HAL
open science

Hormone lactogène placentaire (hPL) : fabrication d'anticorps anti-hPL et recherche des épitopes : l'hPL est-elle une kinase ?

Hafid Maazouzi

To cite this version:

Hafid Maazouzi. Hormone lactogène placentaire (hPL) : fabrication d'anticorps anti-hPL et recherche des épitopes : l'hPL est-elle une kinase ?. Biochimie [q-bio.BM]. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 1993. Français. NNT : 1993NAN10426 . tel-01747151

HAL Id: tel-01747151

https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01747151v1

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.

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

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

UNIVERSITE DE NANCY I FACULTE de MEDECINE de NANCY

GFD : **Génie Biologique**
Spécialité : **Biochimie**

UNIVERSITE de NANCY
BIBLIOTHEQUE
Section de Médecine

THESE

présentée pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE NANCY I

Soutenue publiquement le 17 décembre 1993
devant la commission d'examen par

Hafid MAAZOUZI

Hormone lactogène placentaire (hPL) - Fabrication d'anticorps anti-hPL et recherche des épitopes - L'hPL est-elle une kinase?

Travaux effectués au Laboratoire de Biochimie
de la Faculté de Médecine de Nancy
sous la direction du professeur P. Nabet et
du Professeur F. BELLEVILLE-NABET

MEMBRES du JURY

Monsieur le Professeur J.F. STOLTZ	Président
Monsieur le Professeur J.C. HENRY	Rapporteur
Madame le Docteur R.M. SCHIMPFF	Rapporteur
Madame le Professeur F. BELLEVILLE-NABET	Directeur de Thèse
Madame le Docteur M.A. GELOT	

UNIVERSITE de NANCY BIBLIOTHEQUE Section de Médecine

AVANT-PROPOS

Ce travail a été réalisé dans le laboratoire de biochimie Médicale I, dirigé par le Professeur **P. NABET** et madame le Professeur **F. BELLEVILLE-NABET.** Il y a cinq ans, ils m'ont fait le grand honneur de m'accueillir dans leur laboratoire et m'ont confié ce travail. Je les remercie d'avoir consacré une grande partie de leur temps pour m'aider à la réalisation de ce mémoire.

L'intérêt qu'ils ont apporté à mes résultats et l'analyse critique qu'ils en on fait m'ont été d'un grand secours. Que ce mémoire soit le témoignage de ma profonde reconnaissance.

Je remercie Monsieur J.C. Henry, Professeur de Biochimie à la Faculté de médecine de Besançon, d'avoir accepté de juger ce travail et d'en être le rapporteur. Qu'il trouve ici le témoignage de ma reconnaissance.

Je remercie également Madame le Docteur SCHIMPFF d'avoir accepté de juger ce mémoire et d'en être le rapporteur.

J'exprime ma vive reconnaissance à Madame M. A. Gelot pour son aide et je la remercie d'avoir accepté de se joindre à ce jury.

Ma reconnaissance va aussi à monsieur le professeur J.F. Stolz, qui m'a fait l'honneur de juger notre thèse. Soyez assuré de nos remerciements les plus sincères.

A Monsieur le docteur J. Straczek. Je le remercie tout particulièrement de l'aide précieuse et des conseils amicaux qu'il a su m' apporter afin de me faire profiter de son expérience scientifique rigoureuse. Je lui suis infiniment reconnaissants d'avoir accepté de travailler avec moi.

Je n'oubie pas tous ceux et celles qui, dans le laboratoire m'ont apporté leurs idées, leurs conseils techniques ou leur aide, et tout particulièrement à Valérie M. et Suzy A. pour le temps qu'elles ont consacré à mettre en page ce manuscrit.

UNIVERSITE de NANCY
BIBLIOTHEQUE
Section de Médecine

A toute ma famille et tout particulièrement à ceux et celles qui ont participé moralement et matériellement à la réalisation de ce mémoire.

A ma femme Khadija

Son aide précieuse et sa patience inlassable ont contribué à la réalisation de ce travail. Qu'elle trouve ici le témoignage de mon affection.

A la mémoire de

ma mère Rquia

ma grand-mère Adjiba

mon frère Said

UNIVERSITÉ DE GENÈVE BIBLIOTHÈQUE Section de Médecine

Pages

ABREVIATIONS

I - INTRODUCTION

I - 1 L'hormone placentaire lactogène 1

I - 1.1 Historique 1

I - 1.2 Propriétés physico-cliniques de l'hPL 3

I - 1.2.1 Structures de l'hPL 3

I - 1.2.2 Analogie entre hPL et les hormones hypophysaires 5

I - 1.3 Propriétés physiologiques de l'hPL 5

I - 1.3.1 Propriétés somatotropes 6

I - 1.3.2 Propriétés lactogéniques et mammotropiques 7

I - 1.3.3 Propriétés lutéotrophiques 7

I - 1.4 Métabolisme énergétique et hPL 8

I - 1.4.1 Métabolisme des glucides 8

I - 1.4.2 Métabolisme des lipides 11

I - 1.5 La régulation de la sécrétion de l'hPL 12

I - 1.5.1 Rôle du glucose 12

I - 1.5.2 Rôle de l'adrénaline et de la noradrénaline 13

I - 1.5.3 Action de l'estriol et de la progestérone 13

I - 1.5.4 Autres facteurs pouvant intervenir dans la régulation d'hPL 13

I - 1.6 L'intérêt du dosage de l'hPL au cours des grossesses 14

I - 1.7 Gènes de l'hPL 17

I - 2 Notions d'immunochimie 19

I - 2.1 Synthèse des anticorps 19

I - 2.2 Structure des anticorps 20

I - 2.3 Les anticorps monoclonaux 22
I - 2.3.1 La fusion cellulaire 24
I - 2.3.2 Les hybridomes souris-souris 24

I - 2.4 Antigènes, nature des sites immunoréactifs 26
I - 2.4.1 Généralités 26
I - 2.4.2 Prédiction des zones antigéniques 26

I - 2.5 Applications des anticorps monoclonaux 27
I - 2.5.1 Détection par anticorps monoclonaux d'antigène de surface cellulaire 28
I - 2.5.2 Détection par AcM d'antigène associés à des tumeurs 29
I - 2.5.3 Détection d'hormones par AcM 29
I - 2.5.4 Virus 29
I - 2.5.5 Intérêt dans les dosages immuno et radio-immunologiques 30

I - 2.6 L'intérêt des anticorps anti hPL 30

I - 3 La phosphorylation des enzymes 31
I - 3.1 Protéine-kinases activées par l'AMPc 31
I - 3.2 Le message de l'AMPc 32

I - 4 Présentation du travail 33

II - MATERIEL ET METHODES
II - 1 Préparation des anticorps monoclonaux et leurs productions 35
II - 1.1 Protocole d'immunisation 35
II - 1.1.1 Choix de l'animal 35
II - 1.1.2 Immunisation in vivo 36
II - 1.1.3 Récupération des sérums pour la détermination de la réponse immunitaire 37

II - 1.2 Protocole de fusion 37
II - 1.2.1 Préparation des milieux et des solutions 37
II - 1.2.1.1 Le sérum de veau foetal 37
II - 1.2.1.2 Le milieu de base 38
II - 1.2.1.3 Les compléments du milieu 38

II - 1.2.1.4 Le milieu de sélection 38
II - 1.2.1.5 Agent fusionnant 40

II - 1.2.2 Cultures cellulaires 40
II - 1.2.2.1 Préparation des macrophages péritonéaux 40
II - 1.2.2.2 Préparation des cellules de myélomes 41
II - 1.2.2.3 Préparation des cellules spléniques 42

II - 1.2.3 Fusion 43
II - 1.2.3.1 Principe 43
II - 1.2.3.2 Mise en contact des deux types de cellules et application de l'agent fusionnant 43
II - 1.2.3.3 Répartition des produit de la fusion 44

II - 1.3 Méthode de clonage 44
II - 1.3.1 Principe 44
II - 1.3.2 Protocole 45
II - 1.3.3 Sélection des clones sécrétants 45
II - 1.3.4 Prolifération 45
II - 1.3.5 Congélation des cellules 46
II - 1.3.6 Décongélation des cellules 48

II - 1.4 Production d'anticorps monoclonaux anti hPL 48
II - 1.4.1 Production in vitro 49
II - 1.4.2 Production en ascite chez la souris Balb/c 49

II - 2 Sélection et caractérisation des anticorps sécrétés par des clones 50

II - 2.1 Sélection des hybridomes par test ELISA 50
II - 2.1.1 Principe 50
II - 2.1.2 Protocole 51

II - 2.2 Détermination de l'isotype 54

II - 3 Purification des anticorps murins 54

II - 3.1 L'ultrafiltration 54

II - 3.2 Précipitation par le sulfate d'ammonium et dialyse 55

II - 3.3 Chromatographie gel filtration 56

II - 3.4 Chromatographie d'échange d'ions par le système FPLC 56

II - 3.5 Chromatographie d'affinité 57

II - 4 Analyses des protéines et peptides 59

II - 4.1 Dosage des protéines 59

II - 4.2 Vérification de la pureté des protéines 59

II - 5 Détermination des caractéristiques des anticorps anti-hPL 60

II - 5.1 Marquage de l'hPL 60

II - 5.2 Détermination de la constante d'affinité 61

II - 5.3 Recherche des épitopes de l'hPL 62

II - 5.3.1 Dénaturation de l'hPL 62

II - 5.3.1.1 Coupure des ponts disulfures 62

II - 5.3.1.2 Hydrolyse chimique par Bromure de cyanogène 63

II - 5.3.2 Séparation des fragments peptidiques par chromatograpie HPLC 63

II - 5.3.3 Séparation des peptides par électrophorèse capillaire 64

II - 5.3.4 Identification des pics séparés par HPLC 64

II - 5.3.5 Séquençage et structure de l'épitope 64

II - 6 Etude de la relation hPL-AMPc 64

II - 6.1 Etude de la fixation de l'AMPc sur l'hPL 64

II - 6.2 Dialyse à l'équilibre 65

II - 6.3 Passage de l'hPL sur une colonne d'Agarose-AMPc 66

II - 6.4 Mesure de l'activité kinasique 67

II - 6.4.1 En utilisant la caséine comme substrat 67

II - 6.4.2 En utilisant un lysat de lymphocytes comme substrat lysat cellulaire 67

II - 6.5 Immunotransfert 70

II - 6.5.1 Préparation de l'échantillon 70

II - 6.5.2 Migration de l'échantillon sur gel d'électrophorèse 70

II - 6.5.3 Transfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose 71

II - 6.5.4 Blocage des sites de fixation non spécifique de la membrane 72

II - 6.5.5 Réaction avec l'anticorps 72

II - 6.5.6 Révélation 72

III - RESULTATS

III - 1 Fabrication d'hybridomes anti-hormone placentaire lactogène 74

III - 1.1 Production des anticorps in vitro 74

III - 1.2 Production d'AcM in vivo 78

III - 2 Isotypage des anticorps 78

III - 3 Spécificité de l'anticorps 80

III - 4 Purification des anticorps monoclonaux contenus dans le milieu de culture ou d'ascites 80

III - 4.1 Précipitation au sulfate d'ammonium 80

III - 4.2 Chromatographie par échange d'ions en FPLC analytique 80

III - 4.2.1 Surnageant 82

III - 4.2.2 Chromatographie sur gel séphacryl S200 82

III - 4.2.3 Surnageant d'hybridome issu de gel filtration 82

III - 4.3 Chromatographie par échange d'ions en FPLC préparative 88

III - 4.4 Purification par chromatographie d'affinité sur protéine A-Sepharose CL4b 88

III - 5 Analyse par électrophorèse en gel d'acrylamide 80

UNIVERSITÉ de NANCY BIBLIOTHÈQUE de Médecine

III - 6 Localisation des épitopes de l'hPL reconnus par les anticorps monoclonaux anti-hPL 92

III - 6.1 Marquage de l'hPL par l'iode 125 92

III - 6.2 Constante d'affinité des IgG 92

III - 6.3 Représentation de Scatchard 92

III - 6.4 Coupure et blocage des ponts disulfures 97

III - 6.5 Séparation des fragments d'hPL obtenus après Hydrolyse par le bromure de cyanogène 99

III - 6.6 Séparation de la fraction positive 110

III - 7 Relation hPL-AMPc 110

III - 7.1 Mise en évidence de l'action immunologique de l'AMPc sur la réaction antigène-anticorps de l'hPL 110

III - 7.2 Dialyse à l'équilibre 117

III - 7.3 Chromatographie de l'hPL sur agarose-AMPc 125

III - 7.4 Mesure de l'activité kinasique de l'hPL 125

III - 7.4.1 Caséine 125

III - 7.4.2 Lysat de lymphocytes humain 125

III - 7.5 Electrophorèse de la solution contenant de l'hPL et son transfert sur une membrane nitrocellulose 130

IV - DISCUSSION 136

V - CONCLUSION - PERSPECTIVES 149

VI - REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 151

VII - ANNEXES 182

UNIVERSITÉ ... BIBLIOTHÈQUE Section de ...

ABREVIATIONS

AA	Acides aminés
AC	Anticorps
ACF	Adjuvant de Freund complet
AcM	Anticorps monoclonaux
Ag	Antigène
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
Ap	Après
ATP	Adénosine triphosphate
Av	Avant
BSA	Bovine serum-albumin
BCIP	Bromochloroindolyl
CHARPS	(3 - [(3 - cholamidopropyl) dimithyl ammonio] - 1 - Propane Sulfonate
cpm	Coups par minute
DMSO	Diméthylsulfoxide
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylène diamine tétra-acétique acide
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
FPLC	Fast performance liquide chromatography
GMPc	Guanosine monophosphate cyclique
HAT	Hypoxantine, aminoptérine, thymidine
HGPRT	Hypoxantine-guanine-phosphoribosyl-transférase
hGH	Human growth hormone
hPL	Human placental lactogene
IFA	Adjuvant de Freud incomplet
LH	Luteinising hormone
MSL	Milieu de séparation des lymphocytes
NTB	notro=bleu de tétrazolium
PBS	Phosphate buffered saline
pmole	Picomole
PRL	Prolactine
SC	Sous cutané
SDS	Dodécylsulfate de sodium
SVF	Sérum de veau foetal
TCA	Acide trichloracétique
TMB	Tétraméthyl benzidine
TRIS	TRIS (hydroxy-méthyl)-aminométhane

INTRODUCTION

BIBLIOTHEQUE de Médecine

I - 1 L'hormone placentaire lactogène

Au cours de la grossesse humaine, il existe une production très abondante d'hormones stéroïdes et protéiques, largement utilisées pour son diagnostic et sa surveillance biologique.

La signification et le rôle physiologique des hormones stéroïdes ou protéiques produites par l'unité foeto-placentaire sont souvent difficiles à préciser, mais elles jouent certainement un rôle dans le maintien de la gestation, dans la croissance et le développement du foetus, ou dans le mécanisme de déclenchement de la parturition à terme.

Chez l'homme, ainsi que chez la plupart des mammifères, le placenta sécrète des hormones polypeptidiques. Le placenta humain en particulier, synthétise des homologues de toutes les hormones hypophysaires, mais nombre d'entre eux n'ont pas encore été purifiés et il est très vraisemblable que certaines hormones placentaires possèdent plusieurs activités biologiques.

L'hormone lactogène placentaire est une hormone peptidique synthétisée et sécrétée en majeure partie par le syncytiotrophoblaste sans aucune participation foetale. Des méthodes récentes d'immuno-fluorescence, d'histo-enzymologie utilisant un anticorps monoclonal spécifique anti-hPL montre que cette dernière est présente entre le chorion et la caduque pariétale et dans de nombreuses cellules de la caduque basilaire (Sakbun et coll, 1990).

I - 1.1 Historique

En 1933, Seley et al. avaient montré chez le rat hypophysectomisé entre le 10ème et le 14ème jour de la gestation, que la présence d'une fonction pituitaire intacte n'est pas nécessaire ni au maintien de la grossesse normale et de la parturition, ni au déclenchement de la lactation.

Astwood et Greep, en 1938, ont démontré les effets lutéotropes d'extraits placentaires : l'injection de ces extraits prolonge la fonction du corps jaune chez la rate pseudo-gestante.

En 1945, Léonard observa chez la rate gestante après exérèse des foetus, des ovaires et de l'hypophyse, qu'une régression de la croissance mammaire n'était observée que si le placenta n'était pas maintenu en place.

Vers 1961, Ito et Higashi parvinrent à extraire du placenta humain à terme, une substance protéique qui présentait une activité prolactinique dans le test du jabot de pigeon.

D'autre part, en 1959, Contopoulos et al. ont suggéré la présence dans le placenta d'une substance exerçant des propriétés somatotropes, et postulèrent également l'existence de substances lutéotropes chez la rate gravide hypophysectomisée.

L'analyse de ces observations préliminaires suggérait donc l'existence de substances d'origine placentaire exerçant des effets lutéotropes, mammotropes et lactogénique, primordiaux pour le maintien de la grossesse chez l'animal hypophysectomisé. Cependant, les éléments objectifs manquaient quant à l'origine cellulaire, l'isolement et la caractérisation de cette ou des substances. Les premiers rapports précis relatifs à l'isolement d'une hormone somatotrope et lactogénique placentaire furent ceux de Fukushima (1961) qui isola par précipitation au sulfate d'ammonium et chlorure de sodium une substance protéique placentaire douée d'une activité somatotrope, et de Ito et Higashi (1961) qui recourant à une précipitation fractionnée par le sulfate d'ammonium, obtint un matériel d'activité prolactinique.

C'est seulement en 1962 que Josimovich et Mac Laren, grâce à une réaction croisée avec l'hormone de croissance humaine, isola cette hormone. En utilisant une variante de la méthode de Li pour l'extraction de l'hormone de croissance, ils réussissent à isoler de l'hPL purifié à environ 80 %. Celui-ci présentait un comportement électrophorétique semblable à celui de l'hormone de croissance.

La diversité des propriétés biologiques de cette hormone et les inconnues qui subsistent dans la détermination de sa fonction ont introduit des variations sur la terminologie employée. Elle a en effet, reçu les noms suivants :

- "Chorionic growth hormone-prolactin" (CG-P) par Kaplan et Grumbach (1965).
- "Hormone chorionique somatommatrope humaine (hCS) par Li et al. (1968).

