, 4622-4632.
334. YEDOVITZKY M., MOCHLY-ROSEN D., JOHNSON J.A., GRAY M.O., RON D., ABRAMOVITCH E., CERASI E., NESHER R. (1997) Translocation inhibitors define specificity of protein kinase C isoenzymes in pancreatic β cells. *J. Biol. Chem.*, 272, 1417-1420.
335. YEE D., PAIK S., LBOVIC G.S., MARCUS R.R., FAVONI R.E. , CULLEN K.J., LIPPMAN P.P., ROSEN N. (1989) Analysis of insulin-like growth factor I gene expression in malignancy: evidence for a paracrine role in human breast cancer. *Mol. Endocrinol.*, 3, 509-517.
336. YEH J., DANEHY F.T., OSATHANONDH R., VILLA-KOMAROFF L. (1991) mRNAs for insulin-like growth factor-II (IGF-II) and variant IGF-II are co-expressed in human fetal ovary and uterus. *Mol. Cell Endocrinol.*, 80, 75-82.

337. **YOUNG S.C., UNDERWOOD L.E., CELNIKER A., CLEMMONS D.R.** (1992) Effects of recombinant insulin-like growth factor-I (IGF-I) and growth hormone on serum IGF-binding proteins in calorically restricted adults. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 75, 603-608.
338. **YUEN E.C., MOBLEY W.C.** (1996) Therapeutic potential of neurotrophic factors for neurological disorders. *Ann. Neurol.*, 40, 346-354.
339. **ZANGLER I., ZAPF J., FROECH E.R.** (1987) Insulin-like growth factor I and II in 14 animal species and man as determined by three radioligand assays and two bioassays. *Acta Endocrinol. (Copenh)*, 104, 107-112.
340. **ZAPF J., KAUFMANN L., LIOGENMANN E.J., FROESCH E.R.** (1977) Determination of immunosuppressible insulin-like activity in human serum by a sensitive protein-binding assay. *Clin. Chem.*, 25, 677-682.
341. **ZAPF J., MORELL B., WALTER H., LARON Z., FROESCH E.R.** (1980) Serum levels of insulin-like growth factor (IGF) and its carrier proteins in various metabolic disorders. *Acta Endocrinol (Copenh.)*, 95, 505-5.
342. **ZAPF J., SCHMID C., FROESCH E.R.** (1984) Biological and immunological properties of insulin-like growth factors (IGF) I and II. *Clin. Endocrinol. Metab.*, 13, 3-30.
343. **ZENOBI P.D., JAEGGI-GROISMAN S.E., RIESEN W.F., RODER M.E., FROESCH E.R.** (1992a) Insulin-like growth factor-1 improves glucose and lipid metabolism in type 2 diabetes mellitus. *J. Clin. Invest.*, 90, 2234-2241.
344. **ZENOBI P.D., GRAF S., URSPRUNG H., FROESCH E.R.** (1992b) Effects of insulin-like growth factor-1 on glucose tolerance, insulin levels and insulin secretion. *J. Clin. Invest.*, 89, 1908-1918.
345. **ZINI N., MARTELLI A.M., NERI L.M., BAVELLONI A., SABATELLI P., SANTI S., MARALDI N.M.** (1995) Immunocytochemical evaluation of protein kinase C translocation to the inner nuclear matrix in 3T3 mouse fibroblasts after IGF-1 treatment. *Histochem. Cell Biol.*, 103, 447-457.
346. **ZUMSTEIN P.P., LUTHI C., HUMBEL R.E.** (1985) Amino-acid sequence of a variant pro-form of insulin-like growth factor II. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 82, 3169-3172.

PUBLICATIONS

Presence of Seric Low Molecular Mass Substances

With Growth Factor Activity in Serum of Mammals

M. Sarem, C. Jacob, J. Capiaumont, P. Franck, P. Habet and B. Dousse

Laboratory of Medical Biochemistry, School of Medicine, University Henri Poincare Nancy-I, PO Box 184, 54500 Vandoeuvre-les-Nancy-Cedex, France.

Running head : LOW MOLECULAR MASS GROWTH FACTORS IN MAMMALS.

Address of correspondence :

Brigitte Dousset, M.D., Ph.D.
Laboratory of Medical Biochemistry,
School of Medicine, University Henri Poincare Nancy-I,
54 500 Vandoeuvre-les-Nancy Cedex. France.
Tel : (33) 3 83 59 27 03. Fax : (33) 3 83 85 27 43

e mail : b.dousset@chu-nancy.fr

Acknowledgments. This work was supported by a grant of the Lorraine region.

ABSTRACT

1
2 Human serum contains ultrafiltrable factors (cut-off 1000 Da),
3 called low molecular weight growth factors (LMWGF), that modulate the
4 sulfation and mitogenic activity of serum retentates and insulin-like
5 growth factors (IGFs). Two of these factors, peptides that reproduce
6 the LMWGF effect, has been isolated: WGHE and HWESAS. We have looked
7 for LMWGF in the serum ultrafiltrates (UF) of several mammals: horse,
8 pig, cow, fetal bovine, sheep, rabbit, rat and mouse, using sulfation
9 and mitogenic tests. We have also measured the effect of UF
10 components on the activity of the corresponding retentate, or IGF1
11 and IGF2. Lastly we assayed the animal UF for HWESAS.

12 The UF from horse, cow, pig and FBS contained substances
13 that stimulated the sulfation and mitogenic activity in chick embryo
14 fibroblasts, either alone or in combination with serum retentates
15 (or IGF1 and IGF2). Sheep and rat serum UF contained substances that
16 strongly inhibited mitogenic activity in these cells. Rabbit UF was
17 without effect.

18 HWESAS was detected by ELISA in the UF of cow, fetal bovine,
19 horse and pig sera, but not in sheep, rat and rabbit UF. The presence
20 of HWESAS could explain , at least in part, the biological activities
21 of mammal UF.

22

23 **Key Words** : Growth Factor, peptides, IGF1, IGF2, mitogenic activity,
24 sulfation activity.

25

26

Introduction

27 The insulin-like growth factors (IGF1 and IGF2) are involved
28 in the growth and development of the whole organism (LeRoith, 1997)
29 as well as the differentiation in specific tissues and in tumori-

30 genesis (Zumkeller and Schwarb, 1999). Their actions are modulated by
31 factors present in the serum: the specific binding proteins IGFBPs,
32 growth hormone, thyroid hormones and nutrients such as zinc (Quin et
33 al., 1998; Devine et al., 1998). We have reported that *in vitro* the
34 sulfation activity of IGFs requires the presence of ultrafiltrable
35 factors found in human serum (cut-off 1000 Da). These factors have
36 been called low molecular weight growth factors, or LMWGF (Heulin et
37 al., 1981, 1987). LMWGF also have mitogenic activity and they
38 increase IGFs-stimulated DNA synthesis. Two peptides have been
39 isolated from human LMWGF, WGHE (Straczek et al., 1995) and HWESAS
40 (Dousset et al., 1998). They reproduce the effects of LMWGF. As IGFs
41 are present in all vertebrates and have very similar structure in all
42 mammals (Collet et al., 1998; Yandell et al., 1998), we postulated
43 that the sera of other mammals also contain LMWGF. We have therefore
44 looked for LMWGF in the serum of horses, pigs, cows, fetal bovines,
45 sheep, rabbits, rats and mice using the sulfation and mitogenic
46 tests. We have also studied the interactions of ultrafiltrate (UF)
47 components on the corresponding retentate, IGF1 and IGF2. Lastly, we
48 looked for the presence of HWESAS, already identified in human ultra-
49 filtrate, in animals UF.

50

51 Materials and methods

52 Blood samples

53 All blood samples were taken without anticoagulant. A pool
54 of human sera was prepared from samples collected from 100 males blood
55 donors (20 to 30 years old). Blood was obtained from the jugular of
56 horses, cows, pigs and sheep immediately after slaughtering, from
57 the ear vein of rabbits and by heart puncture for mice and rats. The
58 horses were about 4 years old, the cows about 2 years, the pigs and

59 sheep and rabbits 6-8 months and the mice and rats 2 months. The
60 horses, cows, pigs, sheep were declared healthy by the slaughterhouse
61 veterinarian; rabbit, mice and rats were reared under the laboratory
62 conditions recommended by French legislation. Blood samples were left
63 to clot at room temperature, centrifuged and the serum was immediately
64 ultrafiltered. Fetal bovine serum (FBS) was purchased from Boehringer
65 Gmbh (Manheim, Germany).

66 Samples were ultrafiltered in an Amicon cell (model 402) at a
67 pressure of 3 bar, with constant stirring at 4° C, through an Amicon
68 YM2 membrane (cut-off 1000 Da, Millipore, Bedford, MA, USA). Ultrafil-
69 tration was stopped when the retentate volume reached 1/3 of the
70 initial volume. The retentate was restored to its initial volume with
71 0.15 M NaCl and ultrafiltered again. This step was carried out three
72 times to remove most of molecules under 1000 Da. The ultrafiltrates
73 were treated with chloroform (v/v) for 24 h at 4° C with gentle
74 stirring to remove hydrophobic molecules. Ultrafiltrate (UF) and
75 retentate (R) were stored at -20° C in 3 ml aliquots until assays.

76 77 *Sulfation bioassay*

78 Sulfation activity was the ability of samples to promote the
79 incorporation of [³⁵SO₄] into proteoglycans in chick embryo cartilage
80 (Heulin et al., 1984). The chick cartilages were dissected and
81 incubated in minimum Eagle's medium (MEM, Bioproducts) supplemented
82 with Earle's salts, 2 mM glutamine, 200 IU/mL penicillin and 80 mg/mL
83 streptomycin, and buffered at pH 7.2 with 20 mM Hepes (Seromed).
84 Cartilages (8 for each assay) were incubated for 1 hour at 37° C in
85 medium alone, in medium supplemented with 5 % serum (v/v), with 5 %
86 (v/v), with 10 % UF (v/v) or with 5 % R plus 10 % UF. Then, 8 mL of
87 MEM containing 0.6 mg Na₂SO₄ and 37 kBq Na₂[³⁵SO₄] (specific activity

88 2.6 GBq/mmol, Amersham) were added to each assay and incubation
89 continued for another 20 h at 37° C in a circulating water bath.
90 The reaction was stopped by heating the cartilages at 100° C for 10
91 min. Cartilages were washed with a cold saturated Na₂SO₄ solution
92 overnight and rinsed 7 times with distilled water. Each cartilage was
93 solubilized in 400 µL Soluene (Packard, France) and the radioactivity
94 was counted.

95

96 *Mitogenic bioassay*

97 The mitogenic activity was evaluated by [³H]-thymidine
98 incorporation into the DNA of chick embryo fibroblasts. Fibroblast
99 cultures were established from 11 day-old chick embryo pelvic
100 cartilages treated with 0.2 mg/mL collagenase and 0.25 % (v/v)
101 trypsin (Boehringer). The fibroblasts were collected by centri-
102 fugation (800 g) and grown in MEM/Hepes (Seromed), pH 7.2
103 supplemented with 2 mM glutamine, 5 % no essential amino acids
104 (Bioproducts), 100 mg/mL streptomycin, 100 IU/mL penicillin and 10 %
105 fetal bovine serum (Boehringer). Cells (200 µL corresponding to
106 4 x 10⁴ cells/well), between the fifth and ninth passage, were seeded
107 in a 96-well microplate (Falcon-Becton). The cells were synchronized
108 into G₀/G₁ by culturing for 24 hours in serum-free medium, then
109 incubated with the samples to be tested for 24 hours. [³H]-thymidine
110 (0.037 MBq/well, specific activity 167 GBq/mM, Amersham) was added
111 for the last 6 hours of culture. Cells were washed twice with 0.15 M
112 NaCl and collected on TCA filters (Bio Whittaker) using a cell
113 harvester apparatus (Harvester titertek, Skarton). 1 mL Instafluor
114 (Packard, France) was added at each filter and the radioactivity was
115 counted. [³H]-thymidine incorporation was measured in cells incubated
116 in medium alone, in medium containing 5 % retentate, 2.5, 5 or 10 %

117 recombinant human IGF1 or IGF2 (Bachem Biochimie). The studies were
118 also performed with UF plus retentate or UF and IGF1 or IGF2.

119

120 *Immunoassay*

121 Anti-HWESAS monoclonal antibodies were prepared (Capiaumont et
122 al., 2000) and used in an ELISA to measure this peptide in serum
123 samples. Microtiter plates (96-well) coated with reactive N-
124 oxysuccinimide esters, referred to as NOS groups (Costar, Dutcher)
125 were coated overnight at 4° C with dilutions (from 5-100 μ M/L) of
126 synthetic HWESAS in bicarbonate buffer pH 9 to establish the
127 calibration curve. Other wells were coated with UF from different
128 species. No-specific binding sites were blocked by incubation with
129 20 g/L BSA in PBS at room temperature for 1 hour. Monoclonal
130 antibodies (2 mg/ well) were added to each well and incubated for
131 2 hours at room temperature. The wells were washed 5 times with
132 PBS 0.05 % Tween 20 and 100 μ L (diluted 1/2000) of goat Fab'2 anti-
133 mouse IgG labelled with 5 % horseradish peroxidase (Immunotech,
134 France) were added for 1 hour. The plates were washed 5 times with
135 PBS Tween and once with acetate buffer pH 6, incubated with 100 μ L
136 TMB [(tetra methyl benzidine) 100 mg/L in pH 6 buffer] and 4 μ L H₂O₂,
137 (110 Vol) for 10 minutes. The reaction was stopped by adding 25 μ L 4N
138 H₂SO₄. The absorbance was read at 450 nm.