- "Placental protein" (PP) par Friesen et al. (1965).
- "Purified placental protein (human)" (PP(h)) par Florini et al. (1966).

Néanmoins, depuis une conférence tenue en 1972 sur les hormones lactogènes, le retour à la domination initiale utilisée par Josimovish et MacLaren (1962) a été recommandé, à savoir "human placental lactogen" (hPL).

I - 1.2 Propriétés physico-chimiques de l'hPL

I - 1.2.1 Structure de l'hPL

L'hPL circule sous la forme de monomère, sa structure primaire est constituée de 191 acides aminés (Niall et al., 1971) comme pour l'hormone de croissance humaine (hGH) alors que la prolactine bovine (oPRL) en compte 198. Cependant, Li et al. (1971) et Sherwood et al. (1971) avaient proposé d'abord une structure de 190 AA. La structure de l'hPL est donnée dans la figure 1.

Il existe deux ponts disulfures entre les résidus cysteyl 53 et 165, ainsi que 182 et 189.

Il n'y a qu'un seul tryptophane placé en position 86. Des travaux du laboratoire ont mis en évidence l'existence de deux formes moléculaires par filtration sur gel de Séphadex et par électrophorèse analytique sur gel de polyacrylamide. L'électrophorèse permet de séparer une forme à migration très anodique (hPL1), d'une forme migrant juste en avant de l'albumine (hPL2). hPL1 et hPL2 sont interconvertibles l'une en l'autre. Belleville (1972) démontre que les formes moléculaires d'hPL ne se différencient pas par leur poids moléculaire car les deux formes ont le même coefficient de sédimentation, et le même coefficient de diffusion. Ce serait des iso-hormones ne différant que par leur structure tertiaire comme le confirma Goodmann et al. (1972). L'incorporation de "leucine tritiée" dans du placenta en culture, montre que la néosynthèse se fait préférentiellement sous la forme hPL1 (Belleville et al., 1972) ; hPL2 serait une forme de réserve pré-existante n'incorporant pas d'acides aminés et dont l'activité biologique est 25 fois supérieure à celle de hPL1. Il ne semble pas y avoir actuellement de rôle spécifique dévolu à hPL1 ou hPL2.

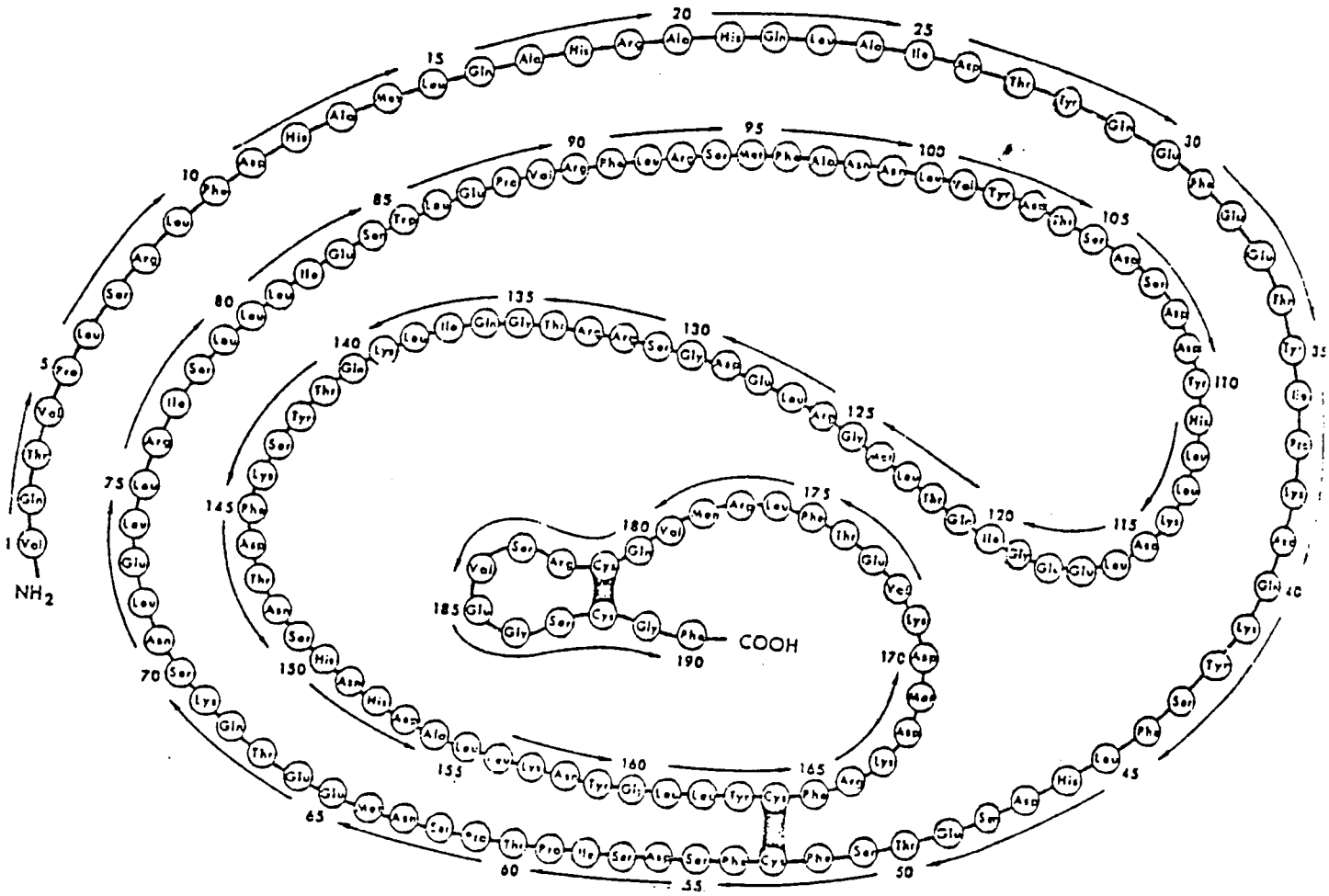


Figure 1 : Structure primaire de l'hPL d'après Li et al., 1971.

I - 1.2.2 Analogie entre hPL et les hormones hypophysaires

Il existe une forte homologie de séquence entre l'hPL d'une part, et la prolactine et l'hormone de croissance hypophysaire d'autre part (Smal et al., 1986). Toutes ces hormones appartiennent à une famille de protéines constituées d'une chaîne simple d'environ 200 amino acides, et comportant 2 à 3 ponts disulfures intracaténaires, et des extrémités N et C terminales non bloquées.

Tous les membres connus de cette famille, partageant plusieurs propriétés biologiques et immunologiques sont issus d'un gène ancestral commun (Niall et al., 1971 ; Wallis et al., 1981) qui, par duplications et évolution, aurait donné naissance à des gènes séparés codant pour l'hormone de croissance, la prolactine et l'hormone lactogène placentaire humaine (Frantz et al., 1985 ; Nickel et al., 1990).

I - 1 3 Propriétés physiologiques de l'hPL

Le rôle de l'hPL dans la croissance et le métabolisme du foetus a été bien défini par Yen et al. (1984) (Figure 2).

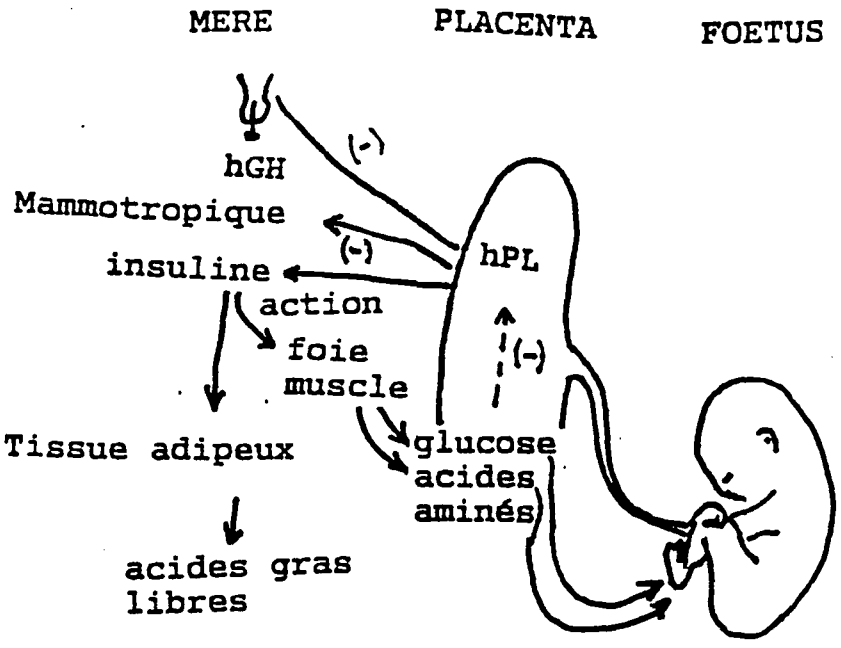


Figure 2 :

Le rôle physiologique de l'hPL durant la grossesse. L'hPL permet la mise en réserve des glucides maternels assurant ainsi au foetus, un apport énergétique constant sous la forme de glucose facilement assimilable.

L'hPL entraîne une mobilisation et une libération des acides gras libres ; (-) :

I - 1.3.1 Propriétés somatotropes

Depuis les travaux de décapitation de l'embryon de lapin réalisé par Jost (1947) chez le rat, sur le rôle de l'hypophyse foetale dans le développement embryonnaire, il est maintenant admis que l'hypophyse foetale ne contribue que très partiellement à la croissance de l'embryon au cours de la gestation. Il semble par contre, que cette croissance soit gouvernée par des sécrétions somatotropes provenant en particulier du placenta.

Chez l'homme, (Erez et al., 1966), ou chez les bovins (Li et al. 1978), le fait que les embryons anencéphales parviennent à terme, suggèrent que les facteurs de croissance extrahypophysaires sont impliqués dans le développement complet de l'embryon. Chez les vaches gravides, l'existence d'une hormone placentaire à activité de croissance, a été mise en évidence et cette hormone dénommée bPL (bovine placental lactogen) a une activité de croissance équivalente aux deux tiers de sont activité lactogène (Kelly et al., 1976). Chez les ruminants domestiques, l'hormone lactogène placentaire possède une capacité de liaison élevée (20 à 30 %) aux récepteurs somatotropes (Handwerger et al., 1974 ; Martal et al., 1975 ; Chan et al., 1976 ; Reddy et al., 1978 ; Freemark et al., 1990). Chez le mouton, une hormone placentaire de croissance a été purifiée par Martal et al. dès 1975, puis mise en évidence à partir de 1977, par Martal et al. L'activité de croissance de cette hormone, dénommée oPL (ovine placental lactogen), a été étudiée par son action sur la croissance des cartilages des épiphyses tibiales de rats hypophysectomisés. Les animaux ainsi traités présentaient une nette augmentation de l'épaisseur des cartilages épiphysaires par rapport aux animaux témoins (Chan et al., 1976 ; Martal et al., 1977 ; Martal et al., 1980). D'autres études in vivo ont également démontré que cette hormone favorise le gain de poids (Martal et al., 1980) et la sécrétion de somatomedin C/IGF_I (Gluckman et al., 1988 ; Caufriez et al., 1990 ; Lassarre et al., 1991).

Comment les hormones placentaires interviennent-elles dans la croissance embryonnaire et foetale ? Les recherches effectuées sur une famille de peptides à activité insulino-mimétique et mitogène, dont le poids moléculaire est compris entre 7 et 8 Kd, ont commencé d'apporter un début de réponse à ces questions. Ces peptides, ou IGF (Insulin-like growth factors), interviendraient vraisemblablement comme médiateurs de la fonction somatotrope de l'hormone de croissance et il a été suggéré qu'un étroit parallélisme existerait entre les concentrations sériques d'hormone à activité de croissance et celles des IGF dans les compartiments foetaux (Coxam et al., 1987 ; Luthman et al., 1991). Gluckman et al. (1976)

trouvent une corrélation positive entre les concentrations de GH dans le sang ombilical et la taille de nouveau-né ou son poids.

L'hPL peut aussi jouer un rôle inhibiteur, plus récemment, Chiang et al. (1992 et 1993) ont montré que des injections au-delà d'une certaine concentration d'hPL (10 à 100 mg/rat/jours) à un jeune rat, inhibent la croissance de son cartilage de 25 %.

I - 1.3.2 Propriétés lactogéniques et mammotropiques

En 1963, Ehrard démontre l'existence d'une activité de type prolactinique dans des extraits placentaires. De nombreux auteurs ont par la suite prouvé l'activité lactogène de l'hPL, notamment Fukushima et al. (1961), Ito et al. (1961), Josimovich et al. (1962), Kaplan et al. (1965), Friesen al. (1965)...

En culture organotypique de tissu mammaire de souris immatures, l'adjonction d'hPL, en association avec l'insuline et l'hydrocortisone nécessaires au maintien et à la prolifération du tissu en culture, stimule la synthèse de divers types de caséine,, de lactoglobuline et de lactalbumine (Turkington et al, 1966 ; Topper et al. 1970 ; Byatt et al. 1992).

D'autres tests biologiques très sensibles de l'activité mammotrope et/ou lactogénique sont constitués par l'observation de l'hyperplasie du tissu mammaire, l'apparition de lait dans les canaux galactophores et la présence de lactose dans les sécrétions alvéolaires à la suite de l'injection intraductale d'hPL dans le tissu mammaire de la lapine pseudogestante [Josimovich et al. (1962), Franchimont et al. (1965), Friesen et al. (1976].

I - 1.3.3 Propriété lutéotrophique

L'hPL et l'hGH exerçant une activité lutéotrophique chez le rat et la souris [Josimovich et al. (1963), Kovacic et al. (1966), Florini et al. (1966)], une menstruation retardée pouvait être obtenue si l'on administrait de manière combiné hGH et prolactine. Mais l'hPL seul ne retardait que de deux jours le délai prémenstruel alors qu'une combinaison hCG-hPL entraînait un retard de 8 jours (Josimovich et al. 1968). Ce qui a montré que les deux hormones ont une action synergique pour maintenir la grossesse chez la rate, maintien qui dépend de l'intégrité du corps jaune gravide.

I - 1.4 Métabolisme énergétique et hormone lactogène placentaire

Le métabolisme de l'hPL est rapide. Différentes expériences réalisées sur le tissu placentaire en culture, ont montré une dégradation régulière du syncytiotrophoblaste, accompagnée d'une diminution rapide de la sécrétion de l'hPL [Gaspard et al. (1972, Golander et al. (1978)]. La demi-vie de l'hPL a été mesurée in vivo, grâce à la mesure de la vitesse de disparition de l'hPL plasmatique chez la femme, juste après la délivrance. En effet, d'après Grumbach et al. (1968), l'hormone aurait deux demi-vie de 15 et 47 minutes correspondant à deux formes circulantes. Ces résultats laissent penser que les taux sanguins d'hPL sont en rapport direct avec la capacité secrétoire du placenta en fonction de l'âge gestationnel. La disparition de l'hormone suit une double fonction exponentielle dont les demi-vies peuvent être calculées, elles sont de 12 et 72 minutes (Grumbach et al., 1968).

Ces observations indiquent que l'hPL est rapidement métabolisée, et que sa concentration initiale dans le sang ne modifie pas sa vitesse de dégradation. Reddy et al. (1975), chez la rate, ont confirmé la présence de deux demi-vie par injection de l'hormone radioactive.

Ces études permettent également d'extrapoler la production journalière de l'hPL. Elle serait de 0,3 à 1 gramme, ce qui correspond à une synthèse hormonale extrêmement importante représentant 10 % de la production des protéines placentaires (Seebourg et al., 1977 ; Barrera-Saldana et al., 1982).

La concentration de l'hPL chez la femme à terme est de l'ordre 5-15 ug/ml (Spellacy et al., 1966 ; Biswas et al., 1972 ; Braunstein et al., 1980).

Chez l'homme comme chez l'animal d'expérience, l'hPL présente incontestablement une activité somatotrope, mammotrope et lactogène.

I - 1.4.1 Métabolisme des glucides

Durant la grossesse, le métabolisme des hydrates de carbone subit de notables perturbations, des troubles jusque là latents, peuvent se révéler à l'occasion de la grossesse et disparaître dans le post-partum (diabète gestationnel).

Chez la femme diabétique enceinte, on trouve une insulinémie élevée, associée à une diminution de la tolérance aux hydrates de carbone. Chez la femme enceinte non diabétique, Cohen et al. (1973) ont montré l'existence d'une

ascension nette des taux de l'insulinémie durant le troisième trimestre de grossesse. Par ailleurs, la clairance de l'insuline chute de 3/4 de sa valeur normale en dehors de la période gravide passant de 0,45 ml/mn à 0,18 ml/mn, ce qui se traduit par une chute des taux d'excrétion urinaire de l'insuline.

Au cours de la grossesse, le métabolisme maternel s'adapte pour assurer une nutrition adéquate à la fois à la mère et à l'unité foeto-placentaire en cours de croissance. Tôt dans la grossesse, l'homoéostasie glucidique est modifiée par l'accroissement des taux d'oestrogènes et de progestérone qui conduit à une hyperplasie des cellules bêta des îlots de Langerhans, et à une augmentation de la réponse insulinique à une charge en glucose (Kalkhoff et al., 1979).

L'élévation de l'utilisation périphérique du glucose est responsable d'une diminution de 10 % de la glycémie à jeun de la mère vers la fin du premier trimestre. Vers la seconde moitié de la grossesse, l'élévation des concentrations d'hormone lactogène placentaire et d'autres hormones "contrainsuliniques" synthétisées par le placenta, modifie l'utilisation du glucose et des acides aminés chez la mère. La réponse glycémique à une charge glucidique orale ou intraveineuse est plus forte qu'en dehors de la grossesse. Les effets de l'hPL sont en partie responsables de l'"état diabétogène" de la grossesse, caractérisé par un accroissement du taux et de la quantité de sécrétion d'insuline au niveau de la cellule (Spellacy et al., 1969). L'insulinorésistance hépatique favorise la mobilisation des réserves hépatiques de glycogène et l'augmentation de la production hépatique de glucose qui repasse dans la circulation et sera utilisé par le foetus.

L'action diabétogène de l'hPL permet la mise en réserve des glucides maternels assurant ainsi au foetus un apport énergétique constant sous la forme de glucose facilement assimilable et cela quelque soit l'état métabolique de la mère (Cohen et al., 1973).

L'hPL agit avec l'hGH, la thyroxine (T4), les hormones surrénaliennes gluco-corticoïdes, les oestrogènes et la progestérone.

In vitro, Lasbenne et al. (1985) ont démontré que l'augmentation du taux du glucose provoque une chute des taux de sécrétion de l'hPL, or ce taux d'hPL est en fonction :

- de la biosynthèse de l'hPL dans les cellules placentaires,
- de l'excrétion de l'hPL tissulaire dans le milieu en culture,
- d'éventuelles dégradations de l'hPL dans les cellules.

Le taux élevé du glucose inhiberait l'excrétion de l'hPL préformé dans une premier temps, et la biosynthèse tissulaire dans un deuxième temps. Doit-on rattacher cette constatation au fait qu'il existe deux isomères de l'hPL (hPL1 et hPL2) comme l'ont démontré Belleville et al. (1972), Friesen et al.(1965).

L'inhibition de la néosynthèse serait spécifique à l'hPL alors que les autres biosynthèses placentaires seraient stimulées, donc présence d'un rapport hPL/protéines placentaires diminué. Il semble que le glucose intervienne par l'intermédiaire de ses métabolites et cette action serait biphasique :

- dans un premier temps, le glucose interviendrait au niveau de la membrane cellulaire pour permettre l'excrétion de l'hPL préformé,
- dans un deuxième temps, les produits de dégradation du glucose inhiberaient la biosynthèse de l'hPL dans la cellule placentaire.

L'interaction insuline-récepteur est responsable, au niveau du métabolisme cellulaire, d'une chute du taux de l'AMPc, d'une augmentation du GMPc, d'une stimulation de l'AMPc phosphodiestrérase et d'une phosphorylation de certaines protéines membranaires selon Chang et al. (1974).

L'insuline aurait donc deux actions différentes :

- l'une lente, passant par le GMPc et par les récepteurs à IGF_1 et contrôlant la multiplication cellulaire,
- l'autre rapide, passant par l'AMPc contrôlant les fonctions spécialisées des cellules.

Le glucose réglerait les taux intra-cellulaires de l'AMPc et les autres activités enzymatiques de la néoglycogénèse placentaire, dont les variations régleraient à leur tour les variations de la sécrétion et de la synthèse de l'hPL (Chang et al., 1974).

Nous noterons qu'au cours de la grossesse, il existe une augmentation croissante des taux de l'insulinémie, nécessaire au maintien de l'équilibre glycémique maternel, menacé par l'hypercorticisme, la sécrétion placentaire de

l'hPL, l'insulinorésistance des tissus périphériques pendant la grossesse et la destruction placentaire de l'insuline.

I -1.4.2 Le métabolisme des lipides

L'hPL entraîne une mobilisation et une libération des acides gras libres tant in vitro [Turtle et Kipnis (1976)], qu'in vivo chez le singe et le lapin (Riggi et al., 1966).

Parallèlement, on constate une libération de glycérol et une augmentation des corps cétoniques circulants, cet effet lipolytique et cétogène de l'hPL est cependant 50 fois plus faible que celui de hGH ; cette action lipolytique est tardive, n'apparaissant qu'environ 90 minutes après l'injection de l'hPL, semblant dépendre de l'activation DNA-RNA.

Leake et al. (1969) suggèrent que l'hPL accroît le métabolisme général du tissu adipeux et selon les circonstances, il serait responsable soit d'une lipolyse, soit d'une lipogénèse. Ainsi, en période post-prandiale, l'hPL provoque une augmentation de l'utilisation du glucose par le tissu adipeux en vue d'une lipogénèse et de la ré-estérification des acides gras libres tandis que l'activité lipolytique serait prédominante chez les sujets à jeûn.

L'hPL exercerait une activité lipolytique plus marquée sur le tissu adipeux de la femme enceinte que chez la femme non enceinte, in vitro, selon Williams et al. (1978). Cette action lipolytique n'apparaît qu'entre la deuxième et la sixième heure après l'injection intra-musculaire d'hPL, selon Grumbach et al. (1973), elle n'existerait pas avant la première heure selon Berle et al. (1974), ni après la deuxième heure d'après Beck et al. (1965).

L'état gravidique s'accompagne donc d'une élévation des taux plasmatiques d'acides gras libres liée à une élévation des lipides sanguins. Le jeûn prolongé chez la femme enceinte provoque une augmentation des taux sériques de l'hPL. Le glucose maternel ainsi économisé est utilisé secondairement par le foetus selon Tyson et al.(1971) expliquant l'état d'insulino-résistance.

I - 1.5 La régulation de la sécrétion de l'hPL

Le taux maximal de sécrétion de l'hPL se situe entre la 32ème et la 36ème semaine d'aménorrhée, puis il chute progressivement jusqu'à l'accouchement, or pendant ce temps, le poids placentaire augmente toujours.

Belleville, en 1972, étudiant la sécrétion et la biosynthèse de l'hPL sur des explants placentaires en culture conclut que :

- le taux de production de l'hPL est supérieur à 1000 ng/ml de milieu de culture pendant 4 jours puis diminue du 12ème au 16ème jour jusqu'à un taux de 100 ng/ml,
- la demi-vie de l'hPL dans le sang maternel est de 13 minutes, confirmant les travaux de Samaan et al. (1970)
- la valeur de l'hPL en fin de grossesse varie dans de larges proportions (4000 à 9000 ng/ml),
- l'hPL néosynthétisé est sécrété plus vite dans le milieu de culture que les autres protéines placentaires néosynthétisées. Donc, pour une période de 1 à 48 heures, l'hPL néosynthétisé est préférentiellement ou sélectivement sécrété dans le milieu de culture. Il ne semble pas y avoir d'autorégulation de la sécrétion de l'hPL à la différence avec hGH et PRL.

I - 1.5.1 Rôle du glucose

Il semble que le glucose joue un rôle dans la régulation de la sécrétion de l'hPL. Ceci est démontré par les variations d'hPL selon le statut glucidique de la femme enceinte (Lasbennes et al., 1977) et par des expériences in vitro où le taux de glucose modifie la sécrétion d'hPL par des explants placentaires (Belleville et al., 1974). Notamment, Belleville et al. (1978) ont montré que le glucose diminuait la concentration de l'hPL. Gaspar (1980) arrive à la conclusion que l'hyperglycémie chez la femme enceinte entraîne effectivement une inhibition significative des taux de l'hPL.

Certains facteurs protéiques que l'on trouve dans le sérum de femmes et d'hommes normaux, mais qui se trouvent augmentés au cours de la grossesse, semblent stimuler la sécrétion de l'hPL in vitro (Barrett et al., 1986).

Devant l'incapacité d'établir un schéma de régulation de l'hPL, certains chercheurs ont pensé à une synthèse et une sécrétion autonomes de l'hPL, qui ne

seraient liées qu'à la croissance du placenta, au cours de la grossesse, sans aucune participation de facteurs de régulation (Sciarra et al., 1968 ; Saxema et al., 1969 ; Spellacy et al., 1971 ; MacWilliams et al., 1977 ; Boime et al., 1982). Cependant, il semble étonnant qu'une hormone, dont la synthèse estimée est de l'ordre du gramme par jour, ne soit pas régulée.

I - 1.5.2 Rôle de l'adrénaline et de la noradrélanine

Les effets des catécholamines sur la sécrétion de l'hPL in vitro, dépendent des doses utilisées. A des taux de 10^{-10} mol/ml, on constate une décroissance importante de la sécrétion de l'hPL mais à des taux de 10^{-6} mol/ml ; cette inhibition est moins évidente.

Pergame a démontré que l'élimination urinaire des catécholamines est indépendants de l'évolutiondu taux de l'hPL.

Moneda, en utilisant la dopamine à des taux de 5 à 10 mmol/ml, provoque une baisse de la sécrétion de l'hPL, laquelle est augmentée si on ajoute du glucose (200 mg).

I - 1.5.3 Action de l'oestriol et de la progestérone

Il semble, selon Lasbennes et al. (1977) que c'est la sécrétion croissante des stéroïdes qui serait le facteur déclenchant de la synthèse et de la sécrétion de l'hPL. Or, in vitro, la sécrétion de l'hPL pour un placenta de deux mois est aussi importante que celle d'un placenta à terme. Tout se passe comme si, in vivo, il existait un inhibiteur d'origine extra-placentaire puisque, in vitro, l'action de cet inhibiteur de la sécrétion de l'hPL n'intervient pas.

En fin de grossesse, le taux d'oestriol est de 80 ng/ml et celui de la progestérone de 160 ng/ml. La courbe de l'oestriol est ascendante jusqu'à l'accouchement, celle de la progestérone est stable à partir de la 36ème semaine puis chute lors du travail et plus encore lors de la délivrance.

I - 1.5.4 Autres facteurs pouvant intervenir dans la régulation de l'hPL

Lai et al. (1984) ont montré que certains facteurs de croissance épidermique augmentent de façon faible la sécrétion de l'hPL à partir d'une culture cellulaire de placenta. Handwerger et al. (1981), ont montré qu'il y a une augmentation de la

sécrétion de l'hPL, à partir d'explants placentaires, sous l'effet d'acide arachidonique.

Plus récemment, Polliotti et al. (1990) ont montré que le calcium stimule la sécrétion de l'hPL et de l'hGH contrairement à ce qui a été démontré par Handwerger et al. en 1981.

I - 1.6 L'intérêt du dosage de l'hPL au cours des grossesses

La surveillance des taux de l'hPL au cours de la grossesse peut se faire par différentes méthodes de dosage, notamment :

- les méthodes biologiques,
- l'immunodiffusion radiale (Mancini),
- les méthodes immunologiques avec tout particulièrement la radio-immunologie (Beck et al., 1965) et l'immunoenzymologie (Vanhell et al., 1978 et 1979).

Aujourd'hui le dosage d'hPL est effectué par RIA. Cette méthode est très sensible et facilement reproductible, elle est utilisable dès la 10ème semaine de grossesse. Le taux d'hPL est exprimé en nanogramme par millilitre de plasma (ng/ml) rapporté à l'âge gestationnel exprimé ici en semaine de grossesse. Récemment, un nouveau test plus sensible et précis, mis au point par Khvedchenia et al., (1990) est commercialisé sous forme d'un kit "Rio-PL-125 (USSR).

Le dosage de l'hPL est considéré comme un indice de la fonction placentaire et de nombreux auteurs l'utilisent en routine pour surveiller la grossesse. Spellacy et al. (1971), en étudiant une série de grossesses normales, ont défini une zone de normalité de l'hPL (Figure 3).

Plusieurs auteurs (Barbier et Teischer, 1974 ; Cohen et al., 1970 ; Daffos et al., 1981 ; Haour et al., 1971 ; Lilford et al., 1983 ...) accordent aux dosages d'hPL une valeur pronostique de souffrance foetale lorsque les taux diminuent. Les limites de normalité déterminées au cours des grossesses normales sont sensiblement identiques d'une série à l'autre, en revanche les différents auteurs ne se basent pas toujours sur les mêmes valeurs pour définir le risque foetal.

Daffos et al. (1983) reprenant les travaux de Spellacy définit 4 zones de risque foetal différent correspondant sur le plan pathologique à une date

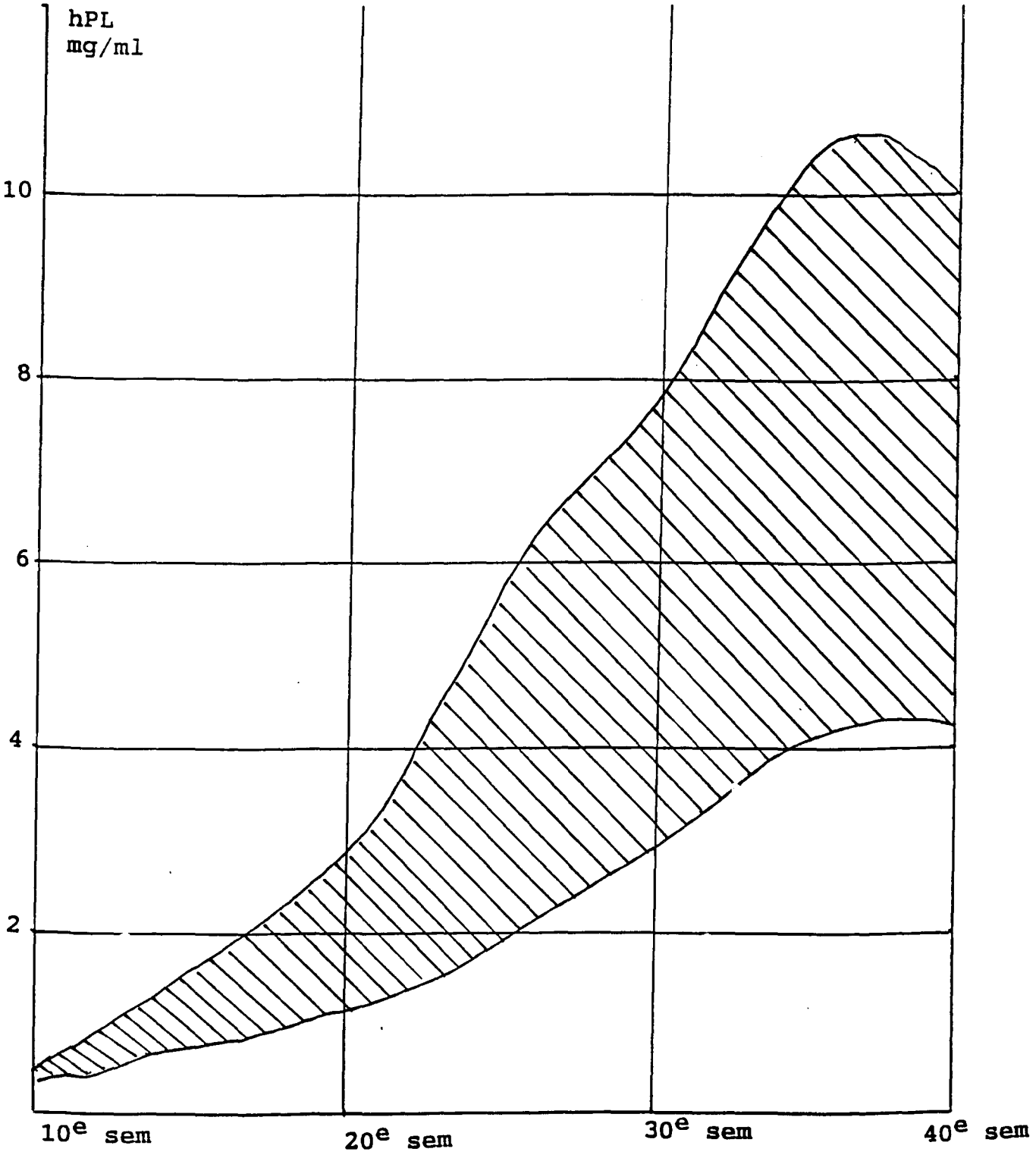


Figure 3 :

Zones (\\\\\\) représentant des valeurs normales de l'hPL chez la femme en fonction du nombre de semaines de grossesse.

(Edition Laboratoire Organon. Teknica)

d'apparitiion plus ou moins précoce de l'insiffisance placentaire et donc à un retentissement plus ou moins important sur le foetus (Figure 4).

Zone 1 - Un taux d'hPL > 3,5 mg/l, quel que soit le terme de la grossesse, n'est pas inquiétant si les autres paramètres de la grossesse sont normaux.

Zone 2 - Un taux d'hPL entre 2,5 et 3,5 mg/litre à partir de 28 semaines de grossesse est un critère de très haut risque foetal.

Zone 3 - Un taux d'hPL < 2,5 mg/l après 32 semaines doit faire envisager une extraction rapide du foetus car il annonce une mort foetale imminente.

Zone 4 - Un taux d'hPL < 2,5 mg/l entre 28 et 32 semaines laisse entrevoir une issue fatale avant toute possibilité d'extraction foetale.

Daffos et al. (1983) s'intéressent ici uniquement aux grossesses avec syndrome vasculo-rénal et ne tiennent compte que des résultats très pathologiques d'hPL afin d'obtenir un critère plus spécifique d'une souffrance foetale grave. Letchworth et al. (1972) considèrent qu'un taux d'hPL inférieur à 4 ug/ml est prédicatif dans 71 % des cas de la survenue d'une souffrance foetale aiguë ou d'une détresse néonatale. Haour et al. (1971) considère qu'un taux d'hPL inférieur à 5 ug/ml correspond à une menace de souffrance foetale. Barbier et al. (1977) définient une "zone de danger foetal", qui à partir d'un taux inférieur à 4 ug/ml après la 30ème semaine mais uniquement dans les toxémies gravidiques, alors que dans la population générale, les résultats sont à interpréter différemment en fonction de la pathologie concernée.