139

140 *Statistical analysis*

141 The data are expressed as the mean of stimulation ratio (SR):
142 dpm assay/dpm of medium alone, of eight assays. Data were analysed
143 with Sigma Stat and the Unistat 4.0 Software. Student's-t test was
144 used for the experiments using only one UF concentration (10 %) alone
145 or in association with retentate (5 %). The sulfation and mitogenic

146 activities of this association for each species were compared to
147 those of retentate alone to show the effect of UF on retentate
148 activity.

149 One-way ANOVA was carried out to test the effect of ultra-
150 filtrate concentration (2.5, 5 and 10 %) for each of nine animal
151 species. Each concentration was considered to be a different
152 treatment. The R-squared values ≥ 0.90 confirm the validity of the
153 test. This validity was also tested by the normality and equal
154 variance tests of the population. If a significant outcome was
155 observed ($p < 0.05$), a Student-Newman-Keuls test (SNK) was used
156 to compare the group means. If the validity of Anova conditions was
157 not verified, a Kruskal-Wallis one-way analysis of variance was
158 performed. It was followed by a Dunn's test when the difference was
159 significant ($p < 0.05$). The activities of different UF concentra-
160 tions were compared to show the biological activity of each UF
161 species. The association of different UF concentrations with IGF1 and
162 IGF2 were compared for each species to illustrate the UF effect on
163 the IGFs mitogenic activities,

164

165

Results

Sulfation activity

167 All the sera tested had sulfation activity leading to a
168 significant [$^{35}\text{SO}_4$] uptake by the chick embryo cartilage compared to
169 medium alone (data not shown). All animal retentates increased
170 significantly [$^{35}\text{SO}_4$] incorporation compared to medium alone except
171 rabbit retentate. However, sulfation activity of retentate (5 % v/v)
172 was lower than that of total serum. Only horse UF (10 % v/v) had any
173 significant effect. The results of representative experiment are
174 shown in figure 1.

175 Retentate plus UF gave significantly more sulfation activity
176 than retentate alone for human, pig and FBS. Thus, these UF contain a
177 low molecular mass growth factor that interacts with the high
178 molecular mass growth factors present in the retentate. The rat UF
179 had a slight but not significant inhibitory effect (Fig. 1).

180

181 *Mitogenic activity*

182 Human, horse, cow, pig and mouse UF significantly stimulated
183 DNA synthesis, measured as [³H]-thymidine incorporation, with a dose
184 dependent response for pig and mouse UF (Fig. 2A). Sheep and rat UF
185 were inhibitory at all tested concentrations. FBS UF was mitogenic at
186 the lower tested concentration (2.5 %), but became inhibitory at
187 higher doses (5 and 10 %) (Fig. 2B).

188 All the animal retentates (5 % v/v) tested significantly
189 increased DNA synthesis. The activity varied from one species to
190 another. The stimulation ratio was 2 for rat retentate, to 6.5 for
191 FBS, and 7.5 for human retentate. A combination of horse, pig and
192 human UF (10 %) with their retentates (5 %) led to a mitogenic
193 activity significantly higher than that obtained with retentate
194 alone. Adding rat UF to its retentate inhibited totally retentate-
195 stimulated DNA synthesis, while FBS UF (10 %) partially inhibited the
196 mitogenic activity of the corresponding retentate. Adding cow and
197 rabbit UF to their respective retentates had no effect (Fig. 3).

198 Retentates contained high molecular mass growth factors; such
199 as EGF (epidermal growth factor), PDGF (platelet derived growth
200 factor), FGF (fibroblast growth factor) or IGF. We have shown that
201 the LMWGF in UF influence the biological activities of IGF1 and IGF2
202 (Heulin et al, 1987; Maachi et al., 1995), consequently we tested the
203 mitogenic effect of animal UF on human recombinant IGFs (rhIGFs). The

204 mitogenic response of chick embryo fibroblasts to rhIGF1 or rhIGF2
205 was a bell-shaped curve with maximal response at 15 ng/mL for rhIGF1
206 and 50 ng/mL for rhIGF2 (data not shown). These concentrations were
207 used in following experiments.

208 rhIGF1 (15 ng/mL) was tested alone and in association with
209 2.5, 5 and 10 % mammalian UF. The mitogenic activity of all these
210 associations were significantly different from that of IGF1 alone for
211 all species except cows and rabbits. The maximum response was
212 obtained with 10 % UF; only the data of a representative experiment
213 with this concentration are given (Fig. 4).

214 The mean stimulation ratio from independent experiments was
215 1.75 ± 0.05 (n = 9) for IGF1. The stimulation ratios of IGF1 plus UF
216 were 3.5 ± 0.12 (n = 3) for human, 2.5 ± 0.08 (n = 3) for horse,
217 2.26 ± 0.05 (n = 3) for pig and 2.10 ± 0.07 (n = 3) for mouse. The
218 difference from IGF1 was significant. FBS, sheep and rat UF signi-
219 ficantly decreased IGF1-stimulated DNA synthesis with SR of $0.69 \pm$
220 0.03 (n = 3), 0.70 ± 0.07 (n = 3) and 0.75 ± 0.08 (n = 3)
221 respectively.

222 rIGF2 (50 ng/L) was also tested alone and in association with
223 2.5, 5 and 10 % animal UF. The most representative response was also
224 obtained with 10 % UF (Fig. 5). The mean stimulation ratio for IGF2
225 was 1.59 ± 0.04 (n = 8). The SR of IGF2 in combination with UF was
226 3.16 ± 0.08 (n = 3) for human, 2.45 ± 0.15 (n = 3) for horse, $2.61 \pm$
227 0.17 (n = 3) for cow and 1.95 ± 0.09 (n = 3) for mouse. The
228 difference from IGF2 alone was significant. FBS, rat and sheep UF
229 also inhibited IGF2-stimulated DNA synthesis with SR 0.71 ± 0.04
230 (n = 3), 0.82 ± 0.07 (n = 3), and 0.87 ± 0.11 (n = 3) respectively,
231 whereas pig and rabbit UF had no effect on IGF2 mitogenic activity.

232

233 *Immunoassay of HWESAS in UF*

234 The concentration of HWESAS, one of the LMWGF isolated from
235 human UF, was 3-7 $\mu\text{M/L}$ in human ($n = 10$) and cow ($n = 3$), 30 $\mu\text{M/L}$ in
236 pig ($n = 3$), 7-40 $\mu\text{M/L}$ in horse ($n = 3$), and 2 $\mu\text{M/L}$ in fetal bovine
237 ($n = 3$) UF. HWESAS was not detected in sheep, rat and rabbit UF with
238 this assay.

239

240

Discussion

241 The IGFs are important because they regulate cell growth
242 and metabolism in variety of tissues, and they play a role in diffe-
243 rentiation and apoptosis (Jones and Clemmons, 1995; Guevara-Aguirre,
244 1996; LeRoith *et al.*, 1997; Hill and Pell, 1998). The somatomedins
245 (IGFs) were first known as sulfation factors and assayed in plasma
246 by measuring [^{35}S] incorporation into cartilage of various
247 species. However, the fact that highly purified or recombinant IGFs
248 have little effect on cartilage anabolism (Froesch *et al.*, 1976;
249 Maachi *et al.*, 1995), suggested that low molecular weight growth
250 factors (LMWGF) are eliminated during IGF purification (Heulin *et*
251 *al.*, 1981). We have shown the presence and activity of LMWGF in human
252 serum ultrafiltrate (cut-off 1000 Da) (Heulin *et al.*, 1987). As IGFs
253 are present in circulating blood of mammals, we have now looked for
254 LMWGF in mammalian serum by sulfation and mitogenic tests

255 Human LMWGF have little or no sulfation activity when they are
256 tested alone on chick embryo cartilage, but they increase the
257 sulfation activity of retentate and IGF1 (Maachi *et al.*, 1995). The
258 LMWGF are themselves mitogenic and they increase the stimulation of
259 DNA synthesis by serum retentate, IGF1 and IGF2. Horse, cow, pig and
260 mouse UF have all or some of these activities. The UF of FBS has
261 sulfation activity in association with corresponding retentates, but

262 it has an inhibitory effect on cell proliferation at a concentration
263 over 2.5 %, either alone or in combination with its retentate, IGF1
264 and IGF2. The UF of sheep and rat inhibit the mitogenic activity of
265 retentates, IGF1 and IGF2. Rabbit UF is without effect. Therefore,
266 some mammalian sera contain LMWGF in addition to the known molecular
267 mass growth factors (> 5 000 Da) such IGF, EGF and FGF.

268 It has been shown that LMWGF activity is not due to molecules
269 such as vitamins, amino acids or polyamines which have some mitogenic
270 activity. We identified two peptides in human UF : HWESAS and WGHE,
271 which produced the LMWGF effects (Strazeck et al., 1995; Dousset et
272 al., 1998). HWESAS was detected by a specific immunoassay, in human,
273 horse, FBS, pig and mouse UF. However the UFs containing HWESAS
274 behaved differently when tested in association with their retentates.
275 This may be due to the presence of factors in retentates, or (and)
276 ultrafiltrates.

277 The concentrations of IGFs in retentates vary according to
278 the mammal species (Zangler et al., 1987; Ozawa et al., 1995;
279 Lamberson et al., 1997). The retentates can also contain variable
280 proportions of other growth factors as EGF, PDGF, FGF. Proteolysis of
281 pro IGF1 and IGF2 produces fragments with mitogenic activity as E-
282 peptide (Tian et al., 1999). The IGFs are transported in the blood
283 linked to IGFBPs (IGF binding proteins), which can also account for
284 the observed discrepancy, because they contribute to free IGF
285 fraction which is considered to be the bioactive fraction. They also
286 exert ligand-independant stimulation or inhibition (Oh et al., 1998)
287 and they can generate proteolytic fragments capable of blocking IGF-
288 induced DNA synthesis (Zadeh and Binoux, 1997; Conover et al., 1998)

289 However these arguments cannot explain the observed difference
290 with recombinant IGF1 and IGF2. The sulfation and mitogenic

291 activities of UF are probably the result of a balance between
292 inhibitory and active factors. All UF were treated for 24 h with
293 chloroform before testing to remove hydrophobic inhibitors of
294 sulfation and mitogenic activity such as fatty acids, cortisol,
295 retinoic acid, which binds to IGF receptor type II and decreases
296 cell proliferation (Kang et al., 1997). However, there are also
297 water-soluble inhibitors like a 940 Da inhibitor found in the serum
298 of uremic human subjects (Phillips et al. 1990): rat serum contains a
299 glycoprotein that blocks the proliferation of rat hepatocytes (Boffa
300 et al., 1985). High concentrations of sulfates inhibit sulfation
301 activity (sulfate concentrations was about 30 mg/L in all UF except
302 for FBS UF, which contains 120 mg/L, data not shown). The sulfation
303 and mitogenic activity of UF is linked, at least in part, to the
304 presence of recently identified HWESAS. The concentration of this
305 peptide varies from species to species, which undoubtedly contributes
306 to the differences in our data. WGHE, the other active peptide, was
307 not measured in UF. The serum UF may also contain other peptides that
308 act with IGF, such as vasopressine (Monotti et al., 1998). The
309 relative concentrations of these inhibitors and activators in mammal
310 UF influence the measured biological activities.

311 In conclusion, some UF of mammal sera contain low molecular
312 weight growth factors that can increase the sulfation and mitogenic
313 activity of retentates, IGF1 and IGF2. This activity is linked, at
314 least in part, to the presence of the peptide HWESAS. This is
315 supported by the fact that UF devoid of HWESAS, such as sheep, rabbit
316 and rat do not have these biological activities.

317

318

Implications

319 Growth is a complex process involving pituitary growth
320 hormone, which stimulates synthesis of the IGFs. IGF2 regulates
321 growth in utero, whereas IGF1 stimulates the growth of bones and
322 cartilages in the post-natal period. LMWGF peptides also seem to
323 contribute to growth. However, further studies are necessary to
324 understand the molecular mechanism of their action and how they can
325 interface with the IGF system and contribute to a new approach to the
326 pathophysiologic of growth.

327

328

Literature Cited

329 Boffa, G.A., P.Lambin, E.Ruis, and C.Nadal. 1985. Effet inhibiteur
330 de l'alpha 2 macroglobuline humaine et d'un peptide libéré par la
331 trypsine sur la transition G1-S des hépatocytes *in vivo*. C.R. Acad
332 Sci Paris .T 300, série III.N° 2.p 31-36.