I - 1.7 Gènes de l'hPL

En 1980, Overbach et al. ont montré que les gènes humains codant pour la prolactine, l'hormone de croissance et l'hormone lactogène placentaire proviennent d'un ancêtre commun par duplications successives dont la première aurait eu lieu il y a environ 400 millions d'années. Un premier événement aurait produit les gènes de hGH et de prolactine ; une seconde duplication du gène de l'hGH ayant plus récemment fait apparaître le gène d'hPL. Cette hypothèse a pu récemment être réevaluée à la lumière des informations nouvelles apportées par des études de biologie moléculaire. Ces études ont, en quelques années, permis de connaître la

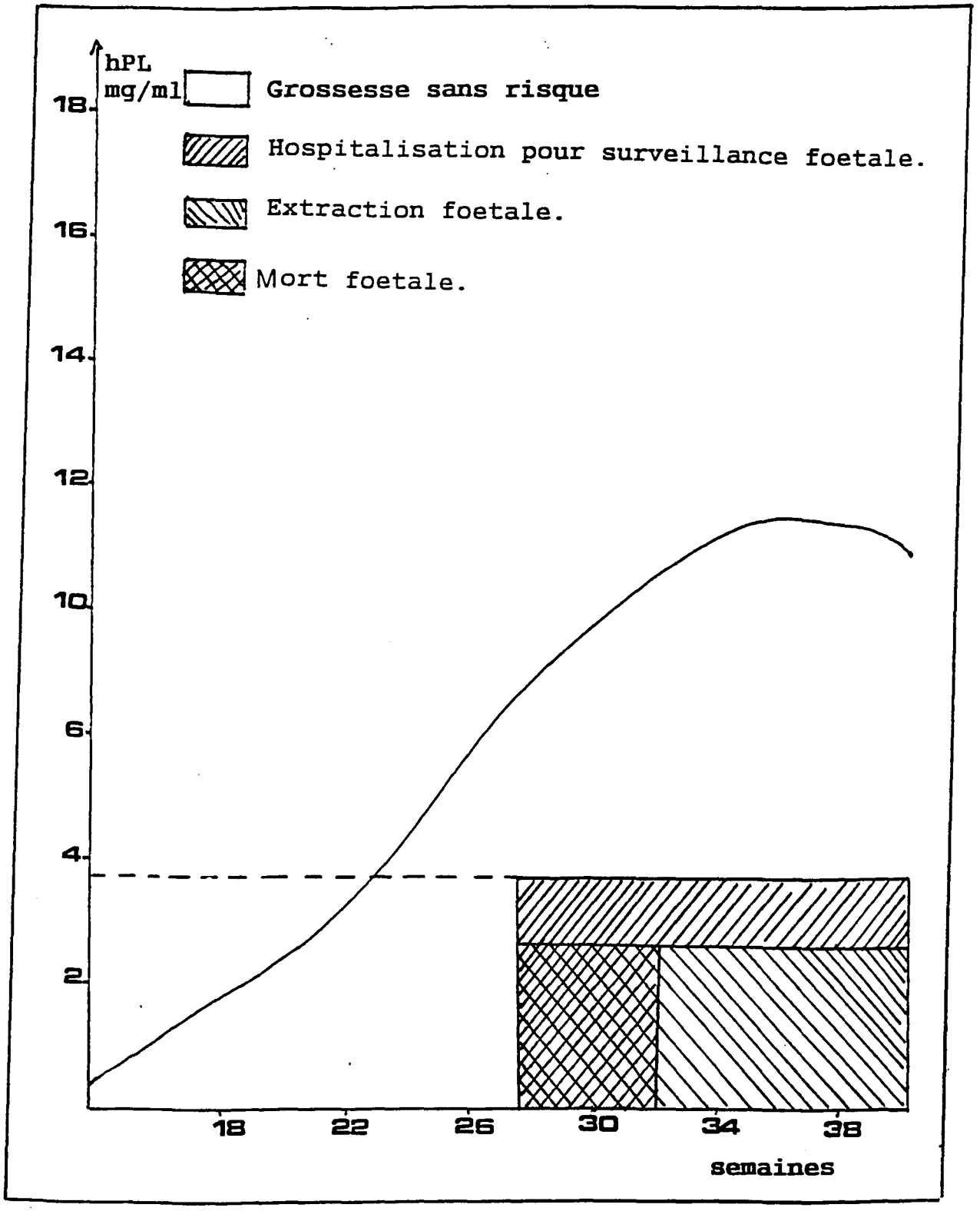


Figure 4 :

Zone de risque foetal et attitude thérapeutique adaptées en fonction des taux de l'hPL pendant la grossesse (d'après Daffos et al., 1983).

structure et l'organisation des locus GH/PL et PRL chez l'homme et certains mammifères (Barsh et al., 1983 ; Chen et al., 1989).

Les cDNA humains d'hGH et hPL, copies des ARN messagers spécifiant les polypeptides correspondants, ont été, dès 1979, parmi les premières séquences géniques à avoir été isolées par clonage moléculaire (Martial et al., 1979 ; Roskam et al, 1979 ; Shine et al., 1977 ; Hirt et al., 1987).

L'hGH et l'hPL partagent au niveau de leurs séquences en acides aminés 85 % d'homologie et l'analyse des cDNAs a révélé que cette homologie est supérieure (92 %) entre leurs ARN messager. Chaque gène possède 5 exons et 4 introns, de tailles et de séquence voisines ; il existe 95 % d'homologie entre les gènes d'hPL et d'hGH et 41 % entre les gènes d'hPL et de PRL (Walker et al., 1991). Les trois protéines partagent également des traits immunologiques et fonctionnels, mais sont sous l'influence d'un contrôle métabolique et hormonal propre à chacune.

Malgrè leur similitude, ces gènes sont exprimés dans des tissus différents : l'hGH et la PRL sont sécrétées respectivement par des cellules somatotropes et lactotropes de l'anté-hypophyse tandis que l'hPL est sécrétée par le syncytiotrophoblaste placentaire.

Ces gènes sont localisés sur des chromosomes différents. Le gène de la prolactine est situé sur le chromosome 6 ; les gènes de l'hPL et de l'hGH forment une batterie de gènes, s'étendant sur une portion d'ADN de 60 Kb (Barsh et al., 1983), située sur le chromosome 17. Il existe deux gènes pour l'hGH et trois gènes pour l'hPL ; tous dans la même orientation, du point de vue transcriptionnel. Le gène hGH1 code pour l'hormone hypophysaire normale de 22 000 ; le gène hGH2 code pour un variant qui peut être exprimé in vitro, dans les cellules transfectées par ce gène, mais ne semble pas s'exprimer in vivo.

Deux parmi les quatres gènes de l'hPL (hPL3 et hPL4) sont transcrits et codent la même hormone mature, excepté au niveau d'un acide aminé du peptide signal. L'analyse des ARNm montre que ces deux gènes sont transcrits en deux messagers distincts dans des proportions de 60 % pour l'hPL3 et 40 % pour l'hPL4 (Barrera-Saldana et al., 1983). Le gène hPL1 apparaît être un pseudogène non exprimé in vivo (Selvanayagam et al., 1984) qui, cependant, est capable, in vitro, d'être transcrit.

Un déficit complet en hPL chez un sujet s'est révélé être causé par une délétion homozygote des gènes hPL3, hPL4, hGH2.

Une séquence "enhancer" dans la région 3' du gène hPL3 a été identifiée (Rogers et al., 1986 ; White et al., 1989). Pour eux, la synthèse accrue dans le

placenta à terme, d'ARNm spécifiques de hPL3, serait en étroite relation avec l'existence de cet enhancer.

Toutes ces études concernant les gènes de l'hPL renforcent l'idée que la régulation de la biosynthèse de l'hPL est susceptible d'avoir lieu au niveau de la transcription. On a pu mettre en évidence des sites d'hypersensibilité à l'ADNase, localisés en 5' du gène hPL3 (entre hPL1 et hPL3), qui sont absents dans l'hypophyse et présents dans le placenta.

Ces résultats indiquent que, dans le placenta, la chromatine est, à ce niveau, en configuration ouverte et que les gènes hPL y sont transcriptionnellement actifs, au contraire de l'hypophyse.

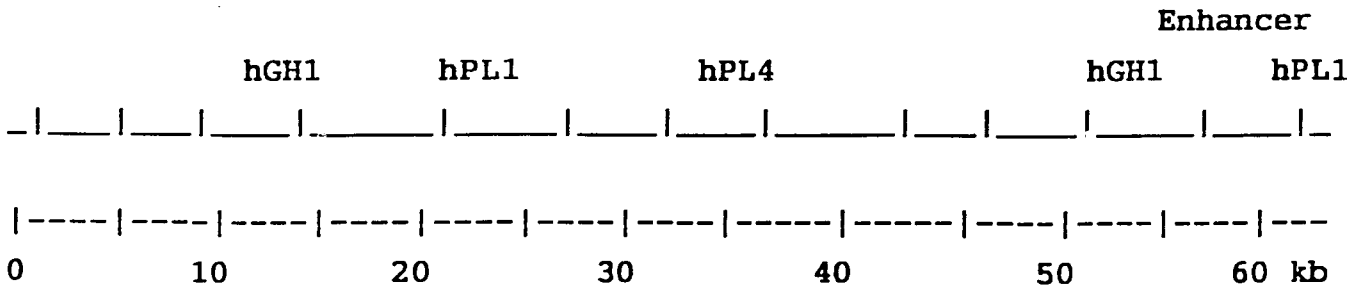


Schéma représentant la batterie des gènes de l'hPL et l'hGH, sur une portion d'ADN d'environ 60 Kb (d'après Rogers et al., 1986).

I - 2 Notions d'immunochimie

I - 2.1 Synthèse des anticorps

Le système immunitaire assure la défense de l'organisme et le maintien de l'intégrité du soi. D'une grande complexité, il met en jeu de multiples composants qui interagissent et coopèrent à la production de réponses adaptées. L'une de ses principales fonctions est la reconnaissance du soi et du non soi.

L'évolution a fait apparaître à côté d'une défense non spécifique assurée par les cellules phagocytaires, des réponses spécifiques impliquant au départ la reconnaissance d'un élément étranger ou antigène.

Ces défenses spécifiques permettent également un processus de mémorisation. Ainsi, lors d'une exposition ultérieure au même antigène, cette mémoire permettra la mise en place d'une réaction plus rapide et plus intense.

Les cellules clefs de l'immunité sont les lymphocytes B et T qui se distinguent par les marqueurs immunologiques différents et une maturation différente dans l'organisme.

La fonction des lymphocytes B est de sécréter des anticorps après différenciation. Un lymphocyte B donné, fabrique des anticorps ne reconnaissant qu'un seul et unique déterminant antigénique.

La reconnaissance des éléments étrangers se fait par des récepteurs spécifiques qui sont en fait des molécules d'anticorps particulières avec une partie hydrophobe ancrée dans la membrane cellulaire.

Un niveau correct de réponse immunitaire nécessite la coopération des cellules B et T. Les lymphocytes T constituent une population hétérogène avec des sous-populations distinctes : cellules T cytotoxiques, cellules T auxilliaires et cellules T suppressives qui modulent et contrôlent les réactions immunitaires.

I - 2.2 Structures des anticorps

La structure de base des anticorps est une unité comportant quatre chaînes protéiques. Deux chaînes dites lourdes (H), deux chaînes légères (L). La plupart des vertébrés ont deux types de chaînes légères k et . Il existe un plus grand nombre de chaînes lourdes (μ, α , γ , δ , ε) qui donnent aux anticorps leurs caractéristiques de classe et d'isotypie (immunoglobuline M, A, G, D, E respectivement), ainsi que leur caractéristiques fonctionnelles dans la défense de l'organisme. Chaque type de chaîne lourde peut se combiner avec chaque type de chaîne légère. Dans une même molécule d'immunoglobuline, les 2 chaînes lourdes sont identiques entre elles, les deux chaînes légères également. Chaque type de chaîne lourde ou légère comporte une région constante (CL et CH) et une région variable (VL et VH) (Figure 5).

Chaque immunoglobuline (sauf les IgGM qui n'en comportent qu'un) comporte deux sites de fixation du déterminant antigénique. Chacun de ces sites met à contribution les zones hypervariables d'une chaîne lourde et d'une chaîne légère. L'ensemble des différentes combinaisons VH et VL est à la base de la diversité des anticorps. Après une vaccination, les premiers anticorps sécrétés sont les immunoglobulines M (IgM). Les autres classes d'anticorps, en particulier les IgG, n'apparaissent qu'en cas de rappel de vaccination, donc lors d'un second contact avec l'antigène. Des immunoglobulines sont capables d'activer le

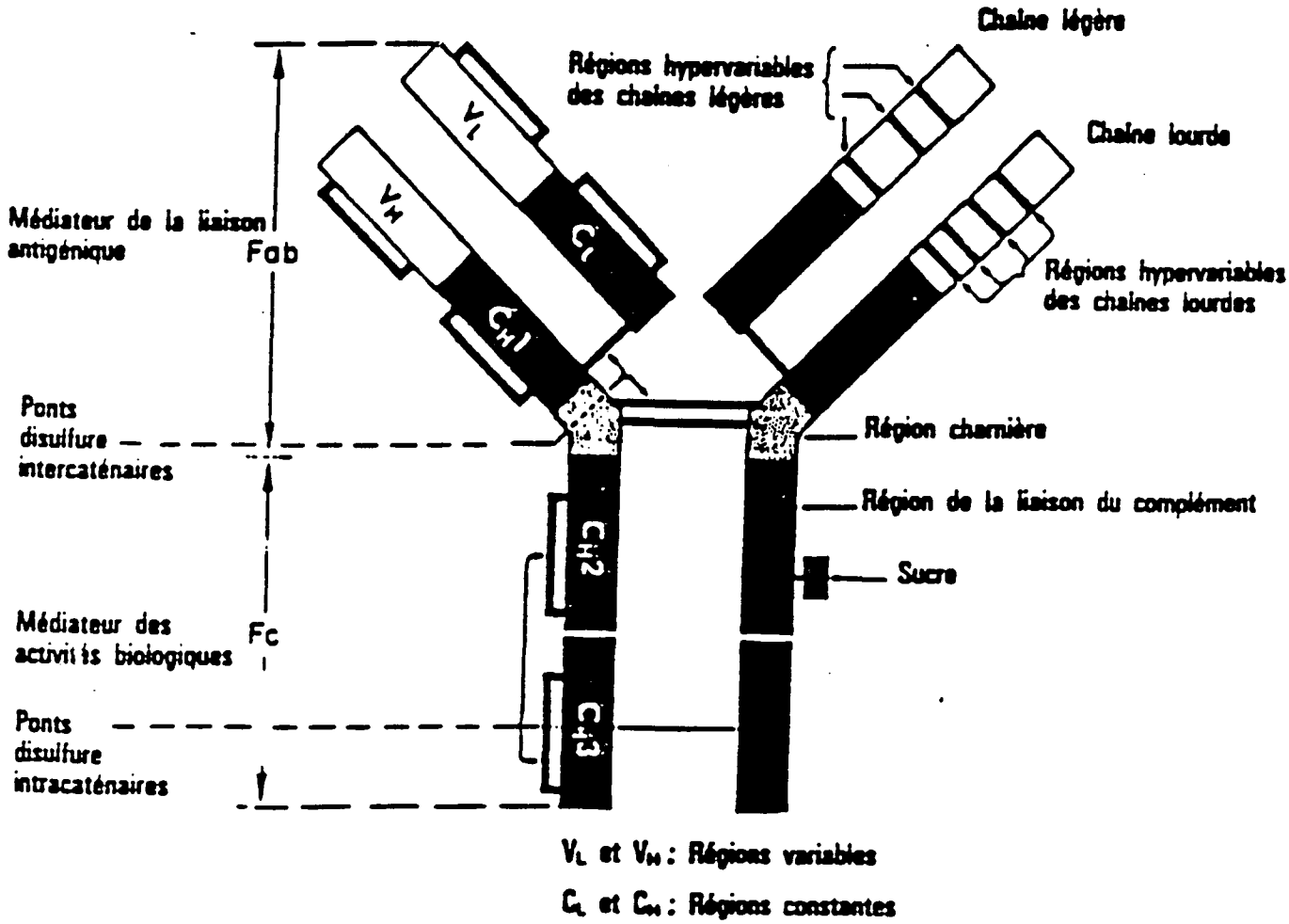


Figure 5 :

Structure de la molécule d'IgG d'après Wasserman et Capra (1977).

complément et participent de façon efficace à la lutte antibactérienne et anti-cellulaire.

La fonction des IgD est inconnue. Les IgE se fixent spécifiquement sur les mastocytes et déclenchent les phénomènes allergiques. La nature des forces de liaison antigènes-anticorps relève des interactions entre protéines. Ce sont des forces de liaison non covalentes, les liaisons antigènes-anticorps sont donc de nature réversible.

I - 2.3 Les anticorps monoclonaux

Les anticorps monoclonaux sont des anticorps parfaitement homogènes tant par leur structure que par leur spécificité. Ils sont produits par un clone de cellules, c'est-à-dire par des cellules toutes identiques entre elles.

Lorsqu'on immunise un animal avec un antigène même très purifié, on active de nombreux lymphocytes, chaque lymphocyte reconnaît au niveau de la molécule d'antigène, un déterminant unique. Les anticorps excrétés sont donc hétérogènes, ils forment un mélange. Pour avoir des anticorps monoclonaux, il faut isoler un seul clone de cellules plasmocytaires spécifiques d'un déterminant d'un antigène donné. On sait obtenir des plasmocytes spécifiques d'un antigène choisi et les isoler, mais on ne sait pas les faire "pousser". D'autre part, il est possible de cultiver indéfiniment des cellules excrétrices d'anticorps : les plasmocytes myélomateux, qui produisent des anticorps dont la spécificité est difficile à identifier. Ces observations sont à l'origine de deux principales voies de production d'anticorps monoclonaux :

- l'utilisation de cellules spécifiques de l'antigène et leur immortalisation par infection par un virus,
- la "fabrication" d'hybridomes (Figure 6) : l'idée est de faire fusionner deux types de cellules, les unes spécifiques d'un antigène (lymphocytes), les autres myélomateuses et donc immortelles, de façon à obtenir une cellule unique comportant un double génome. L'hybride est susceptible d'être cultivé indéfiniment et d'excréter des anticorps grâce à l'information génétique apportée par le plasmocyte. Ces anticorps sont spécifiques de l'antigène. C'est en 1975 que Kohler et Milstein fusionnèrent pour la première fois des lymphocytes spléniques de souris et des cellules myélomateuses de souris. Le résultat de la fusion fut appelé "hybridome".

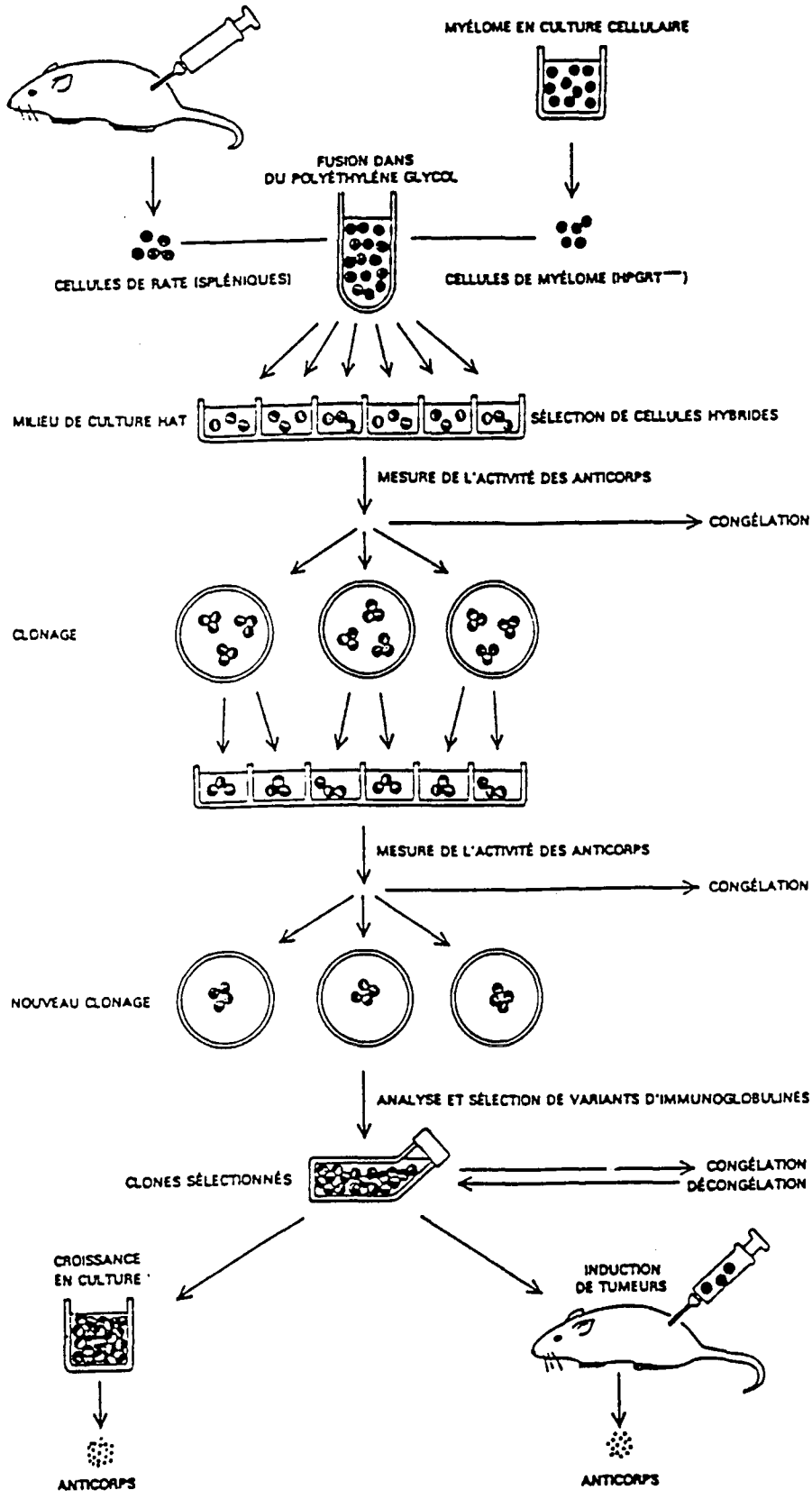


Figure 6 :

Principales étapes de la technique d'obtention d'anticorps monoclonaux : immunisation, fusion des lymphocytes spléniques avec des cellules de myélome, sélection de cellules hybrides, criblage, clonage, identification et production de masse des anticorps.

I - 2.3.1 La fusion cellulaire

La fusion cellulaire est réalisée par le polyéthylène glycol (Pontecorvo, 1975), qui permet l'agglutination des cellules et la formation de ponts intercellulaires par lesquels vont s'opérer les échanges chromosomiques. On obtient une cellule à plusieurs noyaux. La fusion nucléaire s'opérera lors de la division cellulaire ultérieure. L'hybridome viable n'a qu'un noyau mais deux génomes.

I - 2.3.2 Les hybridomes souris-souris

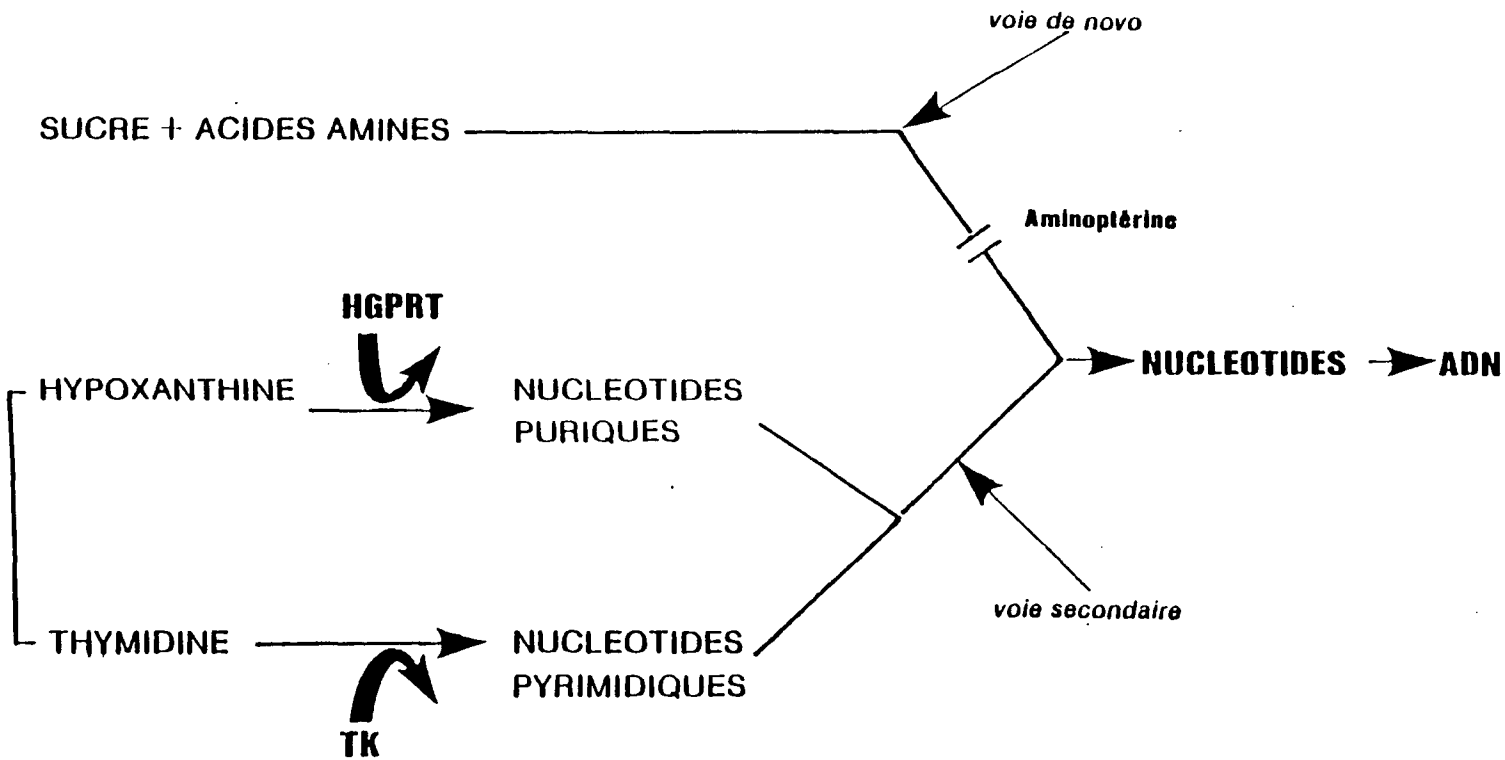
Les cellules myélomateuses à fusionner doivent présenter certaines particularités :

- ne pas synthétiser d'autres chaînes d'immunoglobulines. Ainsi, toutes les immunoglobulines excrétées par l'hybridome auront la spécificité apportée par la cellule lymphoïde.
- être déficientes en un enzyme, l'hypoxanthine-guanine-phosphoribosyl-transférase (H.G.P.R.T.). C'est par cette déficience que s'effectuera la sélection entre cellules murines et cellules murines fusionnées avec les lymphocytes : Les lymphocytes seuls meurent normalement au bout de quelques jours en culture.

Pour comprendre ces choix, il faut savoir qu'une cellule utilise deux voies de synthèse des acides nucléiques.

- une voie principale de synthèse "de novo"
- une voie de secours à partir des bases préformées. Dans cette voie, l'H.G.P.R.T. intervient en transformant de la guanine (ou de l'hypoxanthine) en guanosine mono-phosphate (ou en xanthosine monophosphate).

La présence d'un inhibiteur, l'azasérine bloque la voie principale de synthèse des acides nucléiques. Pour subsister, la cellule doit donc utiliser la voie de secours. Les cellules myélomateuses sont déficientes en H.G.P.R.T., les lymphocytes en contiennent. L'hybridome utilisera donc cette voie de secours. Un milieu de culture contenant azasérine et hypoxanthine permettra donc la survie et le développement des hybridomes exclusivement (Figure 7).



TK = thymidinekinase
HGPRT = hypoxanthine, guanine, phosphoribosyltransférase

Figure 7 :

Les différentes voies de syntnèse de l'acide désoxyribonucléique.

I - 2.4 Antigènes, nature des sites immunoréactifs

I - 2.4.1 Généralités

Les groupes chargés semblent représenter un facteur essentiel de la spécificité d'un anticorps pour un antigène, par rapport aux groupements neutres, moins impliqués. La "spécificité" d'un groupement antigènique dépend à la fois de sa composition chimique et de son orientation dans l'espace (Bach, 1986).

Toute protéine de masse moléculaire suffisante (c'est-à-dire supérieure à 10 KDa) peut être antigénique. Selon l'intensité de la réponse immunitaire, on parle d'antigène fort ou faible. Les facteurs chimiques entraînant un changement de la conformation de protéines modifient l'antigénicité. L'immunogénicité d'une protéine dépend :

- de la masse moléculaire de la protéine,
- de l'exposition et de l'accessibilité des déterminants à la surface de la protéine,
- le remplacement d'un seul amino acide, au sein d'un déterminant antigénique donné, peut altérer de façon importante la réponse immunitaire des structures tertiaires et quaternaires des protéines.

On distingue des déterminants antigéniques séquentiels (c'est-à-dire qui dépendent strictement de la nature et de l'ordre d'enchaînement des acides aminés de la chaîne peptidique) et les déterminants antigéniques conformationnels (qui dépendent de la structure spatiale de la protéine). L'existence de tels déterminants antigéniques peut expliquer que souvent des peptides issus de la protéine native soient mal reconnus par les anticorps, même s'ils contiennent tous les résidus constitutifs du déterminant antigénique.

I - 2.4.2 Prédictions des zones antigéniques

Kyte et al. (1982) ont mis au point une méthode permettant de définir un critère "d'hydropathie" locale des protéines pour établir une échelle empirique de valeurs des propriétés hydrophiles et hydrophobes de chaque acide aminé.

Un programme de calcul évalue continuellement "l'hydropathie" moyenne de segments d'un nombre donné d'acides aminés le long d'une chaîne peptidique, de l'extrémité N terminale à l'extrémité C terminale. Ce calcul permet d'obtenir le profil d'hydropathie de chaque protéine en fonction de sa séquence.

Pour attribuer ces valeurs d'hydropathie à chacun des acides aminés, Kyte et al. (1982) ont déterminé les coefficients de partition des chaînes latérales des acides aminés entre l'eau et une phase vapeur. De plus, les auteurs ont également tenu compte de la tendance des chaînes latérales d'acides aminés à préférer l'extérieur à l'intérieur des protéines globulaires (Chotia et al., 1976), l'intérieur des protéines ayant une tendance plutôt hydrophobe, l'extérieur plus hydrophile.

L'utilisation de cette méthode de calcul pour la prédiction de l'hydropathie des protéines de structure connue a permis d'en vérifier la validité.

A partir de ce genre de prédiction "d'hydropathie" des protéines, Hopp et al. (1981), ont mis au point une méthode qui prédit la localisation des déterminants antigéniques des protéines. Cette méthode ne prédit pas la localisation d'élélments structuraux particuliers sur une chaîne peptidiques, mais établit une corrélation entre le positionnement de certaines zones peptidiques et un site de liaison préférentiel de l'anticorps. L'analyse des séquences d'acides aminés permet de trouver des valeurs de "haute hydrophilie locale". A chaque acide aminé est associé une valeur numérique proposée par Hoop et al. (1981) qui tiennent compte de calculs de valeurs d'hydrophilie-hydrophobie. Ces valeurs sont modifiées par Hoop et Woods, compte tenu des travaux de Levitt et al. (1976) sur les effets des solvants, eux-même basés sur les valeurs d'hydrophobie des acides aminés estimées par Nozki et al. (1971). En effet, de nombreuses études ont montré que les déterminants antigéniques sont des zones protéiques généralement exposées aux solvants et que les chaînes latérales d'acides aminés chargés et hydrophiles sont souvent des déterminants antigéniques.

I - 2.5 Application des anticorps monoclonaux

Les possibilités d'application, nombreuses et essentielles, qu'apportent les anticorps monoclonaux dans des domaines très variés (de la biologie cellulaire à la recherche bio-médicale de pointe) donnent aux hybridomes une place, actuellement, fondamentale. Ils sont, à ce jour, le seul vecteur efficace de production d'anticorps monoclonaux.

Les premières réflexions sur l'usage des anticorps monoclonaux en thérapeutique remontent aux années 1979-1980.

Dans un premier temps, il apparaissait tentant de tirer profit de la spécificité unique de ces anticorps pour envisager d'éliminer une population cellulaire

spécifique, sans toucher aux populations voisines, dépourvues d'un antigène donné. Cette approche apparaissait particulièrement judicieuse pour les cellules de l'immunité, riche en déterminant spécifiques de telle ou telle sous-population. Le problème essentiel résidait dans la nature et le degré de l'élimination cellulaire après injection in vivo d'un anticorps monoclonal donnée. En effet, l'injection d'un anticorps monoclonal "nu" pouvait, théoriquement, entraîner l'élimination des cellules concernées par deux mécanismes distincts :

- lyse complément-dépendante par activation du complément humain,
- clairance par le système réticulo-endothélial grâce aux récepteurs Fc, particulièrement denses dans le poumon, le foie et la rate

Très vite il fut réalisé que, sauf cas exceptionnel, la très grande majorité des anticorps monoclonaux n'activait pas le complément humain in vivo, même si ce dernier pouvait s'y fixer.

De même, la clairance par le système réticulo-endothélial était le plus souvent incomplète et imprévisible ; ceci étant pour partie lié à des variabilités génétiques et pour partie lié à une saturation peu prévisible des récepteurs Fc par des complexes circulants.

De cette époque, date donc l'idée d'"armer" les anticorps afin de leur conférer la possibilité de délivrer un "coup fatal" à la cellule ciblée par leur spécificité.

Maintenant, les anticorps monoclonaux ont un vaste champ d'application. On peut distinguer, cependant, 5 domaines d'importance :

I - 2.5.1 Détection par anticorps monoclonaux d'antigène de surface cellulaire

De nombreux travaux ont été initialement réalisés sur des problèmes d'histo-compatibilité au sein du système majeur d'histocompatibilité cellulaire (MHC) (Smilek et al., 1980 ; Edwards et al., 1980 ; Eisenbarth et al., 1981 ; Allen et al., 1989 ; Oprandy et al., 1989 ; Umeda et al., 1991 ...).

La seconde avancée apportée par les anticorps monoclonaux a été l'étude intensive de la classification des lymphocytes, notamment humains. Le même effort a porté sur les lymphocytes du rat, de la souris et des bovins.

Des cellules d'autres tissus ont été étudiées au plan de leurs différences antigéniques, grâce aux anticorps monoclonaux. On peut noter des études sur les récepteurs Fc de la souris, les cellules rétiniennes du rat ou du poulet.

Les AcM jouent un rôle essentiel dans la détection de molécules qui agissent de façon significative au niveau des interactions intercellulaires durant des phases du développement, ou bien qui jouent un rôle dans la différenciation de fonction cellulaires.

I - 2.5.2 Détection par AcM d'antigènes associés à des tumeurs

Dans ce domaine, l'accent est mis sur la caractérisation des antigènes associés aux tumeurs, le but étant de pouvoir distinguer les cellules malignes des cellules normales et ce, dès leur apparition. L'application clinique est la détection précoce de ces tumeurs en vue de développer une thérapie adéquate qui pourraît être fondée parfois sur ces mêms AcM. On peut citer des travaux sur les mélanomes, le cancer du colon et du poumon, la leucémie... (Herlyn et al., 1979 ; Ritz et al;, 1980 ; Minna et al., 1981 ; Creaven et al., 1991 ; Rathjen et al., 1991 ; Zhu et al., 1991).

I - 2.5.3 Détection d'hormones par AcM

De nombreuses publications (Gomez et al., 1979 ; Ivanyi et al., 1980 ; Tu et al., 1991) traitent de la possibilité de détection d'hormones et de facteurs de croissance par anticorps monoclonaux permettant d'isoler et de caractériser les récepteurs qui jouent un rôle si important dans la régulation de la croissance cellulaire et dans sa différenciation.

Des publications sur l'acétylcholine, la substance P, l'hormone de croissance humaine, ... illustrent ces efforts.

I - 2.5.4 Virus

L'usage d'AcM a permis une analyse des structures et des variations de la structure génétique de protéines variables des virus, par exemple le virus du SIDA. Les études sur ce sujet illustrent la puissance des AcM comme moyen de détection (Gurney et al. 1989). Il a pu être détecté 40 à 50 groupements antigéniques sur l'enveloppe de ce virus (Okunoy et al., 1993).

I - 2.5.5 Intérêt dans les dosages immuno et radio-immunologiques

Les dosages radio-immunologiques sont dépendants de l'antisérum utilisé qui reconnaît une partie antigénique de la molécule qui n'est pas forcément la partie biologiquement active. L'antisérum polyclonal est soumis à certaines variations du fait de l'imprévisibilité, de l'imprécision et de l'hétérogénicité de la réponse immunitaire chez l'animal. L'affinité et la quantité d'Ac obtenues varient souvent d'un animal à l'autre et d'une immunisation à l'autre. Le sérum le plus spécifique possible contient toujours différents Ac ayant des affinités différentes pour l'Ag, différentes classes ou sous-classes d'immunoglobulines avec des spécificités différentes et des réactions croisées.