333 Capiaumont, J., Ch.Jacob, M.Sarem, P.Nabet, F.Belleville and
334 B.DOUSSET. 2000. Assay of a seric human hexapeptide (HWEASA) using a
335 monoclonal antibody and ELISA.Clinica Chimica Acta, 293: 89-103.

336 Collet, C., J.Candy , and V.Sara.1998. Evolutionary aspects of the
337 IGF system.In : K.Takano, N.Hizuka and S.I.Takahashi (Eds) Molecular
338 mechanisms to regulate the activities of insulin-like growth factors.
339 p 215-223. Elsevier, Amsterdam.

340 Conover, C.A.1998. IGFBP regulation by proteases. In : K.Takano,
341 N.Hizuka and S.I.Takahashi (Eds) Molecular mechanisms to regulate
342 the activities of insulin-like growth factors. p 107-114. Elsevier,
343 Amsterdam.

344 Devine, A., C.Rosen, S. Mohan, D.Baylint, R.L.Prince. 1998.
345 Effects of zinc and other nutritional factors on insulin-like growth
346 factors I and insulin-like growth factor binding proteins in
347 postmenopausal women. Am.J.Clin.Nutr. 68: 200-206.

- 348 Dousset, B., J.Straczek, F.Maachi, D.Le Nguyen, C.Jacob,
349 J.Capiaumont, P.Nabet and F.Belleville. 1998. Purification from human
350 plasma of a hexapeptide that potentiates the sulfation and mitogenic
351 activities of insulin-like growth factors. *Biochem. Biophys. Res.*
352 *Commun.* 247 : 587-591.
- 353 Froesch, E.R., J.Zapf, T.K.Andhya, E.Ben Porath, B.J.Segen and
354 K.D.Gibson. 1976. Non suppressible insulin-like activity and thyroid
355 hormone: major pituitary dependant sulfatation factors for chick
356 embryo cartilage. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.*73 : 2904-2908
- 357 Guevara-Aguirre, J. 1996. IGF-I. An important intrauterine growth
358 factor. *N.Eng.J.Med.* 335 : 1388-1391.
- 359 Heulin, M.H., M.Artur, D.Malaprade, J.Straczek, M.Pierson,
360 J.F.Stoltz, F.Belleville, P.Paysant, and P.Nabet. 1981. Evidence
361 for the presence in human serum of an ultrafiltrable factor
362 activating somatomedins. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 99 : 644-653.
- 363 Heulin, M.H., M.Artur, C.Geschier, J.Straczek, G.Vescovi,
364 F.Belleville, P.Paysant, and P.Nabet. 1984. The biological assay of
365 human somatomedin A : improvement by small molecular weight natural
366 molecules.*Acta Endocrinol.* 106 : 43-51.
- 367 Heulin, M.H., J.Rajoelina, M.Artur, C.Geschier, J.Straczek,
368 A.Lasbennes, F.Belleville, and P.Nabet. 1987. Isolation and
369 characterization of a low molecular weight growth promotion factor
370 from human plasma. *Life Sci.* 41 : 297-304.
- 371 Hill, R.A., and J.M.Pell. 1998. Regulation of insulin-like growth
372 factor I (IGF-I) bioactivity *in vivo* : further characterization of an
373 IGF-I enhancing antibody. *Endocrinology.* 139 : 1278-1287
- 374 Jones, J.I., and D.R.Clemmons. 1995. Insulin-like growth factors
375 and their binding proteins: Biological actions. *Endocr. Rev.* 16: 3-
376 34.

377 Kang, J.X., Y.Li, and A.Leaf. 1997. Mannose-6-phosphate / insulin-
378 like growth factor-II receptor is a receptor for retinoic acid.
379 Proc.Natl.Acad.Sci. USA. 94 : 13671-13676.

380 Lamberson, W.R., J.A.Sterle, and R.L.Mattei. 1996. Relationships
381 of serum insulin-like growth factor-II concentrations to growth,
382 composition and reproductive traits of swine. J.Anim.Sci. 74 : 1753-
383 1756.

384 LeRoith, D. 1997. Insulin-like growth factors. N.Engl.J.Med. 336 :
385 633-640.

386 Maachi, F., J.Straczek, C.Jacob, F.Belleville, and P.Nabet. 1995.
387 A seric low molecular weight factor modulates IGFs effects on chick
388 cartilage metabolism. Life Sci. 56 : 2273-2284.

389 Monotti, S., B.M.Scicchitano, C.Nervi, S.Scarpa, M.Lucarelli,
390 M.Molinaro, and S.Adamo. 1998. Vasopressin and insulin-like growth
391 factors synergistically induce myogenesis in serum-free medium. Cell
392 Growth Differ. 9 : 155-163.

393 Oh, Y., Y.Yamanaka, H.S.Kim, P.Vorwek, E.Wilson, V.Hwa, D.H.Yang,
394 A.Spagnoli, D.Wanek, and R.G.Rosenfeld. 1998. IGF-independent actions
395 of IGF-BPs. In : K.Takano, N.Hizuka and S.I.Takahashi (Ed) Molecular
396 mechanisms to regulate the activities of insulin-like growth factors.
397 p 125-133 . Elsevier, Amsterdam.

398 Ozawa, A., H.Inokuma, and T.Johke. 1995. The relationship between
399 plasma insulin-like growth factor-I (IGF-I) level and body weight in
400 the horse. J.Vet.Med.Sci. 57 : 1105-1107.

401 Phillips, L.S., A.C.Fusco, T.G.Unterman, and F.Del Greco. 1984.
402 Somatomedin inhibitor in uremia. J.Clin.Endocrinol.Metab. 59 : 764-
403 772.

- 404 Quin, X., D.O. Strong, D.J.Baylink, and S.Mohan. 1998. Structure-
405 function analysis of the human insulin-like growth factor binding
406 protein. *J.Biol.Chem.* 273 : 23509-23516.
- 407 Straczek, J., F.Maachi, D.Le Nguyen, M.Becchi, M.H.Heulin,
408 P.Nabet, and F.Belleville. 1995. Purification from human serum of a
409 tetrapeptide that potentiates insulin-like growth factor-I activity
410 in chick embryo cartilage. *FEBS Lett.* 373 : 207-211.
- 411 Tian, X.C., M.J.Chen, A.G.Pantschenko, T.J.Yang, T.T.Chen. 1999.
412 Recombinant E-peptide of pro IGF1 have mitogenic activity.
413 *Endocrinology.* 140 : 3387-3390.
- 414 Yandell, C.A., G.L.Francis, J.F.Wheldrake, and Z.Upton. 1998.
415 Purification, amino acid sequence and characterization of kangaroo
416 IGF-I. *J.Endocrinol.* 156 : 195-204.
- 417 Zadeh, S.M., and M.Binoux. 1997. The 16 kDa proteolytic fragment
418 of insulin-like growth factor (IGF) binding protein-3 inhibits the
419 mitogenic action of fibroblast growth factor on mouse fibroblasts
420 with target disruption of the type 1 IGF receptor gene.
421 *Endocrinology.* 138 : 3069-3072.
- 422 Zangler, I., J.Zapf, and E.R.Froesch. 1987. Insulin-like growth
423 factor I and II in 14 animal species and man as determined by three
424 radioligand assays and two bioassays. *Acta Endocrinol. (Copenh).* 104
425 : 107-112.
- 426 Zumkeller, W., and M.Schwarb. 1999. Insulin-like growth factor
427 system in neuroblastoma tumorigenesis and apoptosis: potential
428 diagnostic and therapeutic perspectives. *Horm.Metab.Res.* 31 : 138-
429 141.

Legends

430

431

432

433

434

435

436

437

438

439

440

441

442

443

444

445

446

447

448

449

450

451

452

453

454

455

456

457




Figure 1 : Representative sulfation activity of serum retentate (5 %)  ; ultrafiltrate (10 %)  and 5 % retentate plus 10 % UF  for different mammal species. The results are expressed as stimulation ratio (dpm assay / dpm medium alone). Each result is the mean \pm SEM of eight replicates. Results of retentate and UF are compared to results of medium alone by Student's t test * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ The results of association R + UF are compared to retentate $\star p < 0.05$. The horizontal line represents the activity of medium alone








Figure 2 : Mitogenic activity of mammal UF. The UF were tested at 0 , 2.5 , 5  and 10 %  v/v. The results are the mean \pm SEM of stimulation ratio (eight replicates). Data obtained with each UF are analysed by one-way ANOVA following by a Student-Newman-Keuls test (normal distribution) or Kruskal-Wallis following by Dunn's test. a, b, c and d are significantly different ($p < 0.05$) and $a > b > c > d$ for each UF group.

Figure 3 : Mitogenic activity of 5 % mammal retentates , 10 % UF  and 5 % R + 10 % UF  . The results are expressed as stimulation ratio. Each result is the mean \pm SEM of eight replicates. Retentates and UF were compared to medium by Student's t test ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (stimulatory effect); $\circ p < 0.05$, $\circ\circ p < 0.001$ (inhibitory effect). Association R 5 % + UF 10 % is compared to retentate by Student's t test. $\star p < 0.05$ (stimulation) $\bullet p < 0.05$ (inhibition). The horizontal line represents the activity of medium alone.

458

459 **Figure 4 : Mitogenic activity of IGF1 (15 ng/ml) 10 % UF**

460 IGF1 (15 ng/ml) + 10 % UF . The results are expressed as the mean

461 \pm SEM of stimulation ration (eight replicates). The data were analyzed

462 by one-way ANOVA following by Student-Newman-Keuls test (normal

463 distribution) or Kruskal-Wallis following by Dunn's test. a, b and c

464 are significantly different ($p < 0.05$) and $a > b > c$ for each group of

465 results. The horizontal line represents the activity of medium alone.