Les résultats varient donc d'un laboratoire à l'autre, et au sein d'un laboratoire, il est parfois nécessaire de revoir les normes lorsqu'un antisérum est épuisé et que le suivant n'a pas les mêmes qualités.

L'apport des Ac monoclonaux peut être capital à condition de sélectionner l'anticorps reconnaissant un fragment de la molécule native, porteur à la fois d'une activité antigénique et biologique. Comme nous l'avons souligné, les antisérums classiques diffèrent d'un lot à l'autre, et sont constitués d'un mélange d'anticorps de spécificité et d'affinité différentes pour la molécule reconnue, ce mélange fait aussi la force de l'antisérum polyclonal. L'anticorps monoclonal, par définition, n'est constitué que par un clone d'immunoglobulines ayant une certaine affinité pour un seul motif antigénique. Ceci peut être un handicap pour le dosage immunologique qui, paradoxalement peut perdre de sa spécificité car l'anticorps monoclonal peut reconnaître un motif antigénique commun porté par deux molécules différentes.

I - 2.6 L'intérêt des anticorps anti-hPL

Ils peuvent servir à la purification des différentes formes moléculaires d'hPL. Des antigènes impurs peuvent être utilisés, et seront choisis parmi les anticorps produits clonés et purifiés que ceux qui réagissent avec l'antigène pur, sans réagir avec les produits contaminants, ce qui permettra une purification de l'antigène de départ.

Le fait que l'anticorps soit monoclonal, n'exlut pas la possibilité de réactions croisées, les anticorps monoclonaux peuvent être utilisés pour identifier des épitopes semblables de différentes formes moléculaires d'une même hormone, ce qui permettra aussi une purification de ces différentes formes, peut-être par mélange de différents anticorps monoclonaux.

La purification des différentes formes d'hPL, permettra une standardisation de leur dosage radio-immunologique, comme la production en masse d'Ac d'affinité et de sensibilité plus grande que les Ac contenus dans les immuns sérums classiques, augmentera la sensibilité et la précision de ces dosages radio-immunologiques.

La découverte grâce aux anticorps monoclonaux spécifiques de formes d'hPL particulières, sera aussi d'un grand intérêt clinique.

I - 3 La phosphorylation des enzymes

Diverses enzymes du métabolisme intermédiaire voient leur activité modulée, souvent avec une grande amplitude, par la fixation ou l'enlèvement de groupes phosphate dans leur molécule.

Le groupement phosphate est lié sous l'action d'une kinase, parfois spécifique de la protéine substrat, à partir de l'ATP comme donneur. Les sites phosphorylables sur une protéine sont des chaînes latérales de sérines, de thréonine ou de tyrosine occupant des positions spécifiques (Pelment et al., 1989).

I - 3.1 Protéine-Kinases activées par l'AMPc

Le cytosol mammalien contient au moins deux protéines kinases activables par l'AMP cyclique, appelées protéine-kinase I et protéine-kinase II (0,03 % des protéines du muscle de lapin). L'activation de l'adényl-cyclase entraîne l'augmentation de l'AMP cyclique intracellulaire (Taylor et col., 1988 ; Braum et al., 1991). Il existe aussi des kinases indépendantes de l'AMPc et d'autres dépendantes du GMPc.

Ces protéines kinases, activées par des concentrations d'AMPc de l'ordre de 10^{-8} M, modulent des protéines cibles en phosphorylant le résidu de séquences Arg-Arg-X-Ser-X (X représente un résidu variable) (Walsh et al., 1989).

Le principe de fonctionnement de ces kinases est le suivant : Elles renferment deux types de sous-unités, catalytiques (C) et régulatrices (R). La fixation de l'AMPc sur R tend à relâcher et même à dissocier le complexe RC, libérant l'activité catalytique des sous-unités C.

Dans le cas de la kinase I, l'enzyme existe en absence de l'AMPc sous la forme C_2R_2, qui lie très fortement l'ATP. L'AMPc dissocie l'enzyme ainsi :

$R_2C_2 + 4\ AMPc \longleftrightarrow R_2\ (AMPc)_4 + 2C$

Cette dissociation est une sorte de comportement allostérique poussé à l'extrême. La fixation de l'ATP sur l'enzyme inactive contribue à resserrer le contact entre R et C. Dans cette association, l'ATP contracte des liaisons à la fois avec R et C, et se trouve efficacement coincé entre les deux sous-unités, ce qui contribue à renforcer l'affinité du complexe pour ce substrat. Il y a donc un antagonisme entre ATP et AMPc s'exerçant en des sites distincts, l'ATP pour resserrer les liens entre R et C, l'AMPc pour les rompre (Pelmont, 1989).

La kinase II est également un tétramère R_2C_2 dissociable par l'AMPc renfermant les mêmes sous-unités C que précédemment. L'enzyme se distingue par ses sous-unités R dans la zone de contact RC. A ce contact et en présence d'ATP, chaque sous-unité C tend à fixer un groupe phosphate sur sa partenaire R, c'est en somme, une auto-phosphorylation interne des unités régulatrices, grâce aux sous-unités catalytiques. Cette opération (réversible) tend à rendre le complexe plus facilement dissociable par l'AMPc. Mis à part ce détail, les kinases I et II fonctionneraient à peu près de la même manière.

La séquence dans une chaîne R de protéine-kinase est consituée de près de 400 acides aminés (Taylor, 1988). On distingue 3 parties : une zone participant à l'association avec les sous-unités catalytiques et deux domaines de reconnaissance de l'AMPc placés en tandem.

Les chaînes catalytiques n'offrent pas moins de perspectives intéressantes. La première séquence a été déterminée chez le boeuf (Shoji et al., 1983). La collection s'est agrandie depuis. Les unités catalytiques doivent comporter au moins trois sites pour :

- la fixation de l'ATP,
- la reconnaissance de la protéine substrat,
- la phosphorylation de celui-ci sur un site sérine ou thréonine.

I - 3.2 Le message de l'AMPc

Lorsqu'un ligand active indirectement l'adényl cyclase en se fixant à un récepteur, chaque récepteur protéique peut activer de nombreuses molécules de protéine Gs (Protéine intermédiaire entre le récepteur et l'adényl-cyclase), chacune pouvant activer une molécule de cyclase. Chaque molécule de cyclase, à son tour, catalyse la conversion d'un grand nombre de molécules d'ATP en molécules d'AMP cyclique. Le signal de départ est donc considérablement amplifié, par des étapes

successives qui mettent en jeu un nombre de plus en plus important d'enzymes intracellulaires. Dans le détail, on observe :

- Interaction entre l'hormone et le récepteur membranaire, qui provoque indirectement l'activation d'une enzyme membranaire, l'adényl-cyclase. Le signal perçu par le récepteur est transmis à la cyclase par des protéines Gs (Cooper et al., 1985).

- L'adényl-cyclase produit un certain nombre de molécules d'AMP cyclique (Garcia et al., 1986).

- L'AMPc active une protéine-kinase dont l'activité consiste à phosphoryler diverses protéines à l'aide d'ATP (Katada et al., 1985).

I - 4 Présentation du travail

Dans le cadre de l'étude de l'hormone lactogène placentaire réalisée au laboratoire depuis plusieurs années, des progrès considérables ont été faits dans le domaine de l'hormonologie placentaire, mais les connaissances concernant les propriétés immunologiques et biochimiques de l'hPL, restent parcellaires, surtout en ce qui concerne sa relation avec l'AMPc.

Dans un premier temps, nous avons orienté nos études vers une recherche fondamentale, qui est la détermination des épitopes de l'hPL.

Afin d'étudier ces épitopes, il fallait utiliser des anticorps monoclonaux spécifiques à l'hPL. Et nous avons choisi de fabriquer nous-mêmes les hybridomes qui sécrètent les anticorps monoclonaux pour plusieurs raisons :

A l'époque où nous avons commencer notre travail, il n'existait pas encore dans le commerce des anticorps monoclonaux spécifiques de l'hPL, il existait seulement des anticorps polyclonaux ou des anticorps monoclonaux ayant une réaction croisée avec l'hGH.

L'anticorps anti-hPL est souvent utilisé par nos équipes pour d'autres recherches sur l'hPL (récepteur, métabolisme, génétique...) ce qui nécessite une grande quantité de ces anticorps qui n'étaient pas disponibles dans le commerce.

Par ailleurs, au laboratoire, une équipe possède les techniques et le matériel nécessaire à la production des anticorps monoclonaux, donc nous avons choisi la voie de leur fabrication.

Afin de fabriquer les anticorps monoclonaux anti-hPL, nous avons immunisé des souris hybrides. Après fusion et clonages successifs, 2 clones sécrétants et stables ont été conservés.

Les anticorps obtenus ont été typés, produits en grande quantité, purifiés et l'épitope correspondant a été déterminé.

Dans une deuxième partie de ce travail, nous avons étudié la relation existant entre AMPc et hPL. En effet, il y a quelques années, il avait été mis en évidence au laboratoire, que la présence d'AMPc augmentait la liaison de l'hPL avec un anticorps polyclonal. Nous avons repris les mêmes expériences avec l'anticorps monoclonal que nous avons préparé. Puis nous avons montré que l'hPL lie effectivement l'AMPc. La liaison est spécifique pour l'AMPc et spécifique pour l'hPL. L'activité kinasique possible de l'hPL a ensuite été étudiée.

II - MATERIEL ET METHODES

II - 1 Préparation d'anticorps monoclonaux anti-hPL

Les différentes étapes suivies pour l'obtention, la caractérisation et l'utilisation des anticorps murins anti-hPL sont :

* Dans un premier temps, la préparation d'anticorps monoclonaux murins anti-hPL et leur production avec l'étape d'immunisation,
  - la préparation des cellules,
  - la fusion,
  - la méthode de clonage,
  - la production in vitro et in vivo.

* Dans un deuxième temps, leur purification et l'étude de leurs constantes d'affinité.

* Finalement, dans un dernier temps, leur utilisation dans la détermination des épitopes de l'hPL.

II - 1.1 Protocole d'immunisation

L'obtention d'hybridomes sécrétant des anticorps monoclonaux murins implique l'utilisation de cellules de rate après immunisation de différents lots de souris.

II - 1.1.1 Choix de l'animal

Quatre critères déterminent le choix de l'animal à immuniser :

- quantité de sérum désirée,
- espèce d'origine de l'antigène,
- nécessité d'obtenir des anticorps monoclonaux,
- quantité d'antigène disponible.

Jusqu'à présent, la souris semble être le meilleur choix, car il existe dans le commerce des lignées cellulaires de myélomes murins qui ont perdu la propriété de produire leurs immunoglobulines propres et qui sont devenues $HGPRT^-$.

Nous avons réalisé une immunisation in vivo sur des souris femelles hybrides de première génération provenant d'une souris mâle Balb/c et d'une femelle C57 âgés de 6 semaines.

II - 1.1.2 Immunisation in vivo

Les protocoles d'immunisation sont variables et dépendent surtout de la nature de l'antigène. L'effet immunogène est stimulé par ce qu'on appelle des adjuvants (substances qui, injectées en même-temps qu'un antigène, augmentent la réponse immunitaire vis-à-vis de cet antigène). C'est Freund qui, en 1947, montra la capacité d'une solution aqueuse de l'antigène dans l'huile d'augmenter la réponse immunitaire. Cette réponse est meilleure chez des souris femelles de 6 à 8 semaines.

- Préparation du mélange antigène-adjuvant de Freund :

L'adjuvant que nous avons utilisé est celui de Freund (Pel Freez, Biologicals Rogers), c'est un mélange d'un volume d'huile minérale et de 9 volumes de détergent qui donne l'adjuvant incomplet ; il n'est complet que lorsqu'on ajoute à ce dernier un mycobacterium tuberculosis inactivé.

Un volume de 35 µl contenant 35 µg d'antigène en solution de PBS, est mélangé au même volume d'adjuvant de Freund complet. Ce mélange est agité sur vortex jusqu'à l'obtention d'une émulsion crémeuse.

- Injection de l'antigène :

La première injection se fait en sous cutanée (SC) avec l'adjuvant de Freund complet en quatre endroits différents. Le premier rappel en intrapéritonéale avec adjuvant de Freund incomplet, est suivi de deux rappels en intrapéritonéale sans adjuvant à intervalle de quatre semaines.

De plus, le dernier rappel, qui est très important, se fait :

* soit 3 jours avant la fusion

- par voie intraveineuse afin de donner en une seule fois une dose importante d'antigène,
- ou par voie intrapéritonéale car quelquefois les souris supportent mal les intraveineuses.

* soit en 3 injections répétées à distance de 24 heures par voie intrapéritonéale

Dans notre cas, l'injection du dernier rappel a été effectuée avec 250 ug d'hPL, par voie intraveineuse, 3 jours avant le sacrifice de l'animal.

II- 1.1.3 Récupération des sérums pour la détermination de la réponse immunitaire

On peut utiliser 2 méthodes :

- La première implique le sacrifice de l'animal.

Après avoir sacrifié la souris, l'oeil est enlevé avec une pince. Le sang s'écoulant par la cavité orbitale est recueilli dans un tube. Cette technique permet de récupérer 300 à 400 ul de sang.

- La seconde n'implique pas le sacrifice de l'animal.

Le sang prélevé au coin de l'oeil, au niveau des sinus orbitaux, avec une pipette Pasteur, est recueilli dans un tube. Les tubes sont placés 1 heure à 37°C, puis une nuit à +4°C. Le sérum est récupéré par centrifugation du tube, et il est testé par ELISA pour évaluer la réponse immunitaire.

II - 1.2 Protocole de fusion

II - 1.2.1 Préparation des milieux et des solutions

II - 1.2.1.1 Le sérum de veau foetal

Nous utilisons, en particulier lors des fusions et pendant toute la période de sélection des hybrides, du sérrum de veau foetal (Jacques Boy) conservé à -20°C en flacons stériles de 500 ml. Au moment de l'emploi, il est décongelé et porté pendant 30 minutes à 56°C afin de détruire des inhibiteurs de la croissance cellulaire.

Une fois par an environ, plusieurs lots de SVF de différents fournisseurs sont testés. Nous choisissons le lot qui nous donne le meilleur rapport qualité-prix et le réservons pour l'année. Ce sont les clonages qui donnent les meilleurs renseignements sur la qualité d'un sérum. Nous effectuons donc un clonage avec

chaque lot et celui qui permet d'obtenir le pourcentage le plus élevé de clones sur une plaque de 96 puits, est considéré comme le meilleur.

II - 1.2.1.2 Le milieu de base

Pour toutes les cultures de routine, nous utilisons le RPMI 1640 (Rooswelt Park Medical Institute, Seromed 121-10) riche en vitamines, acides aminés, sels minéraux nécessaires à la croissance cellulaire in vitro. La composition de ce milieu est donnée dans le tableau 1.

Ce milieu nous est fourni sous forme de poudre qui doit être dissoute dans 10 l d'eau pyrodistillée et complémentées par 2 g/l de bicarbonate de sodium (SIGMA). Après reconstitution, son pH est ajusté à 7,3 par barbotage de CO_2. Il est ensuite filtré sur filtre Millipack 100 (MILLIPORE) à l'aide d'une pompe péristaltique puis réparti en flacons stériles de 500 ml et stocké à 4°C, 5 ml de glutamine 2mM sont ajoutés à chaque flacon au moment de l'emploi.

Lors de la fusion et durant un mois environ, nous utilisons du milieu DMEM (GIBCO 041-01965) (Tableau 2) et pour les lavages précédents la fusion, du milieu MEM GIBCO 041-010095, plus pauvre en glucose (1 g/l au lieu de 4,5 g/l), en vitamines et en acides aminés.

II-1.2.1.3 Les compléments du milieu

Pour assurer la croissance cellulaire in vitro, il est toujours nécessaire d'ajouter au milieu de base des protéines, des facteurs de croissance, des molécules mitogènes de petits poids moléculaire, etc... C'est souvent le sérum de veau foetal qui apporte ces compléments au milieu de base, mais nous avons, dans notre laboratoire, utilisé également du sérum de cheval et du lactosérum qui est fourni par la Société Bio-France Développement (Vandoeuvre) pour remplacer le sérum de veau foetal, très coûteux.

II - 1.2.1.4 Le milieu de séléction

- 136 mg d'hypoxanthine et 38,8 mg de thymidine sont dissous dans 100 ml d'eau pyrodistillée en chauffant à 75°C. Après dissolution, la solution est filtrée à 0,22 u et conservée à -20°C.

SEROMED

RPMI 1640 MEDIUM
MILIEU PRMI 1640

COMPOSITION DU MILIEU : Quantité en mg/g.

Sels

Bicarbonate de sodium, $NaHCO_3$	2000
Chlorure de potassium, KCl	400
Chlorure de sodium, NaCl	5000
Phosphate disodique, Na_2HPO_4, $7H_2O$	1512
Nitrate de calium, $Ca(NO_3)_2$ $4H_2O$	100
Sulfate de magnésium, $HgSO_4$ $7H_2O$	100

Aminoacides

. L-Arginine	200
. L-Asparagine	50
. L-Aspartique acide	20
. L-Cystine	50
. L-Glutamine	300
. L-Glutamine acide	20
. Glycine	10
. L-Histidine	15
. L-Hydroxyproline	20
. L-Isoleucine	50
. L-Leucine	50
. L-L-Lysine HCl	40
. L-Méthionine	15
. L-Phénylalanine	15
. L-Proline	20
. L-Sérine	30
. L-Thréonine	5
. L-Tryptophane	20
. L-Valine	20

Vitamines

. Acide folique	1
. Acide para-aminobenzoïque	1
. Biotine	0.2
. Choline Chlorure	3
. I-Inositol	35
. Nicotinamide	1
. D-Panthénate de calcium	0.25
. Pyridoxine HCl	1
. Riboflavine	0.2
. Thiamine HCL	1
. Vitamine B12	0.005

Autres coposants

. D-Glucose	2000
. Glutathion	1
. Rouge de Phénol *	5

* Les milieux liquides IX contiennent 10 mg/L de Rouge de Phénol
Réference : MOORE G.E. et al., J. AM. Med. Assoc., 199 519 (1957)

Tableau 1 : Coposition de milieu de base RPMI 1440

- 17,6 mg d'aminoptérine sont dissous dans 80 ml d'eau distillée, on ajuste à 100 ml avec NaOH 0,1 M, puis on filtre à 0,22 u et on stocke à -20°C.

Au moment de la fusion, les 2 solutions sont mélangées volume à volume, on obtient alors une solution mère HAT concentrée 50 fois. Le milieu HAT de travail est obtenu par addition de 1 ml de la solution mère HAT à 49 ml de milieu RPMI 1640.

II - 1.2.1.5 Agent fusionnant

A 5 g de PEG : Polyéthylène Glycol (MERCK - Type 4000 Carl Roth D.) de PM = 4000, sont additionnés 7 ml de DMSO, le tout est porté au bain-marie à 37°C, filtré à 0,22 um, autoclavé dans une bouteille de verre pendant 15 min. Le pH doit être légèrement alcalin. Cette solution est gardée stérile en aliquot de 1,2 ml à 37°C, à l'abri de la lumière. Les autoclavages répétés du PEG conduisant à des problèmes, il ne faut stériliser qu'une fois.

II 12.2 Cultures cellulaires

Toutes les étapes de préparation des cellules, de changement de milieu de culture, ainsi que les congélations doivent être réalisées dans des conditions stériles, sous une hotte à flux laminaire.

Les cultures cellulaires sont déposées dans un incubateur à 37°C et en présence d'un mélange air-CO_2 (95-5 %) (JOUAN).

II - 1.2.2.1 Préparation des macrophages péritonéaux

Les macrophages péritonéaux de souris sont nécessaire aux fusions. Généralement, cette préparation a lieu à J-1 de la fusion.

Immédiatement après la mort de la souris par dislocation des vertèbres cervicales, la peau de l'abdomen est incisée sur quelques millimètres (sans léser la paroi abdominale) et écartée largement de façon à mettre à nu la paroi musculaire. 5 ml de milieu de culture sont injectés vigoureusement à la seringue dans la cavité péritonéale. Après un léger massage, le liquide est aspiré à la seringue, en soulevant la paroi avec l'aiguille, de manière à former une poche. La suspension cellulaire est centriguée 10 min à 800 g (1500 t/min ; centrifugeuse JOUAN CR 1000). Les cellules sont remises en suspension dans un volume connu de milieu sélectif HAT et une portion aliquote est utilisée pour les comptages. Une

concentration de cellules macrophagiques de 10^5 cellules/ml déposée dans des plaques de 96 puits sera utilisée le lendemain pour la fusion.

II - 1.2.2.2 Préparation des cellules de myélomes

Les myélomes sont des cellules lymphoides provenant d'une tumeur maligne de la moëlle osseuse et en général sécrétant des anticorps en quantité accrue.

- Choix de la souche de myélome de souris :

Il en existe beaucoup, mais toutes ne sont pas utilisées pour l'hybridation cellulaire. Le choix s'est porté sur les myélomes murins PAIO, qui nous ont été aimbablement fournis par le Professeur H. BAZIN de l'Université Catholique de Louvain (Bruxelles, Belgique) que nous remercions. Ces myélomes ont été sélectionnés pour leur déficience enzymatique ($HGPRT^-$) qui leur confère une sensibilité en milieu HAT et pour leur absence de sécrétion propre d'immunoglobuline.

- Culture du myélome pour la fusion :

Il n'est pas recommandé de garder les cellules de myélomes en culture permanente, car elles risquent de subir des mutations.

Dix jours avant la fusion, les cellules de myélome sont décongelées et cultivées dans un milieu DMEM complet contenant 8 ug de 8-azaguanine. Ce milieu est utilisé pendant 1 ou 2 passages, un passage étant effectué toutes les 48 heures.

Le jour de la fusion, les cellules doivent se trouver en phase exponentielle de croissance et dans un excellent état de viabilité (98 à 100 % de cellules vivantes).

- Préparation des cellules de myélome le jour de la fusion

Les cellules sont débarassées du sérum contenu dans le milieu de culture par lavages successifs : après avoir agité les cellules du myélome en culture, celles-ci sont transvasées dans un tube conique stérile de 50 ml (TPP n° 9150, COSTAR). La suspension cellulaire est complétée à 5 ml avec du PBS préalablement portés à 37°C au bain-marie. Le tube est centrifugé à 800 g pendant 5 min. Le surnageant est jeté et le culot subit un deuxième lavage avec du PBS afin

d'enlever toute trace de milieu de culture. Le culot est remis en suspension dans 10 ml de PBS. Un comptage à l'hématimètre permet d'estimer le nombre de cellule.

Remarque : Cette préparation se fait en même temps que la préparation des cellules spléniques.

II - 1.2.2.3 Préparation des cellules spléniques

- Dissection de la souris :

Après avoir tué une souris immunisée, la surface abdominale est désinfectée avec de l'éthanol à 70 %. La peau est incisée (cette incision ne doit intéresser que la peau et non la musculature), et elle est séparée de la musculature avec un instrument non tranchant ou à la main. L'ouverture de la cavité se pratique par incision puis écartement de la paroi.

- Prélèvement de la rate, préparation des cellules spléniques :

La rate, organe hématopoïétique, est bien visible dans la cavité abdominale. Elle est prélevée à l'aide de deux pinces stériles et elle est placée dans un tube stérile de Potter, contenant environ 1 ml de PBS à 37°C (préalablement mis au bain-marie). La rate est ensuite déchiquetée par action douce du piston, afin de ne pas abimer les lymphocytes qui sont ainsi libérés.

Une sédimentation de quelques minutes suffit à débarasser le mélange des morceaux de membranes et des débris. La suspension de cellules spléniques est reprise dans du MEM.

- Comptage des cellules :

Le nombre de lymphocytes contenus dans la suspension cellulaire est compté à l'hématimètre. Normalement, une rate contient environ 10^7 cellules/ml, soit 10^8 cellules pour les 10 ml de suspension. Après préparation des cellules partenaires, leur fusion peut être réalisée.

II - 1.2.3 Fusion

II - 1.2.3..1 Principe

L'hybridation cellulaire proprement dite est réalisée :

* Par la mise en contact membrane à membrane de cellules lymphocytaires, capables de sécréter des anticorps et des cellules de myélome, capables de proliférer in vitro.

* Par application temporaire d'un agent chimique fusionnant, à une concentration très élevée : le PEG.

Les membranes des cellules partenaires fusionnent et des cellules multinuclées appelées hétérocaryons se forment. Lors d'une division ultérieure, les noyaux de l'hétérocaryon fusionnent à leur tour, formant des hybridomes dont les caractéristiques sont de sécréter des anticorps et de survivre in vitro en se multipliant de manière infinie.

II - 1.2.3.2 Mise en contact des deux types de cellules et application de l'agent fusionnant

Les cellules spléniques sont mélangées avec les cellules du myélome préparées extemporanément avec un rapport de 1 cellule de myélome pour 5 lymphocytes. Le mélange est complété à 50 ml par du PBS et le tube est mis à centrifuger pendant 5 min à 800 g. Le surnageant est jeté jusqu'à la dernière goutte, de manière à ne pas diluer le PEG.

Un volume de 1,2 à 1,3 ml de PEG à 37°C (préalablement mis au bain-marie) est ajouté goutte à goutte en utilisant une pipette de 1 ml, pendant une durée déterminée de 1 min, tout en ne cessant de remuer le tube.

Cette étape est suivie d'une dilution de la suspension, goutte à goutte par 5 ml de PBS (en remuant doucement) pour ne pas provoquer une brusque variation de pH.

Le tube est mis de nouveau à centrifuger pendant 5 min à 800 g. Le culot est resuspendu en ajoutant 10 ml du milieu HAT.

II - 1.2.3.3 Répartition des produits de la fusion

La distribution des produits de la fusion se fait :

* A raison d'une goutte par puits dans les boîtes de 24 puits stériles (COSTAR) ensemencées la veille avec la suspension HAT-macrophages péritonéaux.

* A raison de 150 µl par puits dans les plaques de 96 puits stériles (COSTAR) où aucun macrophage n'est ensemencé.

* A raison de 150 ul par puits pour des plaques de 96 puits stériles où 50 µl de milieu HAT-macrophages péritonéaux sont déposés au jour J-1.

Une semaine après la fusion, le milieu de culture est changé par aspiration de l'ancien milieu, à l'aide d'une pipette Pasteur stérile et 150 µl de milieu HAT sont ajoutés.

L'examen optique au microscope inversé permet de choisir les puits présentant des clones qui seront testés ultérieurement par ELISA.

Pour obtenir les cellules génétiquement identiques sécrétant les mêmes anticorps, des méthodes de clonage s'avèrent nécessaires.

II - 1.3 Méthode de clonage

II - 1.3.1 Principe

La production d'anticorps monoclonaux nécessite la sélection des cellules à l'intérieur d'une population cellulaire hétérogène. Le critère de sélection peut être :

- soit la rapidité de croissance,
- soit le taux de sécrétion d'une protéine particulière.

Dans notre cas, il s'agit de sélectionner les cellules en fonction de leur sécrétion d'immunoglobuline afin d'obtenir un anticorps monoclonal.

Nous utilisons une méthode de dilution limite où les cellules sont déposées dans les plaques de 96 puits à raison de 1 cellule théorique statistiquement par puits.

II - 1.3.2 Protocole

Dans un puits initial, les cellules sont comptées (3 comptages) à la cellule de Thoma. A partir de ce dénombrement, des dilutions successives sont réalisées afin de distribuer théoriquement dans la plaque de 96 puits : 100 cellules dans les 8 puits de la première rangée verticale, 10 cellules dans les 8 puits de la deuxième rangée verticale, 1 cellule dans les 80 puits restants.

Les deux premières rangées servent à la sauvegarde des cellules en cas d'erreur de manipulation ou de difficulté. C'est dans les 80 puits restants que se fera la recherche des puits ne comprenant qu'un seul clone. Il est généralement estimé qu'un clonage est réussi lorsque 60 à 70 % des puits comporte un clone et un seul.

II - 1.3.3 Sélection des clones sécrétant

Le résultat du premier ELISA suivant la fusion, permet de sélectionner les 10 puits correspondant aux clones les plus sécrétants.

10 jours après le premier clonage, 10 plaques correspondant chacune à un puits sélectionné à partir du test ELISA, sont observées au microscope et tous les puits ne présentant qu'un seul clone sont testés par un nouvel ELISA.

A nouveau, les 10 clones les plus sécrétants, sont choisis pour être reclonés.

Après 5 tests ELISA et 5 clonages, le clone ayant gardé au cours du temps (toutes ces manipulations s'effectuent sur 6 à 8 semaines) la meilleure sécrétion, est choisi pour la fabrication en masse de l'anticorps monoclonal. Toutefois, il est prudent, lors de chaque sélection, de congeler 2 ou 3 clones ayant des sécrétions intéressantes car on n'est jamais à l'abri d'une contamination ou d'une perte de sécrétion.

II - 1.3.4 Prolifération

Les clones fortement positifs au test ELISA sont transférés dans des puits de 2 ml contenant 1,5 ml de milieu supplémenté avec 10 % de SVF.

Ensuite, ces clones seront transférés dans des flacons de 25 cm^2, puis dans des flacons de 75 cm^2 si nécessaire.

Lors de ces clonages, il faut favoriser au maximum la pousse cellulaire. Ils sont donc effectués en présence systématique de 3 à 5.10^3 macrophages déposés dans chaque puits (100 ul) la veille de la manipulation.

II - 1.3.5 Congélation des cellules

Cette étape est difficile à supporter pour les cellules. Elles y subissent en effet :

- un choc thermique,
- une déshydratation qui entraîne une augmentation de leur concentration saline,
- une chute du taux de protéines externes qui jouent le rôle d'agent protecteur,
- une variation de pH,
- et surtout un phénomène de surfusion au moment de l'apparition des premiers cristaux.

Il faut donc diminuer au maximum ce temps de surfusion en augmentant la vitesse du refroidissement à ce moment précis. Pour obtenir une bonne congélation, il est conseillé de descendre la température de :

- 1°C / min de + 4°C à -45°C,
- 2,5°C / min jusqu'à -75°C,

puis de laisser les cellules à cette température quelques heures et de les transférer dans l'azote liquide à -196°C (ceci n'est réalisable qu'avec des systèmes de congélation programmables).

En pratique, les cellules sont centrifugées, le culot est repris dans du milieu de culture supplémenté en SVF à 30 % de telle sorte que l'on ait 5.10^5 cellules/ml, ce qui est considéré comme la concentration optimale. On ajoute alors un mélange DMSO-SVF (1V/4V) goutte à goutte, en agitant le tube dans la glace pilée.

La suspension est alors répartie dans des cryotubes de 1 ml qui seront déposés soit :

- dans une boîte spéciale appelée cryofreeze (POLYLABO - Réf. 22470) contenant de l'alcool isopropylique. Celle-ci sera ensuite placée quelques heures à

Composant	041-01965 1X Liquide mg/l	041-01095 1X Liquide mg/l
SELS INORGANIQUES :		
Ca Cl_2	200.00	200.00
Fe $(N°_3)_3$ - $9H_2O$	0.10	
K Cl	400.00	400.00
Fe SO_4 (anhyd.)	--	
mg SO_4 - $7H_2O$	200.00	200.00
Na Cl	6400.00	6800.00
Na HCO_3	3700.00	2200.00
Na H_2PO_4 - H_2O^a	125.00	140.00
AUTRES COMPOSANTS :		
Glucose	4500.00	1000.00
Rouge de Phénol	15.00	10.00
Pyruvate de Sodium	-	-
Aminopterine	-	-
Hypoxanthine	-	-
Thymidine	-	-
ACIDES AMINES :		
L-Alanine	-	-
L-Asparagine	-	-
L-Arginine - HC1	84.00	126.00
Acide L-Aspartique	-	-
L-Cystine	48.00	24.00
L-Cystine 2HC1	-	-
Acide L-Glutamique	-	-
L-Glutamine	584.00	292.00
Glycine	30.00	-
L-Histidine HC1 H_2O	42.00	42.00
L-Isoleucine	105.00	52.00
L-Leucine	105.00	52.00
L-Lysine HC1	146.00	72.50
L-Méthionine	30.00	15.00
L-Phénylalanine	66.00	32.00
L-Proline	-	-
L-Sérine	42.00	-
L-Thréonine	95.00	48.00
L-Tryptophane	16.00	10.00
L-Tyrosine	72.00	36.00
L-Tyrosine (sel disodique)	-	-
L-Valine	94.00	46.00
VITAMINES :		
Pantothénate de Calcium D	4.00	1.00
Chlorure de Choline	4.00	1.00
Acide Folique	4.00	1.00
i-Inositol	7.20	2.00
Nicotinamide	4.00	1.00
Pyridoxal HC1	4.00	1.00
Riboflavine	0.40	0.10
Thiamine HC1	4.00	1.00

Milieu d'Eagle Modifié par Dulbecco 041-01965 (DM

Milieu Essentiel Minimum 041-01095 (MEM)

Tableau 2 : Composition de milieu de base DMEM et MEM.

-80°C (selon le fournisseur, l'alcool permettrait la descente graduelle de 1°C/min). Les tubes seront alors transférés dans un container d'azote liquide à -196°C.

- dans un appareil de congélation (NICOOL 416) comportant une programmation électronique de la température étalonnée au préalable, pour chaque type cellulaire. Cet appareil relié à une bonbonne d'azote permet la descente en température jusqu'à -196°C.

Les cryotubes seront ensuite transférés dans leur container (BT-CFPO).

II - 1.3.6 Décongélation des cellules

Si la congélation se fait par étapes, la décongélation doit être réalisée très rapidement à cause de la toxicité, à température ambiante, du cryoprotecteur qu'est le DMSO. Pour cela, les cryotubes sont sortis de l'azote liquide et immédiatement plongés dans un bain-marie à +37°C jusqu'à complète décongélation.

Les cellules sont diluées dans 20 ml de RPMI 1640 complémenté avec 10 % de SVF et centrifugées 5 min à 800 g. Le surnageant est alors éliminé et le culot est resuspendu dans 20 ml de milieu contenant une suspension de macrophages, ce qui augmente le rendement de la reprise des cellules. Les hybridomes sont répartis à une densité d'environ 5.10^4 cellules/ml dans des flacons de culture de 25 cm^2.

Les flacons de culture sont placés debout dans l'étuve pendant 2 jours. Lorsque les cellules sont à confluence dans le fond du flacon, 10 ml de milieu sont éliminés et le flacon peut alors être couché dans l'étuve jusqu'au repiquage dans du milieu neuf.

Le fait de resuspendre les cellules dans 20 ml de milieu permet une plus grande dilution du DMSO toxique. Le maintien de la boîte debout, facilite la reprise de la croissance car les cellules sont moins dispersées.

II - 1.4 Production d'anticorps monoclonaux anti-hPL

Quand une lignée d'hybridomes est établie, la prolifération de cet hybridome et par la même la production d'anticorps monoclonaux, peut être réalisée soit *in vitro* par culture cellulaire, soit *in vivo* sous forme d'ascite.

II - 1.4.1 Production in vitro

Les cellules sont maintenues en culture dans des flacons de culture stériles de 75 cm^2, dans du milieu supplémenté à 10 % en SVF. Lorsque 2 à 3 flacons de culture de 75 cm^2 sont à confluence, il est possible de transférer les cellules dans des spinners, qui est un système agité où elles poussent plus facilement puisqu'elles se trouvent en contact permanent avec le milieu.

A J0, le spinner contenant 150 ml de milieu est ensemencé à une concentration de 5.10^4 cellules/ml.

Chaque jour un comptage des cellules est effectué à l'hématimètre et un échantillon de 10 ml est prélevé pour y réaliser (après centrifugation) l'analyse de différents paramètres. Le culot cellulaire est suspendu dans 10 ml de milieu neuf et replacé dans le flacon.