466

467 **Figure 5 : Mitogenic activity of IGF2 (50 ng/ml) 10 % UF**

468 IGF2 (50 ng/ml) + 10 % UF . The results are expressed as the mean \pm

469 SEM of stimulation ratio (eight replicates). The data were analyzed by

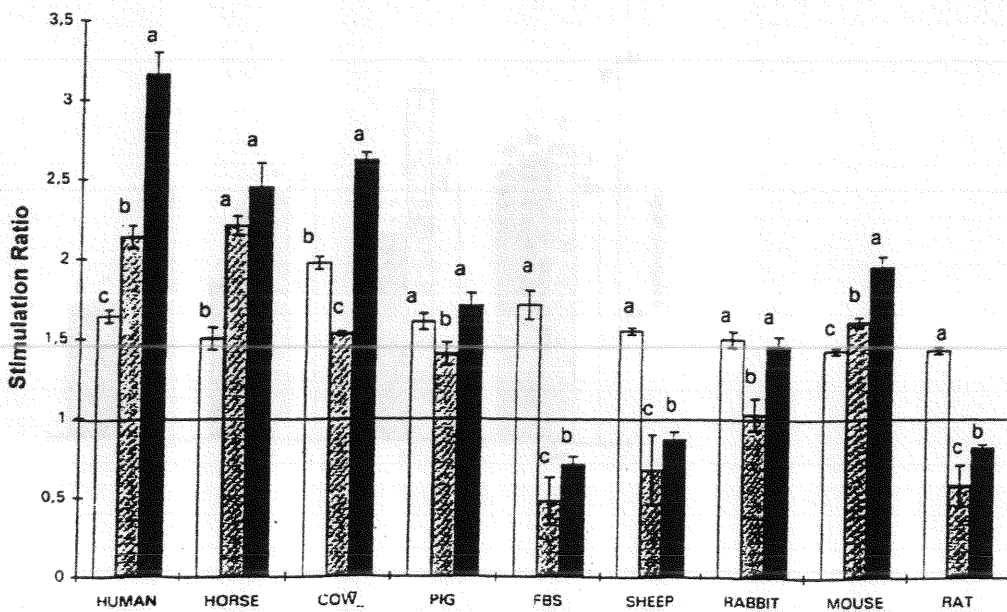
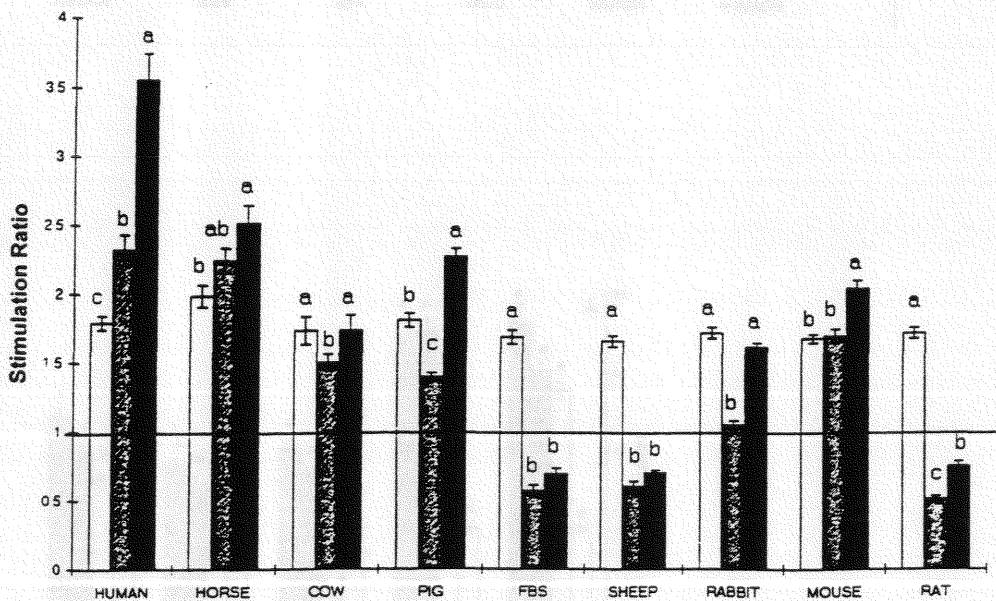
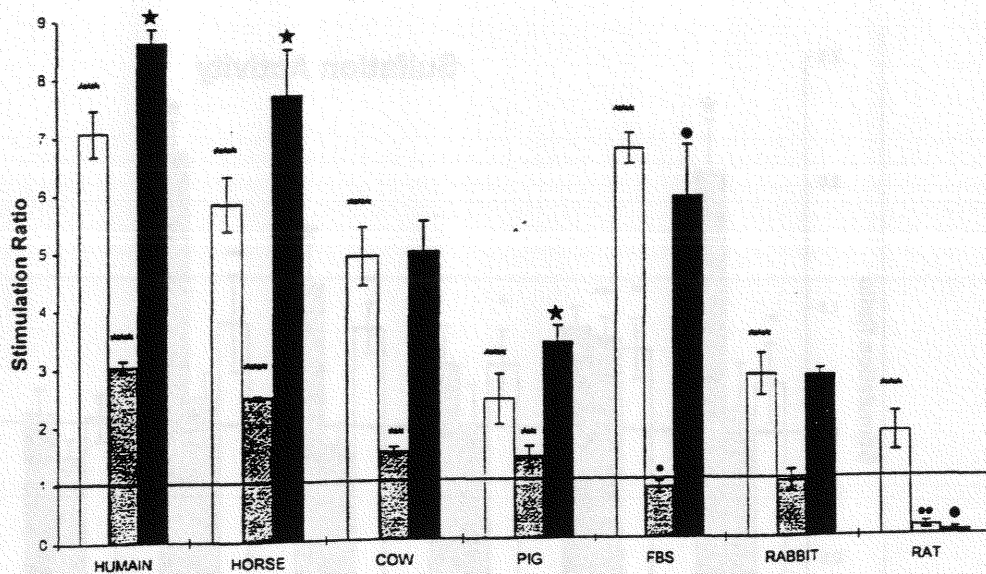
470 one-way ANOVA following by Student-Newman-Keuls test (normal

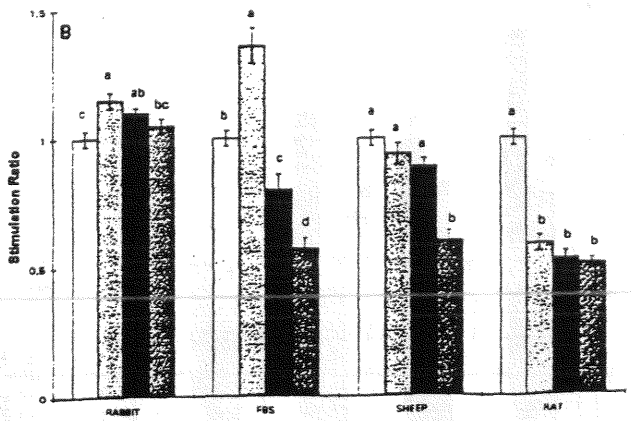
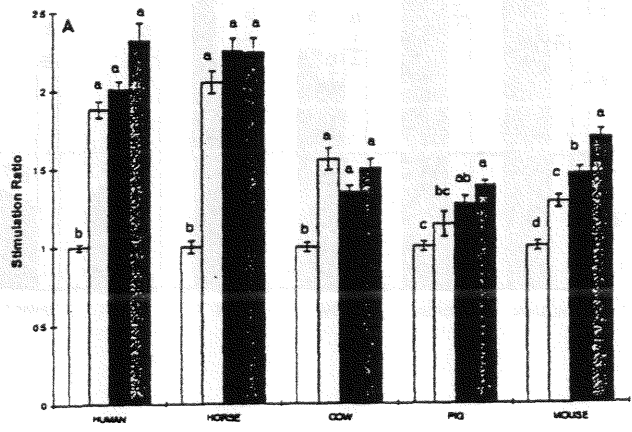
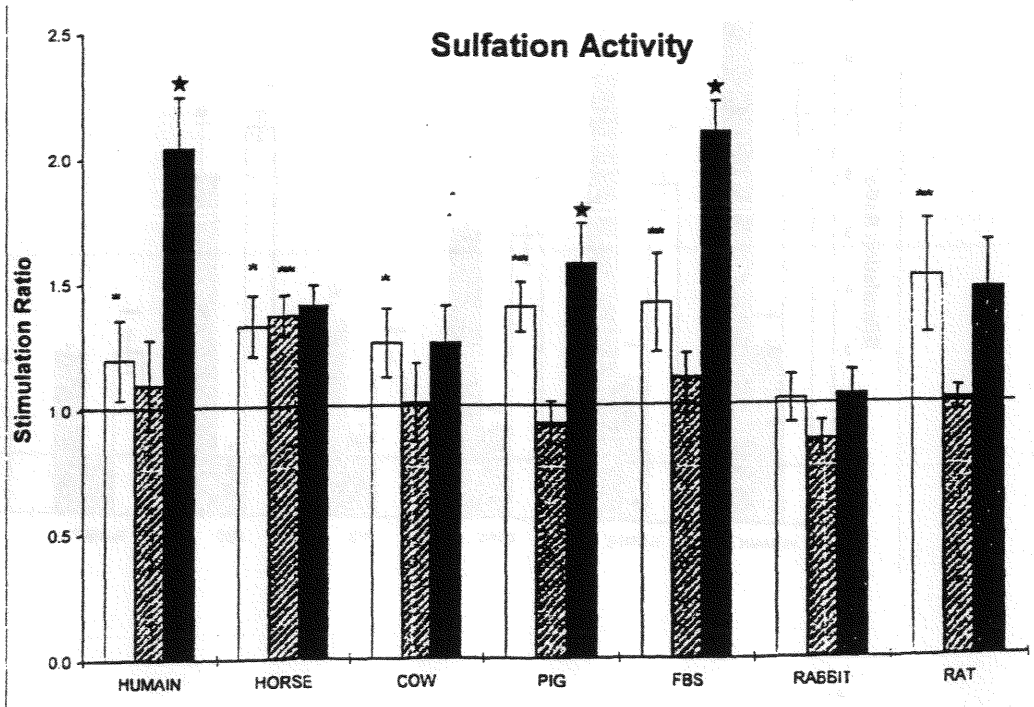
471 distribution) or Kruskal-Wallis following by Dunn's test. a, b and c

472 are significantly different ($p < 0.05$) and $a > b > c$ for each group of

473 results.

Mitogenic Activity





Horse

	RETENTATE	ULTRAFILTRATE
IONOGRAMME		
Sodium (mmoles/l)	159	115
Potassium (mmoles/l)	1.0	6.1
Chloride (mmoles/l)	125	97
Bicarbonates (mmoles/l)	2	15
Proteins totales (g/l)	65	0
Sulfates (mg/l)	/	34
SUBSTRATS		
Urea (g/l)	0.07	0.48
Glucose (g/l)	0.62	1.12
Creatinine (mg/l)	3	12
Calcium (mg/l)	105	8
Phosphore (mg/l)	84	4
Urique acidi (mg/l)	2	5
Cholesterol (g/l)	1.05	0
Triglycerides (g/l)	1	0
ENZYMES		
LDH (UI/l)	879	0
TGO (ASAT) (UI/l)	320	0
CPK (UI/l)	8	0
Alcaline phosphatases (UI/l)	209	0
γ Glutamyl Tranferase (UI/l)	841	0
Amylase (UI/l)	39	0
	7	0

Pig

	RETENTATE	ULTRAFILTRATE
IONOGRAMME		
Sodium (mmoles/l)	153	119
Potassium (mmoles/l)	0.8	10
Chloride (mmoles/l)	129	105
Bicarbonates (mmoles/l)	3	0
Proteins totales (g/l)	55	0
Sulfates (mg/l)	/	28
SUBSTRATS		
Urea (g/l)	0.04	0.33
Glucose (g/l)	0.09	0.78
Creatinine (mg/l)	3	14
Calcium (mg/l)	38	14
Phosphore (mg/l)	42	25
Urique acidi (mg/l)	1	0
Cholesterol (g/l)	0.74	0
Triglycerides (g/l)	0.30	0
ENZYMES		
LDH (UI/l)	965	0
TGO (ASAT) (UI/l)	45	0
CPK (UI/l)	29	0
CPK (UI/l)	5365	0
Alcaline phosphatases (UI/l)	160	0
γ Glutamyl Tranferase (UI/l)	12	0
Amylase (UI/l)	1050	0

Sheep

	RETENTATE	ULTRAFILTRATE
IONOGRAMME		
Sodium (mmoles/l)	160	129
Potassium (mmoles/l)	1.0	7.6
Chloride (mmoles/l)	130	110
Bicarbonates (mmoles/l)	2	21
Proteins totales (g/l)	43	0
Sulfates (mg/l)	/	36
SUBSTRATS		
Urea (g/l)	0.05	0.56
Glucose (g/l)	0.20	0.61
Creatinine (mg/l)	3	6
Calcium (mg/l)	67	7
Phosphore (mg/l)	63	12
Urique acidi (mg/l)	0	1
Cholesterol (g/l)	0.35	0
Triglycerides (g/l)	0.08	0
ENZYMES		
LDH (UI/l)	952	0
TGO (ASAT) (UI/l)	60	0
CPK (UI/l)	9	0
Alcaline phosphatases (UI/l)	480	0
γ Glutamyl Tranferase (UI/l)	562	0
Amylase (UI/l)	79	0
	10	0

Fetal bovine serum

	RETENTATE	ULTRAFILTRA
IONOGRAMME		
Sodium (mmoles/l)	148	133
Potassium (mmoles/l)	0.9	5.2
Chloride (mmoles/l)	125	106
Bicarbonates (mmoles/l)	2	20
Proteins totales (g/l)	42	0
Sulfates (mg/l)	/	120
SUBSTRATS		
Urea (g/l)	0.03	0.26
Glucose (g/l)	0.09	0.75
Creatinine (mg/l)	3	11
Calcium (mg/l)	41	33
Phosphore (mg/l)	13	82
Urique acidi (mg/l)	0	3
Cholesterol (g/l)	2.10	0
Triglycerides (g/l)	7.83	0
ENZYMES		
LDH (UI/l)	1320	0
TGO (ASAT) (UI/l)	35	0
CPK (UI/l)	4	0
Alcaline phosphatases (UI/l)	216	0
γ Glutamyl Tranferase (UI/l)	428	0
Amylase (UI/l)	18	0
	11	0

Assay of a seric human hexapeptide (HWESAS) using a monoclonal antibody and ELISA

Josette Capiamont, Christine Jacob, Mahrou Sarem, Pierre Nabet, Francine Belleville, Brigitte Dousset*

Laboratory of Medical Biochemistry, School of Medicine, Henri Poincaré Nancy I University, P.O. Box 184, 54505 Vandoeuvre-les-Nancy Cedex, France

Received 1 March 1999; received in revised form 21 October 1999; accepted 30 October 1999

Abstract

Human serum contains low-molecular-weight growth factors potentiating some in vitro biological effects of IGF-I and IGF-II and recently two peptides were mainly identified: HWESAS and WGHE. In order to determine seric HWESAS concentration, a specific monoclonal antibody against HWESAS was prepared. Its specificity was studied by inhibition tests: this antibody cross-reacts with Y-HWESAS, Cys-HWESAS. It does not react with HWESAS when its COOH is blocked, or with HWE, WGHE and tryptophan or with C3f (SSKITHRIHWESASLLR) which is a fragment of human complement containing HWESAS motif. Its affinity was measured by non competitive enzyme immunoassay ($3.89 \pm 2.44 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$). Then, this antibody was used in enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and the preliminary assays were performed to detect HWESAS in serum. In contrast to healthy subjects, patients with chronic renal failure exhibited undetectable concentration of hexapeptide while after successful renal transplantation values increased to reach levels found in healthy subjects and varying according to post-operative evolution. These data are a strong hint that the kidney plays an important role in the production of this hexapeptide and underly the clinical interest of HWESAS detection in renal pathology. © 2000 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Abbreviations: LMWGF, low molecular weight growth factors; Boc, *t*-butyloxycarbonyl protecting group; HF, hydrofluoric acid; BOP, benzotriazolylxtris dimethylamine phosphonium hexafluorophosphate; Ahx, hexanoic acid; Dnp, 2,4-dinitrophenyl; TFA, trifluoroacetic acid; KLH, keyhole limpet hemocyanin; BSAm, bovine serum albumin maleimide; FBS, fetal bovine serum; HAT, hypoxanthine-aminopterin-thymidine; TMB, 3,3',5'-tetramethylbenzidine; Mab, monoclonal antibody; K_{aff} , affinity constant; NOS, *N*-oxysuccinimide

*Corresponding author. Laboratory of Biochemistry, Nancy Medical School, 9 Avenue de la Forêt de Haye, BP 184 54505 Vandoeuvre les Nancy Cedex, France. Tel.: +33-3-8385-1357; fax: +33-3-8385-2743.

E-mail address: b.dousset@chu-nancy.fr (B. Dousset)

Keywords: Monoclonal antibody; Low molecular weight growth factor; ELISA; Kidney

1. Introduction

Insulin-like growth factors (IGF-I and -II) are produced in most tissues and circulate in the bloodstream bound to specific proteins (IGFBP). They are anabolic agents [1], which play an important complementary role in the regulation of carbohydrate metabolism [2]. It is also very well known that they exert actions on the proliferation as well as the differentiation of a variety of cells *in vitro* and *in vivo* [3] and, therefore, are involved in fetal and postnatal growth in animals and humans [4]. However these actions are modulated by various factors.

Heulin et al. [5] showed that human serum contains small peptidic factors, with molecular mass < 1000 Da, necessary to the expression of sulfation activity of IGF-I on chick embryo pelvic leaflets. These factors were evaluated by a bioassay [6], based on their ability to stimulate $^{35}\text{SO}_4$ incorporation into chick embryo cartilages in presence of IGF, and were also found to synergistically increase the IGF stimulatory activity on the proliferation of cells such as chick embryo fibroblasts or on the sensitivity to phytohemagglutinin of human lymphocytes [7]. According to these findings (molecular mass, biological activities), they were called low-molecular-weight growth factors or LMWGFs.

These LMWGFs have been purified from normal human plasma by ultrafiltration (cut-off 1000 Da), gel permeation chromatography followed by reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC). These peptides were characterized by Edman degradation as well as electrospray mass spectrometry. Thus, a tripeptide (HWE), two tetrapeptides (HWES, WGHE) and an hexapeptide (HWESAS) were isolated [8,9] and their identities were confirmed by electrophoretic migration.

Concomitantly, using sulfation bioassay, we demonstrated that LMWGF activity is related to kidney function in humans [10] and pigs since it disappeared from plasma only a few hours after nephrectomy to reappear very soon after a successful renal graft [11]. These observations suggest that such LMWGFs might be a precocious marker of graft rejection.

The bioassay being time consuming, we plan to set up an immunological assay and so we are focusing first on the HWESAS peptide. Homologous synthetic peptides, exhibiting biological activities similar to those of native peptides, were synthesized and the aim of this study was to produce specific murine monoclonal antibody to homologous synthetic HWESAS, suitable for use in enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) that allowed one to evaluate HWESAS concentration in human serum.

To our knowledge (data bank consultation: data bank Swiss PROT and PIR, Fastal Software), this HWESAS motif is present only in the third component of human complement C3 [12] and its fragment liberated during its catabolic degradation such as the fragment C3f (SSKITHRIHWESASLLR).

2. Materials and methods

2.1. Synthetic peptide assembly

The peptide synthesis was achieved by the solid-phase method according to a (Boc)-HF strategy using *t*-butylocarbonyl (Boc) and benzo triazolylotris dimethylamine phosphonium hexafluorophosphate (BOP) as the coupling reagent [13]. The peptides were assembled manually using appropriate starting 1% cross-linked chloromethylated resins. Hexapeptide HWESAS was elongated at the N-terminus with Ahx (aminohexanoyl) as the spacer and Cys for coupling to carrier-protein (Cys). The b peptidyl-resins obtained after peptide assembling were treated with thiophenol to remove the 2,4-dinitrophenyl group prior to the final HF cleavage. Purifications were achieved by HPLC: the crude products were injected onto a semi-preparative column (Merck Hibar, 250 × 25 mm, 10 mm beads) and eluted through a gradient using an acetonitrile–water mixture containing 0.1% TFA. Fractions of >95% purity as monitored by analytical HPLC were subjected to capillary electrophoresis and electrospray mass spectrometry, then lyophilized as the purified peptides.

2.2. Hapten–carrier conjugation

The immunization was performed with Cys–Ahx–HWESAS coupled to a maleimide activated keyhole limpet hemocyanin (KLHm, Pierce, Rockford, IL, USA). Cys–Ahx–HWESAS (2 mg in 200 μ l phosphate-buffered saline (PBS) was mixed with KLHm (2 mg in 200 μ l distilled water) and incubated for 3 h at room temperature and overnight at +4°C. BSA–Cys–Ahx–HWESAS was prepared in the same way and used for the first monoclonal antibody screening (BSAm, Pierce).

2.3. Quantitation of coupling ratio

The yield of peptide coupled to KLHm and BSAm was estimated by measuring free sulfhydryl groups with Ellman's Reagent (Pierce). The color intensity at 412 nm was compared to a standard curve prepared with various amounts of cysteine. The comparison of the hexapeptide solution absorbance before and after coupling allowed one to estimate the conjugation recovery.

2.4. Immunization and cell fusion

A group of nine Balb C mice, 6–8-weeks-old, were injected i.p. with 12.5, 25 or 50 μg KLH–Cys–Ahx–HWESAS in Freund's complete adjuvant. The mice were boosted on day 24 and day 35, with (i.p.) similar doses of antigen in Freund's incomplete adjuvant. The anti-hexapeptide antibodies in the sera were tested by ELISA with BSA_m–Cys–Ahx–HWESAS. Four days before the fusion, the mouse with the highest serum concentration was boosted with an intravenous injection of 50 μg KLH–Cys–Ahx–HWESAS in saline buffer. Hybridomas were prepared by standard techniques: cells of a non-secreting myeloma cell line P3 \times 63 Ag 8 653 [14] were fused with immune spleen cells (ratio 1/5) using 1 ml polyethylene glycol 1500 (Boehringer, Mannheim, Germany). The fused cells were suspended in HAT media (hypoxanthine-aminopterin-thymidine) for hybrid selection [15] and distributed into Costar microtiter plates (Corning Costar, Acton, MA, USA).

2.5. Immunoassay

Hybridomas were screened for monoclonal anti-hexapeptide antibodies by ELISA on 96-well microtiter plates coated with a layer of reactive *N*-oxisuccinimide esters, referred to as NOS groups, which are covalently linked to the polystyrene surface and thus cannot be washed off the plate (Corning Costar). At a slightly alkaline pH (pH 9), NOS groups react with primary amines to enable covalent attachment of peptides. The plates were coated with BSA–Cys–Ahx–HWESAS (0.2 μg per well in bicarbonate buffer, pH 9) for clone preselection then with HWESAS (2 μg per well in bicarbonate buffer, pH 9) for subsequent clone selection. Following saturation with BSA 20 g/l in PBS, supernatants (100 μl) were added to each well and incubated for 2 h at room temperature. After washing five times with PBS, 0.05% Tween 20, 100 μl (dilution 1/2000) goat Fab'2 anti-mouse IgG (H + L) labeled with 0.5% horseradish peroxidase (Immunotech, Marseille, France) was added to each well for 1 h. The plates were washed five times with PBS Tween and once with acetate buffer, pH 6. The substrate TMB (3,5,3',5'-tetramethylbenzidine, Merck, Darmstadt, Germany) (100 mg/l in buffer, pH 6) and 30% H_2O_2 (400 $\mu\text{l/l}$) were added for 10 min and the reaction was stopped by adding 25 μl 4.5 M H_2SO_4 . The absorbance was read at 450 nm.

2.6. Antibody production and purification

After four clonings, selected hybridoma was expanded by culture in 25 cm^2 , 75 cm^2 , 125 cm^2 flasks and in 300-ml spinner flasks. The supernatants were purified in the laboratory of Professor Bazin (Louvain University, Brussels,

Belgium) by affinity chromatography using a Sepharose 4 B column coupled with a Mab LO MG 1 13 (rat monoclonal antibody anti-mouse IgG1).

2.7. Specificity determination

The specificity of the anti-HWESAS antibody was examined by comparing the reactivity of the antibody towards free and conjugated HWESAS as well as related peptides: a tetrapeptide WGHE that also stimulated IGF activity [9], a tripeptide HWE, the heptadecapeptide C3f (SSKITHRIHWESASLLR) containing the sequence HWESAS [12], tryptophan that is an immunogenic amino acid common to all the peptides tested, Y-HWESAS, HWESAS-Y, BSA-HWESAS, Cys-HWESAS and HWESAS-Cys. A competitive inhibition ELISA was performed. Sequential 10-fold dilutions of free peptides (from 10 or 1 mmol/l to 1 pmol/l) were prepared in PBS. Volumes (200 μ l) of these solutions were distributed in polypropylene tubes and 200 μ l purified anti-HWESAS antibody (2 mg/l) was added. The tubes were incubated overnight at +4°C. Then the ELISA test was carried out as previously described with 100 μ l of the above mixture, in microtiter plates coated with BSA_m-Ahx-HWESAS.

2.8. Affinity determination

Beatty et al. [16] describe a method based upon the law of mass action. The use of serial dilutions of antibody results in a sigmoid curve of optical density (O.D.) versus logarithm of amount of antibody added to the wells. The O.D.₅₀ of sigmoid curves permits to measure monoclonal antibodies affinity constant (K_{aff}) in a non-competitive EIA (enzymatic immunoassay). We used this method with different coating concentrations of HWESAS (20, 10, 5, 2.5 mg/l in bicarbonate buffer, pH 9) plus 1/3 serial dilutions of monoclonal antibody in PBS (830 mg to 4 μ g/l). The ELISA test was continued as described above.

2.9. Immunoassay of human serum

The assays were performed on human serum ultrafiltrates (Centricon vials, 3000 Da cut-off) using an ELISA method and the sample values were read from a calibration curve. This calibration curve was prepared by successive dilutions of synthetic HWESAS in bicarbonate buffer, pH 9 (from 447 to 0.44 μ mol/l) that were used to coat microtiter plates overnight, at +4°C. Non specific binding sites in the wells were blocked by incubation with 20 g/l BSA in PBS at room temperature for 1 h and monoclonal antibodies (2 μ g/well) were added. The ELISA test was continued as described above.

Concerning evaluation of seric HWESAS concentration, other wells concomitantly were coated with ultrafiltrate prepared from samples of healthy subjects

and patients (100 μ l per well, overnight at +4°C). pH values of ultrafiltrate (ranging from 8.6 to 8.9) were nearly as much as pH value of coating buffer.

A recovery test was performed using known quantities of HWESAS (0.44 to 447 μ mol/l) added to serum ultrafiltrate of healthy subjects. Also, effects of high concentrations of substances present in serum of patients with renal failure such as creatinine (from 20 to 100 mg/l), urea (from 0.5 to 2 g/l) and uric acid (from 50 to 200 mg/l) were tested in combination with HWESAS (0.44 to 447 μ mol/l).

3. Results

3.1. Coupling ratio

The extent of peptide coupling was 87.4% with KLH and 96% with BSA.

3.2. Hybridoma selection

At day 7 after fusion, all the wells yielded hybrid cell colonies and cell supernatants were screened by immunoassay. In the first ELISA for clone preselection, 480 of the 8 \times 96 wells (60%) were positive with BSAm-HWESAS as wells coating, while only 182 wells (38%) were positive with HWESAS. The positivity was defined as an absorbance at 450 nm, 10-fold higher than that of control wells (blank), i.e., antibodies which bound to the immobilized antigen 10-fold more efficiently than to control wells were selected. Then, the 12 clones exhibiting the highest absorbance were subcloned by limiting dilution, screened four times and typed. All clones secreted IgG1K antibody (Mab isotyping, Becton Dickinson, San Diego, CA, USA). The most secreting clone (1-1-10-4) was expanded in spinner flasks. Four liters of supernatant were collected and purified leading to 40 mg of an anti-HWESAS antibody.

3.3. Specificity

Figs. 1 and 2 show the results of specific inhibition of the immunoassay by several peptides. HWESAS and Y-HWESAS inhibited the binding of the antibody to coated wells to comparable extents from 1 μ mol/l, whereas BSAm-HWESAS and Cys-HWESAS were active from 0.1 μ mol/l (Fig. 2). The tetrapeptide WGHE inhibited the binding only at 1 mmol/l (Fig. 1) while heptadecapeptide C3f (SSKITHRIHWESASLLR), tryptophan and HWE were inactive (Fig. 1) like HWESAS with C terminal COOH blocked by cysteine or tyrosine (Fig. 2).

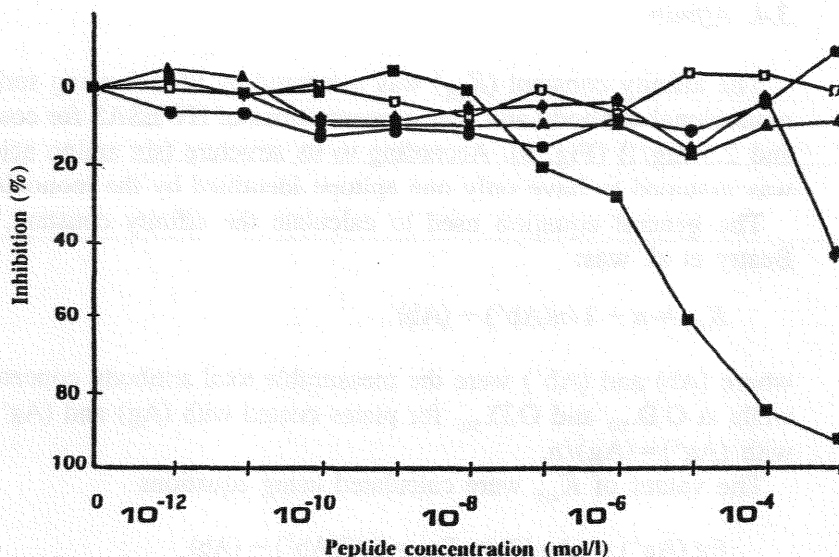


Fig. 1. Antibody specificity: inhibition of anti-HWESAS antibody binding by free peptides: ● HWE, ◆ WGHE, □ heptadecapeptide, ■ HWESAS and ▲ tryptophan at concentrations of mmol/l to pmol/l. (Results are expressed as percent inhibition).

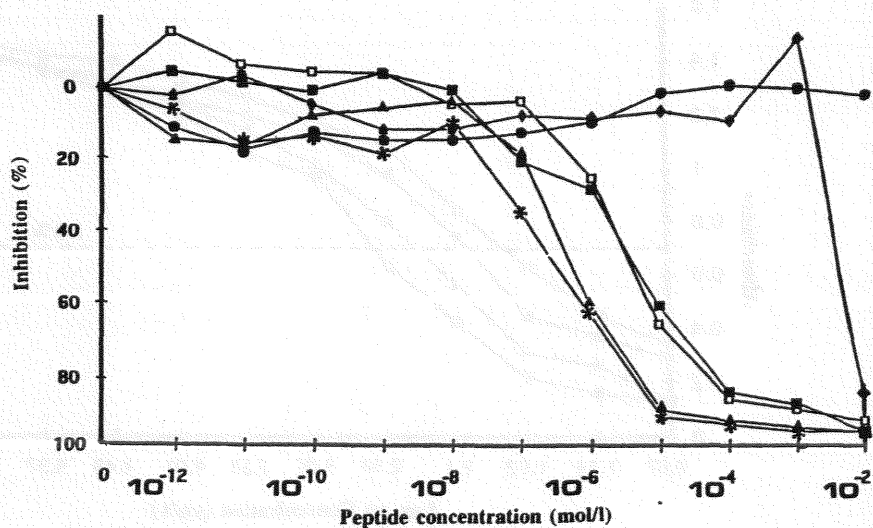


Fig. 2. Antibody specificity: inhibition of anti-HWESAS antibody binding by conjugated peptides: ● HWESAS-Cys, □ Y-HWESAS, ◆ HWESAS-Y, ■ HWESAS, ▲ BSAm-HWESAS and * Cys-HWESAS at concentrations of 10 mmol/l to pmol/l. (Results are expressed as percent inhibition).

3.4. Affinity

The affinity constant (K_{aff}) was measured by ELISA using serial dilutions of monoclonal antibody and four concentrations of HWESAS for coating (20, 10, 5 and 2.5 mg/l) (Fig. 3). According to its structure (six amino acids), HWESAS was assumed to have only one epitope identified by the monoclonal antibody.

The general equation used to calculate the affinity constant, adapted from Beatty et al. was:

$$K_{\text{aff}} = n - 1/n(\text{Ab}') - (\text{Ab})$$

where (Ab) and (Ab') were the measurable total antibody concentrations in the wells at O.D.₅₀ and O.D._{50'} for plates coated with (Ag) and (Ag') respectively, with (Ag')=(Ag)/n.

The values of K_{aff} were calculated using equations

$$\text{for } (\text{Ag}') = (\text{Ag}/2) > K_{\text{aff}} = 1/2(\text{Ab}') - (\text{Ab})$$

$$\text{for } (\text{Ag}'') = (\text{Ag}/4) > K_{\text{aff}} = 3/4(\text{Ab}'') - (\text{Ab})$$

$$\text{for } (\text{Ag}''') = (\text{Ag}/8) > K_{\text{aff}} = 7/8(\text{Ab}''') - (\text{Ab})$$

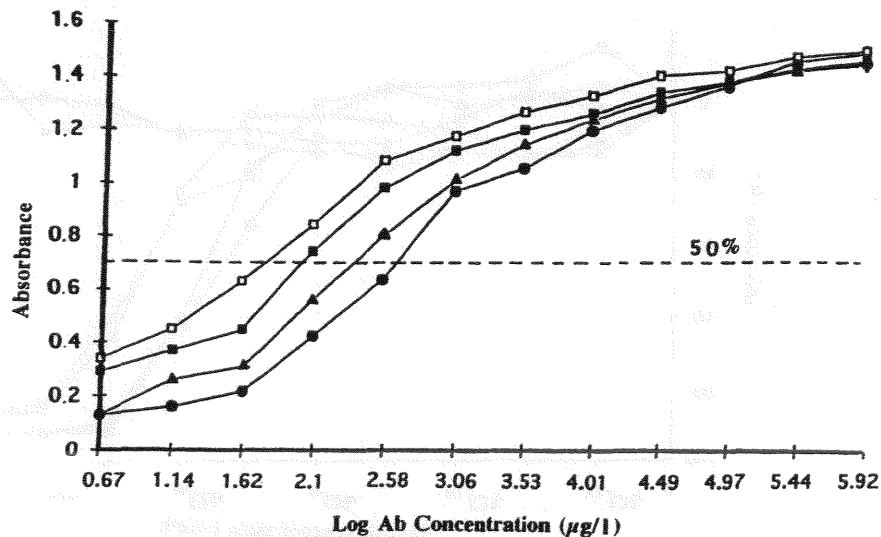


Fig. 3. Antibody affinity: ELISA curves for anti-HWESAS monoclonal antibody. Concentrations of HWESAS in coating solution were: □ 20, ■ 10, ▲ 5 and ● 2.5 mg/l and concentrations of monoclonal antibody ranged from 830 mg/l to 4 µg/l. Antibody concentrations at O.D.₅₀ were 66, 120, 282 and 501 µg/l, respectively.

The antibody concentrations at $O.D._{50}$ were 66, 120, 282 and 501 $\mu\text{g/l}$ and the value for $K_{\text{aff}} \pm \text{S.D.}$ was $3.89 \pm 2.44 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$.

3.5. Characteristics of immunoassay

The ELISA standard curve obtained with HWESAS concentrations ranging from 447 to 0.44 $\mu\text{mol/l}$ is presented in Fig. 4. The within-run ($n=10$) and between-run ($n=6$) precision, determined at low (1.4 $\mu\text{mol/l}$), intermediate (14 $\mu\text{mol/l}$) and high (140 $\mu\text{mol/l}$) concentrations of HWESAS, was characterized by coefficient of variations (S.D./mean) % from 5.3 to 10.3% and 6 to 12%, respectively.

The detection limit was estimated as 0.2 $\mu\text{mol/l}$. In the recovery test, assessed by addition of HWESAS to ultrafiltrate of healthy subjects, the percentages ranged from 92 to 107%. The overload of creatinine, urea and uric acid had no influence on the coating efficiency whatever the concentration of HWESAS tested. It was necessary to show the lack of interference of these substances with the ELISA, particularly in chronic renal failure where high levels of creatinine, urea and uric acid are noted.

3.6. Assay with human serum

The results of assays with ultrafiltrates obtained from healthy subjects used as controls, hemodialyzed patients and renal transplant recipients are given in Table

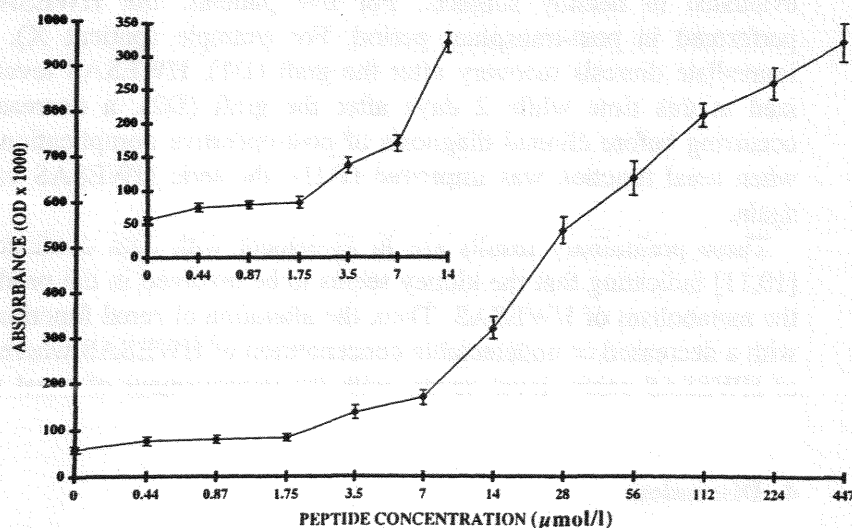


Fig. 4. ELISA standard curve with concentrations of HWESAS, ranging from 447 to 0.44 $\mu\text{mol/l}$, after successive dilutions in bicarbonate buffer, pH 9. (Results are expressed as mean \pm S.D.).

Table 1
Immunoassays of human serum ultrafiltrates from healthy subjects, hemodialyzed patients and renal transplant recipients^a

Groups	<i>n</i>	Creatinine	HWESAS
Healthy subjects	12	<12	1.36–5.44 (mean = 3.28)
Patients with chronic renal failure	5	32–82	<0.2–0.4
Hemodialyzed patients	20	43–113	<0.2–0.5
Renal transplant recipients with stable renal function	7	16–18	3.4–8.4
Renal transplant recipient: post operative follow up	5		
Patient X			
D1: immediate diuresis recovery		72	8.7
D2		55	0.8
D8: pyelocalyceal dilation and infection		40	<0.2
D21: improvement in renal function		20	2.9

^a Concentrations of HWESAS and creatinine are expressed in $\mu\text{mol/l}$ and mg/l , respectively.

1. In serum of chronic renal failure and hemodialyzed patients, HWESAS was not detected since absorbance was not significantly different from blank. The lack of influence of hemodialysis on HWESAS levels in blood was checked and our experiments showed no variation of HWESAS concentration in UF prepared from blood samples drawn in patients just before the beginning and at the end of hemodialysis. Renal transplant recipients, who exhibited a stable renal function and creatininemia $<18 \text{ mg/l}$, had HWESAS concentrations similar to that evaluated in healthy subjects. For five patients, the HWESAS assay was performed in post-transplant period. For example (patient X), following an immediate diuresis recovery after the graft (D1), HWESAS level was normalized at this time while 2 days after the graft (D2), a decrease was noted, occurring before clinical diagnosis of post-operative complications (D8). Then, when renal function was improved (D21), the seric HWESAS value increased again.

These preliminary results are in agreement with data obtained by bioassay [10,11] indicating that the kidney seems to be involved in the production and/or the metabolism of HWESAS. Then, the alteration of renal function is associated with a decreased or undetectable concentration of HWESAS whereas an increase of HWESAS serum level occurs with the improvement of renal function.

4. Discussion

Although some reports indicate that it is possible to immunize animals with short (6 to 35 residues) peptides without coupling them to macromolecular

carriers, antipeptide antibodies are usually raised by immunizing with peptide-carrier conjugates. The proteins most commonly used as carriers are KLH or BSA [17] and the coupling agents are glutaraldehyde [18], carbodiimide [19] or maleimide [20] depending on reactive groups. However, the use of a carrier presents a series of known drawbacks: (a) modifications of peptide or epitope which may occur by crosslinking reaction, (b) the epitope may be masked by the larger size of the carrier, (c) the instability of the conjugate [21], (d) the activity of the antigenic determinant present on the peptide may be affected by coupling [22].

Nevertheless, we conjugated HWESAS to KLH via the N-terminus whereas we did not succeed to obtain monoclonal antibodies by coupling the peptide via the C-terminus. Coupling on COOH gave very hydroscopic products and it is possible that this coupling did not stabilize the peptide sufficiently, the stiffening of the molecule being the condition to obtain antibodies [23].

Concerning the specificity of the purified antibody obtained, it recognized HWESAS, Cys-HWESAS and BSA-HWESAS. Also the peptide with a tyrosine at the NH₂ (Y-HWESAS) was recognized as the free peptide, this opens the possibility of labeling with ¹²⁵I for the development of a radioimmunoassay that might be more sensitive than the ELISA used. However, preliminary radioiodination of this peptide carried out using iodogen led to a loss of affinity probably due to its degradation. Inhibition experiments with synthetic peptides (HWESA, HWES, HWE) as well as amino acid such as serine (S) or tryptophan (W) demonstrated no cross-reactivity of antibody (data not shown). No significant inhibition of binding was observed with another peptide (WGHE) which was identified during the purification of LMWGF or with heptadecapeptide (SSKITHRHWESASLLR). In addition, peptides with blocked C terminus did not cross-react with monoclonal antibody suggesting that the antibody was directed towards C terminal sequence. Despite the well known difficulty to produce specific monoclonal antibodies against small peptides, the antibodies obtained in this work have a correct affinity and a good specificity available to develop an immunoassay.

Briand et al. [22] reported that many short peptides do not bind well to the microtiter plates used in solid-phase immunoassays and peptide conjugates are necessary to titrate the antisera in ELISA. We performed the ELISA test on amine plates. The N-oxysuccinimide (NOS) surface immobilizes antigens by forming stable amine bonds between the surface and the molecules. In this case, small antigens, that do not readily adsorb passively to polystyrene surfaces, may be successfully covalently immobilized to the NOS surface. Thus, Sondergard-Andersen et al. [23] have observed that angiotensins I and II, covalently attached, are five- to 10-fold more antigenically active than when adsorbed.

In the present study, preliminary assays were performed to detect HWESAS in human serum and data are in agreement with previous results obtained by

biological assay [10]: HWESAS is present in healthy subjects, it dramatically decreases or becomes undetectable in patients with chronic renal failure and reappears after successful kidney transplantation (at the same time or before the improvement of renal function. When a tubular nephropathy or an episode of acute rejection occurs after the graft, HWESAS disappears or diminishes again. Whilst these observations are a strong hint that the kidney plays an important role in the production of HWESAS, the precise origin of this hexapeptide as well as the mechanisms involved in its production and metabolism remain unknown.

Interestingly, the motif HWESAS exists only in the third component of human complement (C3) and two fragments (C3b and C3f) generated during activation and subsequent degradation of this molecule. Following the initial step of activation, the action on C3 of C3 convertase of either the classical or alternative pathway of complement, two fragments named C3a and C3b, respectively are released. Then, the fragment C3b is degraded by the factor I, in presence of the factor H, resulting in production of fragments C3bi and C3f [24]. Ganu et al. [12] demonstrated the physiological conversion of C3f by a seric carboxypeptidase N to the corresponding desArg derivative and also the presence of another derivative suggesting that C3f is degraded beyond the desArg form in serum. The internal cleavage of C3f, that seems independent of ongoing complement activation, could occur by possible enzymatic attack at focused sites between amino acids K and I or R and I. Therefore, it may be hypothesized that HWESAS represents a breakdown product of C3f from endopeptidase digestion.

Although chronic renal failure is often associated to an increase of various substances in serum, HWESAS concentration and bioactivity were found to be substantially reduced or absent. It is possible that amplification loop of alternative complement pathway contributes to this phenomenon, specially through accumulation of complement protein D. Indeed, this serine protease with enzymatic activity specific of complement factor C3b is essentially catabolized by the kidney [25] and its circulating active form, normal in structure and function, is increased by a factor of about 10 in chronic renal failure [26,27]. Such an excess of protein D enhances the alternative complement pathway, particularly in the circulation [28], leading to a reduction of C3b cleavage by both factors I and H which in turn accentuate the phenomenon by altering the physiological down regulation effect of C3b proteolysis on complement activation. The subsequent decrease of C3f production might contribute to that of hexapeptide observed in chronic renal failure. After a successful transplantation, the kidney may represent a significant source of extrahepatic C3 since various renal cell types are capable of producing this component of complement [29]. In addition, by removing accumulated protein D, the restoration of normal glomerular filtration may favor the formation of C3f and HWESAS.

These preliminary results suggest that the anti-HWESAS antibody will be suitable for seric evaluation of HWESAS, and that could be a marker of renal function and a prognostic factor in renal transplantation. Due to the ultrafiltration step performed in sample preparation molecules with high molecular mass such as IGF-I and IGF-II (about 7 kDa) are eliminated and the HWESAS concentrations obtained reflect the unbound form of hexapeptide which should be biologically active.

This is of particular interest since this peptide is required for certain biological activity of both IGF I and IGF II in vitro and might play a role in the IGF system. Also, these antibodies represent an useful tool in immunohistochemistry for elucidation of cellular and tissular production of HWESAS leading to a better understanding of its physiological as well as pathophysiological significance.

Acknowledgements

We wish to thank Dr. Frederic Jean and Dr. Christophe Barrande for their advice and for their gift of myeloma cells, Dr. Françoise Nisol and Professor Hervé Bazin for the purification of anti-HWESAS antibody. This work was supported by grants from the University Henri Poincare Nancy I, the Urban Community of the Grand Nancy and the Lorraine Region.

References

- [1] Zapf J, Schmid C, Froesch ER. Metabolic actions of insulin-like growth factors. In: Takano K, Hizuka N, Takahashi SI, editors, *Molecular mechanisms to regulate the activities of insulin-like growth factors*, Amsterdam: Elsevier, 1998, pp. 341–9.
- [2] Lewitt MS. Role of the insulin-like growth factors in the endocrine control of glucose homeostasis. *Diabete Res Clin Pract* 1994;23:3–15.
- [3] Jones JJ, Clemmons DR. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev* 1995;16:3–34.
- [4] Rechler MM, Nissley SP. Insulin-like growth factors: peptide growth factors and their receptors. In: Sporn MB, Roberts AB, editors, *Handbook of experimental pharmacology*, 1st ed., New York: Springer Verlag, 1990, pp. 263–7.
- [5] Heulin MH, Artur M, Malaprade D, Straczek J, Pierson M, Stoltz JF, Belleville F, Paysant P, Nabet P. Evidence for the presence in human serum of an ultrafiltrable factor activating somatomedins. *Biochem Biophys Res Commun* 1981;99:644–53.
- [6] Heulin MH, Artur M, Geschier C, Straczek J, Vescovi G, Belleville F, Paysant P, Nabet P. The biological assay of human somatomedin A: improvement by small molecular mass natural molecules. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1984;106:43–51.
- [7] Heulin MH, Artur M, Straczek J, Belleville F, Nabet P, Herman A, Lebeurre MD, Schimpff M. Effect of low molecular weight human serum factors and human somatomedin peptides in human lymphocytes culture. *J Cell Sci* 1982;57:129–37.

- [8] Dousset B, Straczek J, Maachi F, Le Nguyen D, Jacob C, Capiaumont J, Nabet P, Belleville F. Purification from human plasma of a hexapeptide that potentiates the sulfatation and mitogenic activities of insulin-like growth factors. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;247:587–91.
- [9] Straczek J, Maachi F, Le Nguyen D, Becchi M, Heulin MH, Nabet P, Belleville F. Purification from human plasma of a tetrapeptide that potentiates insulin-like growth factor-I activity in chick embryo cartilage. *FEBS Lett* 1995;373:207–11.
- [10] Jacob C, Maachi F, El Farricha O, Dousset B, Kessler M, Belleville F, Nabet P. Role of the kidney in the expression of low molecular weight factors with growth factor activity. *Clin Nephrol* 1993;39:327–34.
- [11] Jacob C, Hubert J, Maachi F, Punga-Maole A, Dousset B, Junke E, Belleville F. Role of the kidney in the production of a low molecular weight growth factor (MW<1000 Da): experimental study in the pig. *Renal Failure* 1995;17:339–47.
- [12] Ganu VS, Muller-Eberhard HJ, Hugli TE. Factor C3f is a spasmogenic fragment released from C3b by factors I and H: the heptadecapeptide C3f was synthesized and characterized. *Mol Immunol* 1989;26:939–48.
- [13] Le Nguyen D, Heitz A, Castro B. Renin substrates. Part 2 Rapid solid phase synthesis of the ratine sequence tetradecapeptide using BOP reagent. *J Chem Soc, Perkin Trans* 1987;1:915–9.
- [14] Kearney JF, Radbruch A, Liesegang B, Rajewski K. A new mouse myeloma cell line that has lost immunoglobulin expression but permits the construction. *J Immunol* 1979;123:1548–57.
- [15] Littlefield JW. Selection of hybrids from matings of fibroblasts in vitro and their presumed recombinants. *Science* 1964;145:709.
- [16] Beatty JD, Beatty GB, Vlahos WG. Measurement of monoclonal antibody affinity by non-competitive enzyme immunoassay. *J Immunol Methods* 1987;100:173–9.
- [17] Samokhin GP, Filimonov IN. Coupling of peptides to protein carriers by mixed anhydride procedure. *Anal Biochem* 1985;145:311–4.
- [18] Rechlin M. Use of glutaraldehyde as a coupling for proteins and peptides. *Methods Enzymol* 1980;70:159–65.
- [19] Bauminger S, Wilcheck M. The use of carbodiimides in the preparation of immunizing conjugates. *Methods Enzymol* 1980;70:151–62.
- [20] Lin FT, Zinnecker M, Hamaoka T, Katz DT. New procedure for preparation and isolation of conjugates of proteins and a synthetic copolymer of diamino acids and immunological characterization of such conjugates. *Biochemistry* 1979;18:690–717.
- [21] Modena D, Racchetti G, Putignano S, Comitti R, Galante YM. Production and characterization of murine monoclonal antibodies to polypeptide hormones and their fragments. *Ann Ist Super Sanital* 1991;27:167–74.
- [22] Briand JP, Muller SM, Van Regenmortel MHW. Synthetic peptides as antigens: pitfalls of conjugation methods. *J Immunol Methods* 1985;78:59–64.
- [23] Sondergard-Andersen J, Lauritzen E, Lind K, Holm A. Covalently linked peptides for enzyme-linked immunosorbent assay. *J Immunol Methods* 1990;131:99–104.
- [24] Lambris JD. The chemistry, biology, and phylogeny of C3. In: Cruse JM, Lewis Jr. RE, editors. *Complement today. Complement profiles*, Vol. 1, Basel: Karger, 1993, pp. 16–45.
- [25] Sanders PW, Volanakis JE, Stephen G, Rostand G, John HG. Human complement protein D catabolism by the rat kidney. *J Clin Invest* 1986;77:1299–304.
- [26] Inagi R, Miyata T, Oda O, Maeda K, Inoue K. Evaluation of proteolytic activity of factor D accumulated as an active serine protease in patients with chronic renal failure. *Nephron* 1994;66:285–90.
- [27] Volonakis JE, Barnum SR, Giddens M, Galla JH. Renal filtration and catabolism of complement protein D. *New Engl J Med* 1985;312:395–9.

- [28] Pascual M, Steiger G, Estreiger J, Macon K, Volonakis JE, Jurg A, Schifferli JA. Metabolism of complement factor D in renal failure. *Kidney Int* 1988;34:529–36.
- [29] Tang S, Zhou W, Sherin NS, Vaughan R, Sacks SH. Contribution of renal secreted complement C3 to the circulating pool in human. *J Immunol* 1999;162:4336–41.

ANNEXE

CYTOKINES ET FERTILITE MASCULINE

B. DOUSSET*, F. HUSSENET*, M. SAREM*, P. NABET*.

* Laboratoire Central de Chimie. Hôpital Central. 29, avenue du Maréchal de Lattre de Tassigny. 54 000 NANCY.

L'implication des cytokines dans la reproduction fut initialement envisagée en raison de leur rôle de médiateurs du système immunitaire. Ultérieurement, il a été montré que ces médiateurs pouvaient jouer un rôle important dans la fertilité masculine en intervenant directement d'une part sur les fonctions testiculaires et d'autre part sur les spermatozoïdes.

Dans le testicule, la synthèse de certaines cytokines (TGF β , TNF α , IL-1 β , IL-1 α , IL-6) et de leurs récepteurs par les différentes cellules (cellules de Leydig, cellules de Sertoli, cellules germinales, cellules myoïdes périvitubulaires) a été mise en évidence *in vitro*. L'action de ces cytokines s'intégrerait, avec celle d'autres facteurs de croissance (IGF-I, FGF, EGF...), dans le système de régulation locale consistant en un réseau complexe de communications (paracrine, autocrine ou intracrine) entre les différents types cellulaires et dépendrait en partie de facteurs hypophysaires, testiculaires et immunitaires. Ainsi, différentes cytokines interviendraient dans le développement des cellules de Leydig (TGF β) et la stéroïdogénèse en modulant l'expression de cytochromes P450 (IL-1 α , IL-1 β , IL-2, TNF α). Elles seraient aussi impliquées dans la spermatogénèse par leurs effets sur la synthèse d'ADN des spermatogonies et des spermatocytes préleptotènes (IL-1 α , IL-6), la libération de transferrine (TNF α , IL-2, IL-6) et la synthèse de lactate (TGF β).

Dans le sperme, la présence de plusieurs cytokines (TNF α , IL-2, IL-6, TGF β , IL-1 β , IL-8) et de leurs récepteurs solubles (RS IL-2, RS IL-6, RS TNF α -p55) a été détectée et différentes variations des concentrations ont été observées dans certains cas d'hypofertilité ou d'infertilité masculine (azoospermie, asthénozoospermie, infection ou inflammation des glandes annexes). En outre, des études réalisées *in vitro*, ont montré que certaines cytokines pouvaient affecter la mobilité des spermatozoïdes, accroître la peroxydation des lipides membranaires des spermatozoïdes et la production inhérente de radicaux libres, réduire la pénétration des spermatozoïdes dans l'ovocyte dépellucidé de hamster. Bien que l'origine et le rôle exact des cytokines dans le sperme n'aient pas été à ce jour totalement élucidés, de nombreux travaux suggèrent qu'elles pourraient intervenir dans le pouvoir fécondant du sperme *in vivo*.

Les cytokines, malgré une organisation complexe sous forme de réseau avec des effets synergiques ou antagonistes et une induction en cascade incomplètement appréhendées constituent une nouvelle voie d'approche dans le domaine de la fertilité masculine.

SEMINAL CYTOKINES AND MALE INFERTILITY

HUSSENET F.*, SAREM M.*, DAUDIN M.**, BUJAN L.**, FOLIGUET B.°, NABET P.*,
DOUSSET B*.

* Laboratoire Central de Chimie. Centre Hospitalier Universitaire. 29, avenue de Lattre de Tassigny. C.O.34. 54035 Nancy.

° CECOS Lorraine. Laboratoire de Biologie Sexuelle. Maternité. Rue du Docteur Heydenreich. 54000 Nancy.

**CECOS Midi Pyrénées. Laboratoire de Biochimie III. Hôpital La Grave. 31 000 Toulouse.

The field of cytokines on reproduction represents a growing area of investigation. Different cytokines have been reported in human semen plasma and some fluctuations of their levels were reported during certain pathological conditions. The aim of this study was to evaluate their interest for the routine clinical management of infertility.

We measured the seminal concentrations of some interleukins (IL-1 β , IL-2, IL-6) and those of soluble receptors of interleukins (sR IL-2, sR IL-6) by using sandwich enzyme immunoassays (Immunotech, France) except for IL-2 which was evaluated by radioimmunoassay (Amersham, UK). The semen were obtained from 119 patients undergoing routine infertility work-up (CECOS Lorraine or Midi-Pyrenees) and 21 normal fertile subjects as controls. In the blood of 96 corresponding men, we quantified FSH and LH levels by radioimmunometric assay (Biomerieux, France) and testosterone values by using direct radioimmunoassay without extraction (Sorin Medica, Italia). The concentrations of cytokines were analyzed according to semen parameters and blood hormonal status by using non parametric statistical tests.

In seminal samples of control group, IL-2 was detected in high concentrations unlike sR IL-2, IL-6, sR IL-6 and IL-1 β values (IL-1 β \leq 5 pg/ml in 62 % of cases). Neither sperm count nor sperm motility nor percentage of normal spermatozoa presented any correlation with the substances under study. In the global group of patients with infertility we observed significantly higher seminal IL-1 β values ($P < 0.001$) than in control group. Moreover, the blood levels of hormones were not related to the seminal cytokine concentrations. Apart from azoospermia which was characterized by significantly higher IL-1 β values ($P < 0.05$) and lower IL-2 concentrations than normospermia ($P < 0.05$) and oligozoospermia ($P < 0.05$), no difference was found on the basis of progressive motility, percentage of abnormal forms, diagnosis of infectious process and normal or elevated serum values of both gonadotropins.

Our data extend preliminary observations on cytokines in human semen. These mediators might be produced by all parts of male genital tract (testis, epididymis, prostate) and/or could be released by the immunocompetent cells. Then, the measurement of cytokines in human sperm does not seem relevant for the routine clinical management of male infertility since it could reflect their intricate relationships and their response to the underlying genital immune and endocrine status rather than the cause of the severity of the testicular dysfunction.

RATIO FREE RELEASABLE TO TOTAL IGF-I IN CHRONIC RENAL FAILURE. B. Dousset, F. Hussenet, M. Sarem, J. Hubert, P. Nabet and M. Kessler. Departments of Biochemistry, Urology and Nephrology, Nancy Medical School, Nancy, 54000, France.

In chronic renal failure (CRF) the increase of serum proteolytic activity leads to a molar excess of IGF-BPs specially IGF-BP3 relative to IGF-I shifting equilibrium between bound and free forms of IGF-I. Since IGF-I mediated effects in vivo result mainly from the releasable pool of free peptide, the concentration of free IGF-I as well as the ratio of free to total IGF-I may have a greater physiological and clinical relevance than the total IGF-I levels.

The serum free releasable IGF-I values (0.2- 2 ng/ml, median = 0.9 ng/ml) and the ratio free to total IGF-I (0.05-1.8%, median 0.4%) determined in adults with (CRF) treated by haemodialysis were not significantly different from that observed in healthy age and sex cross-matched subjects who served as control group (0.3-1.6 ng/ml, median = 0.8 ng/ml; 0.1-1.9%, median = 0.5% respectively). The fraction of free IGF-I was independent from the serum creatinine levels and no relationship was found between the serum levels of free and total IGF-I in both groups.

In CRF, various factors may explain the discrepancy between the normal ratio of free releasable to total IGF-I despite the elevation of IGF-Bps (concentrations particularly the recognition of intact forms as well as fragments of IGF-BPs) and changes in the affinity of IGF-BPs due to alterations, even slight in structure, leading to an rise in IGF-I released from some fragments.

Free releasable IGF-I concentration and fraction appear to be not modified in uremia and might be in relation with an apparent resistance to this peptide.

THE MITOGENIC ACTIVITY OF IGF IS MODULATED BY FRAGMENTS OF THIRD COMPONENT OF HUMAN COMPLEMENT. Mahrou Sarem, Brigitte Dousset, Amal Handaj, Pierre Nabet, Francine Belleville-Nabet. Laboratory of Biochemistry. Nancy Medical School. France.

A hexapeptide increasing significantly the *in vitro* mitogenic activity of both IGF has been recently purified from human serum. Because its motif is contained in fragments (C3f and its desArg form) released after activation of third component of human complement, we investigated the mitogenic activity of homologous synthetic peptides in absence and presence of IGF-I (15 ng/ml) or IGF-II (50 ng/ml). The mitogenic activity (^3H thymidine incorporation into chick embryo fibroblasts) of medium serum-free, peptides and/or IGF was compared by one way ANOVA followed by multiple comparisons using Neuman-Keul's test.

At concentration of about ng/ml, each peptide (IIWESAS, C3f, C3f-desArg) tested alone increased significantly the mitogenic activity ($p < 0.01$) but this increase occurred with a lower magnitude than that due to IGF-I or IGF-II ($p < 0.05$). Similar concentrations of peptides led to a synergistic effect ($p < 0.05$) in combination studies performed with IIWESAS+IGF-I, C3f+IGF-I, C3f-desArg + IGF-II whereas C3f-desArg inhibited significantly IGF-II action.

These data suggest that certain fragments of human complement may act on non immune cells by modulating IGF action

EVALUATION DU DOSAGE DE L'INSULINE PAR L'AUTOMATE IMMULITE DE DPC

F. GAMBIER - N. BORNIET - M. SAREM - B. DOUSSET - P. NABET.

Laboratoire Central de Chimie, Hôpital Central - HCF de Nancy, 29, avenue du Maréchal de Lattre de Tassigny, 54000 Nancy.

Un nouveau dosage de l'insuline est proposé par la société Diagnostic Products Corporation (DPC) sur automate Immulite. Il repose sur une méthode immunométrique en phase solide (bille de polystyrène) comprenant une étape de lavage avec séparation par centrifugation axiale et une détection par chimioluminescence. Les principales performances de ce nouveau test, qui permet l'évaluation de l'insuline à partir d'échantillon de sérum ou de plasma recueilli sur héparine, ont été évaluées.

La reproductibilité intra-assai a été déterminée à l'aide de trois sérum de contrôle dont les concentrations ont été mesurées dix fois. Pour des valeurs moyennes d'insuline respectivement de 13.5; 23.2 et 68.3 mUI/L, les coefficients de variation sont compris entre 3.91 et 6.26%.

La reproductibilité inter-assais a été évaluée à l'aide de deux autres sérum de contrôle et des réactifs d'un même lot. La précision interséries (n=7) du dosage d'échantillons dont l'insulinémie moyenne est de 11.4 et 51.5 mUI/L est caractérisée par des coefficients de variation respectifs de 6.85 et 3.13%.

En ce qui concerne le test de dilution (dilutions de 1/2 à 1/32), effectué à partir de deux échantillons de plasma (P1: 196 mUI/L et P2: 171 mUI/L), les équations des droites de régression trouvées sont $Y = 200X - 5.4$ (P1) et $Y = 172X + 4.3$ (P2) avec des coefficients de corrélation de 0.99.

Des échantillons de patients (n= 31), recueillis dans des tubes contenant de l'héparine, ont été dosés simultanément sur Immulite (DPC) et par la méthode du laboratoire (ABBOTT) avec un automate IMX. Lors de cette étude de corrélation entre des valeurs d'insulinémie ≥ 8 et ≤ 300 mUI/L, l'équation de la droite obtenue est $Y (DPC) = 1.01X(ABBOTT) + 2.12$ et le coefficient de corrélation = 0.98.

La technique de dosage d'insuline proposée sur Immulite permet d'obtenir des résultats rapides (70 minutes), reproductibles dans de bonnes conditions de praticabilité.


Nom : Mademoiselle SAREM
Prénom : Mahrou

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ, NANCY 1
en BIOLOGIE SANTÉ ENVIRONNEMENT
Spécialité : GÉNIE BIOLOGIQUE ET MÉDICAL

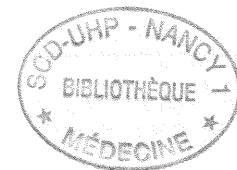
VU, APPROUVÉ ET PERMIS D'IMPRIMER

Nancy, le *30 janvier 2001*

Le Président de l'Université



C. BURLET



MAHROU Sarem

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARÉ, NANCY I - ANNÉE 2000

SUJET DE THÈSE : *IDENTIFICATION DANS LES SERUMS DE MAMMIFERES DE PEPTIDES (MW < 1 000 DA) À ACTIVITE MITOGENIQUE. INFLUENCE DE CES PEPTIDES SUR LES ACTIVITES BIOLOGIQUES DES IGF1 ET IGF2.*

MOTS-CLES : IGFs, transport membranaire, synthèse protéique, peptides, PKC, phosphorylation, apoptose, activité mitogénique.

RESUME :

Les facteurs de croissance de petit poids moléculaire qui ont été identifiés dans le sérum humain par leur capacité à stimuler des activités biologiques des IGFs (insulin-like growth factors), et en particulier deux peptides (HWESAS et WGHE), représentent une nouvelle voie d'étude des facteurs de croissance.

L'objectif de ce travail a été initialement de rechercher la présence de ces petits peptides (MM<1000 Da) dans le sérum de certains mammifères. Les ultrafiltrats provenant de sérum de cheval, porc, bœuf et souris exercent un effet potentialisateur sur l'activité mitogénique des IGFs. Cet effet peut s'expliquer en partie par la présence de HWESAS dans les sérums à des concentrations variant de 2 à 28 mg/l.

Dans la seconde partie, nous nous sommes intéressée aux activités mitogéniques de HWESAS et de peptides dérivés sur différentes lignées cellulaires. Ces peptides ont une activité mitogénique propre et modulent celle des IGFs. Cette activité mitogénique pourrait faire intervenir des isoformes de la PKC (étude sur les fibroblastes d'embryons de poulets). HWESAS agit en synergie avec les IGFs sur certaines activités métaboliques comme l'entrée du glucose et des acides aminés dans les cellules ou la stimulation de la synthèse protéique. De plus il agit en synergie avec les IGFs pour augmenter la phosphorylation des protéines. L'étude du cycle cellulaire ainsi que la mesure de la fixation de l'annexine V-FITC, montrent que HWESAS seul ne protège pas les fibroblastes d'embryons de poulets contre l'apoptose, mais associé aux IGFs il exerce un certain effet protecteur.

PROPOSITION DE JURY :

Rapporteurs :	Monsieur le Prof. J.C HENRY, Monsieur le Prof. F.X. MAQUART,	BESANCON REIMS
Membres du jury :	Monsieur le Prof. P. NABET, Madame le Dr M.H. LAFAGE-PROUST, Madame le Dr B. DOUSSET, Monsieur le Dr A. CLEMENT, INRA,	NANCY St ETIENNE NANCY NANCY