La pousse cellulaire est moins rapide que lors d'une culture en récolte-recharge car le milieu s'épuise assez vite et les éléments toxiques s'accumulent. Mais la consommation du milieu est nettement réduite et les anticorps sont accumulés dans un volume restreint, ce qui facilite leur purification ultérieure.

La capacité des spinners étant limitée à 250 ou 300 ml maximum, pour une production plus importante il est nécessaire d'adopter un système plus sophistiqué comme un bioréacteur ou cytoculteur utilisé par d'autres chercheurs dans notre laboratoire.

II - 1.4.2. Production en ascite chez les souris Balb/c

Le passage en ascite peut être pour un clone, la possibilité de le sauvegarder ou même de le débarasser d'une contamination bactérienne ; c'est aussi le moyen de produire des anticorps monoclonaux in vivo. Il est réalisé sur des souris Balb/c ou hybride F1 Balb/c-C57.

- Principe :

La souris reçoit au préalable une injection d'une solution de pristane qui cause une inflammation stérile, puis les hybridomes de la culture sont injectés. Il se forme une grande quantité d'ascite contenant des anticorps produits par les hybridomes injectés. Une quantité importante d'anticorps monoclonaux peut être produite par cette technique.

- Protocole

Un volume de 0,5 ml de pristane (SIGMA CHEMICAL Co) est injecté par voie intrapéritonéale à des souris Balb/c âgées de 8 semaines au minimum. Après 15 jours, un volume de 0,5 ml de milieu stérile contenant 5.10^6 à 10^7 cellules, est injecté par voie intrapéritonéale. Le liquide d'ascite peut être collecté aprés 10 jours.

Les souris sont ponctionnées dans le péritoine. L'ascite s'écoulant dans un tube conique stérile est clarifié par centrifugation pendant 15 min à 600 g. Le surnageant est récupéré et réparti par aliquots de 5 ml dans des tubes stériles, puis mis à congeler à -20°C.

Dans les deux techniques de production, les anticorps monoclonaux obtenus ne sont pas purs et doivent être purifiés pour la plupart des usages.

II - 2 Sélection et caractérisation des anticorps sécrétés par des clones

II - 2.1 Sélection des hybridomes par test ELISA

Il est nécessaire de tester l'activité anticorps dans les puits pour sélectionner les hybrides intéressants. Ceci est réalisé par ELISA.

II - 2.1.1 Principe

C'est une méthode de dosage immuno-enzymatique de type non compétitif en phase hétérogène. Selon ce procédé, l'anticorps à doser (anticorps de souris présent dans le surnageant) est fixé, dans un premier temps sur la protéine ayant servi à l'immunisation (dans notre cas, c'est l'hPL), qui a été fixée sur un support solide. Après élimination des anticorps en excès, la quantité d'anticorps complexés avec l'hPL est mesurée, dans un deuxième temps, par addition d'un second anticorps couplé à une enzyme (anticorps de chèvre anti-anticorps de souris couplés à la péroxydase), l'excès de ces anticorps est également éliminé et le signal enzymatique est déterminé : il est proportionnel à la quantité d'anticorps fixé sur l'hPL (figure 8).

Pour ce dosage, le premier anticorps doit nécessairement posséder deux épitopes distincts, de manière à ce qu'après sa réaction avec l'antigène immobilisé,

il puisse encore réagir avec le deuxième anticorps spécifique couplé à l'enzyme. Les antigènes doivent avoir une masse moléculaire assez importante.

II - 2.1.2 Protocole

- Réactifs :

- tampon carbonate de sodium 50 mM, pH 9,6 :

Na_2CO_3		5,3 g
Azide de sodium (NaN_3)		0,2 g
H_2O bidistillée	qsp	1000 ml

- plaque Costar

- tampon "Phosphate Buffered Saline" (PBS), pH 7 :

NaCl		8 g
KCl		0,200 g
$NaHPO_4$ $2H_2O$		1,200 g
KH_2PO_4 $11H_2O$		0,200 g
H_2O bidistillée	qsp	1000 ml

- PBS Tween (Tween 20, Serva à 1/100 dans du PBS)

- Solution de sérum albumine bovine (SIGMA) à 2 % dans du PBS

- Tampon acétate-citrate, pH 6 :

Solution acétate de sodium :

CH_3 COONa		19 g
H_20 bidistillée	qsp	1000 ml

Solution acide citrique

$C_6H_8O_7$ H_2O		21 g
H_2O bidistillée	qsp	1000 ml

La solution d'acétate de sodium est ajusté à pH 6 avec la solution d'acide citrique.

- Solution mère de 3, 3', 5, 5' tétraméthylbenzidine (TMB)

TMB	10 mg
Diméthylsulfoxide (DMSO) qsp	100 ml

Conservation de la solution : +4°C à l'abri de la lumière pendant 15 jours.

- Solution d'eau oxygénée : H_2O_2 à 30 volumes

- Solution d'acide sulfurique : H_2SO_4, 2 N

- Mode opératoire :

La technique de sélection des hybrides doit être simple, peu coûteuse et de réalisation facile car elle est répétée souvent : c'est le cas de l'ELISA.

Le procédé se fait en plusieurs étapes :

- Première étape : Fixation de l'antigène

100 ul de la solution d'hPL (UCP, i 020) à 2 µg/ml dans le tampon à pH 9,6 sont distribués dans chaque puits de la plaque de microtitration. Elle est alors recouverte avec un papier d'aluminium et mise à incuber une nuit à +4°C.

- Deuxième étape : Saturation des sites de fixation non spécifiques

La plaque est ensuite lavée trois fois avec du PBS et les sites des micropuits restés libres sont saturés avec 100 ul de la solution de BSA à 2 %. Elle est mise à incuber une nuit à +4°C ou une heure à 37°C. A ce stade, les plaques peuvent être conservées plusieurs semaines à +4°C.

- Troisième étape : Addition du surnageant de cellule

La plaque à utiliser est lavée trois fois avec du PBS-Tween. 100 ul des surnageants de culture purs ou dilués, ainsi que 100 ul des contrôles sont distribués en double. Elle est à nouveau recouverte d'une feuille de papier aluminium (pour éviter une évaporation trop importante) et mise à incuber 2 heures à 37°C (ou une nuit à +4°C).

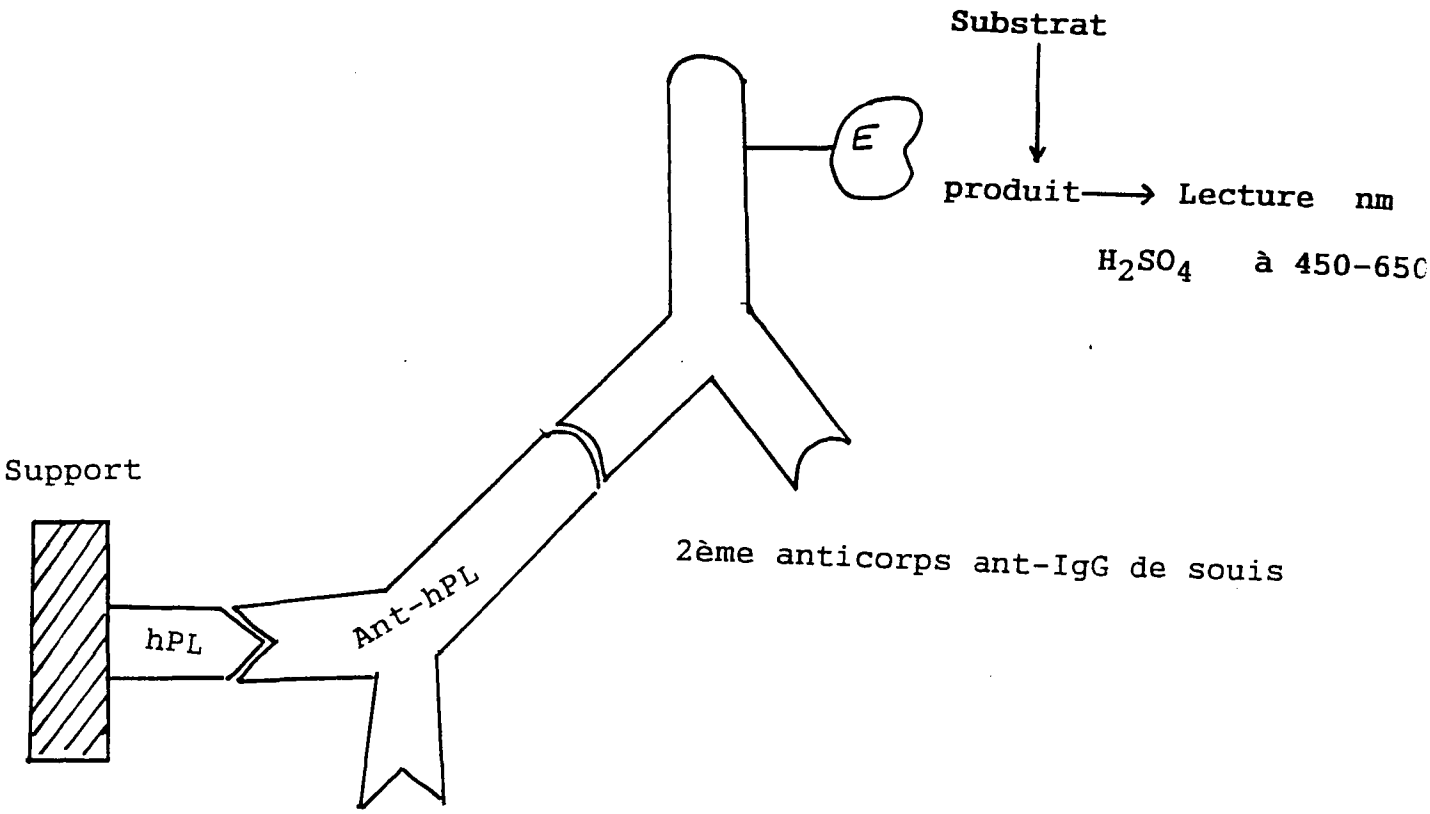


Figure 8 : Complexe formé au cours des différentes étapes du test ELISA. E = enzyme (péroxydase)

- Quatrième étape : Addition de la solution du deuxième anticorps conjugué

Cette plaque est lavée cinq fois avec du PBS-Tween. 100 ul de la solution contenant 2 ug/ml du deuxième anticorps marqué à la péroxydase sont distribués dans tous les puits, et la plaque est mise à incuber une heure à 37°C.

- Cinquième étape : Addition du substrat et révélation des plaques

Cinq lavages de la plaque avec du PBS-Tween sont nécessaires et un dernier avec le tampon citrate pH 6 est effectué. A ce moment là, 100 ul de la solution de TMB sont ajoutés. Le complexe représenté sur la figure 8 est obtenu.

- Sixième étape : Arrêt de la réaction

Elle consiste à arrêter la réaction et à lire les différentes plaques au photomètre (MOLECULAR DEVICE). Après 10 min d'incubation, 25 µl de la solution de H_2SO_4 2M sont ajoutés afin d'arrêter la réaction immuno-enzymatique. La plaque est ensuite lue à une longueur d'onde entre 450 et 650 nm.

II - 2.2 Détermination de l'isotype

La classe de l'anticorps sécrété dans le surnageant de culture ou dans l'ascite, est déterminé par un kit (Mouse monoclonal antibody isotyping kit, AMERSHAM). La trousse comprend 10 bandes sur lesquelles sont fixées des anticorps dirigés contre les différentes classe d'immunoglobulines : anti-IgGA, IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b et IgG3, Kappa et Lambda. Les bandes sont incubées à 37°C pendant 2 heures en présence de surnageant d'hybridomes ou d'ascites avec les dilutions recommandées par le fabricant, la révélation est faite par une réaction à la péroxydase.

II - 3 Purification des anticorps murins

La concentration et la purification des anticorps peut se faire par plusieurs méthodes qui, éventuellement, peuvent être combinées.

II - 3.1 L'ultrafiltration

L'ultrafiltration est une étape préliminaire, elle est utilisée ici afin d'éliminer les sels des solutions contenant les anticorps anti-hPL et pour concentrer les échantillons qui seront ensuite lyophilisés avant d'être soumis à des chromatographies.

Les milieux de culture d'hybridomes sécrétant sont prélevés puis centrifugés à 800 g pendant 5 min. Les cellules sont remises en culture et les surnageants sont ultrafiltrés dans une cellule d'ultrafiltration (AMICON) avec une membrane à seuil de coupure 10^5 daltons, sous une pression de 4 bars. Le rétentat est ramené à son volume initial par addition d'eau distillée, et ultrafiltré à nouveau. L'opération est recommencée deux fois. La concentration en protéines dans les rétentats et dans les ultrafiltrats est déterminée.

Bien que le débit de filtration soit inversement proportionnel à la viscosité du fluide, elle-même proportionnelle à la température, l'opération se fait en chambre froide pour éviter la dénaturation des protéines.

Les surnageants récoltés avant et après l'étape de lavage sont dosés en ELISA.

II - 3.2 Précipitation par le sulfate d'ammonium et dialyse

Cette méthode est basée sur la propriété qu'ont les protéines de précipiter quand on augmente, avec certains sels neutres, la force ionique du milieu. Axen et Ronato (1987) préconisent de travailler entre 40 et 45 % de saturation en sulfate d'ammonium pour précipiter la totalité des IgGs. A (x) ml de surnageant maintenu sous agitation, on ajoute goutte à goutte (x) fois 0,818 ml de solution aqueuse saturée en sulfate d'ammonium. Le mélange est laissé à 4°C pendant 12 heures. Le milieu est ensuite centrifugé à 15 000 g pendant 30 min à 4°C dans une centrifugeuse J2-21 (BECKMAN). Le surnageant est éliminé, tandis que le précipité est dissous au 1/100 du volume initial dans de l'eau distillée. Il est ensuite dialysé contre de l'eau en changeant plusieurs fois l'eau pendant 24 heures, puis contre du tampon Tris-HCl 10 mM pH 8 (utilisé en FPLC).

Après dialyse, les échantillons sont caractérisés par une électrophorèse dans des conditions dénaturantes.

II - 3.3 Chromatographie par gel filtration

La colonne que nous avons utilisé (SR PHARMACIA, 80 x 2,5 cm) est remplie d'un gel Séphacryl S 200 (PHARMACIA), vendu prêt à l'emploi, qui possède un domaine de fractionnement compris entre 5000 et 300.000 Da.

Nous avons utilisé le Bleu Dextran (PM 2.000.000) pour déterminer le volume mort (Vo) de la colonne, et le chromate de potassium CrK_2O_4 (PM 194,4) pour déterminer le volume du lit de gel (Vt).

Une fois la colonne équilibrée, 3 g de l'échantillon lyophilisé sont repris dans 1 ml de tampon Tris/HCl 0,5 M, pH 8, puis filtré et alourdi par du sucrose pour éviter sa dilution dans le gel. L'échantillon ainsi préparé est déposé sur la colonne de Séphacryl S 200 avec un débit de 15 ml/h. Les fractions de 0,5 ml sont collectées et lues au spectrophotomètre à 280 nm.

II - 3.4 Chromatographie d'échange d'ions avec le système FPLC

La colonne 5P5PW (LKB ULTROPEC) (215 x 150 mm), échangeuse d'anions que nous avons employée, est constituée d'un gel polymère hydrophile dont le groupe fonctionnel est $C_3H_6SO_3$ - Na^+. La taille des billes du gel est de 13 um avec une limite d'exclusion de 1×10^6.

A cette colonne sont reliés :

- deux pompes P 500 (PHARMACIA),
- une chambre de mélange (PHARMACIA),
- un programmeur de gradient (GP 250 PHARMACIA),
- un injecteur : Valve V-7, muni d'une boucle d'injection de 500 µl (PHARMACIA),
- un détecteur spectrophotométrique LKB 2238 UVICORD SII, équipé d'un filtre à 229 nm,
- un enregistreur Rec 482 (PHARMACIA).

Avant chaque série d'injections, la colonne, conservée dans l'éthanol à 10 %, est rincée par 10 ml de tampon A (Tris/HCl, 10 mM, pH 8) suivi par 10 ml de tampon B (tampon A + NaCl, 500 mM). Afin d'éviter la formation de bulles lors de l'augmentation de la pression, les tampons doivent être filtrés (dispositif GS 047, 0,22 u MILLIPORE) et dégazés 10 min aux ultrasons, avant le démarrage de la chromatographie.

L'échantillon lyophilisé est repris par un volume minimal de tampon A et ajusté à pH 8 avec de la soude 2 N. 500 ul d'échantillons sont injectés à l'aide d'une seringue de 1 ml. Un gradient de 0 à 500 mM de NaCl est ensuite mis en place pour décrocher les molécules retenues (Tableau 3).

Temps (min)	% tampon A Tris/HCl 10 mM pH 8	% tampon B Tris/HCl 10 mM, NaCl 0,5 M pH 8
5	100	0
35	0	100
7	100	0

Tableau 3 : Composition des tampons et gradient utilisés pour la chromatographie d'échange d'ions sur colonne 5P5PW (LKB ULTOPEC).

II - 3.5 Chromatographie d'affinité

Par cette méthode, on procède à la séparation de la population d'anticorps par procédés immunochimiques basés sur l'utilisation d'un ligand immobilisé sur un support appelé matrice, qui a une affinité pour le produit à purifier. Le produit est ensuite désorbé sélectivement, après élimination par lavage des autres produits non fixés.

Les anticorps anti-hPL ont été purifiés à partir de surnageant de culture d'hybridomes, en utilisant un gel de protéine A-sépharose CL-4B (PHARMACIA), qui a la propriété de fixer les immunoglobulines G. Le gel est préalablement équilibré dans un tampon phosphate de sodium 0,1 M, pH 8,9.

La méthode de purification des anticorps monoclonaux de souris par chromatographie d'affinité sur protéine A-sépharose est rapide, efficace et elle permet une purification en une seule étape des immunoglobulines G. La protéine A, composant majeur de la paroi de Staphylococcus Aureus, a pour propriété de fixer

spécifiquement les immunoglobulines par leur partie Fc et particulièrement les IgG2a, IgG2b et IgG3.

L'interaction entre la protéine A-sépharose et les sous-classes d'immunoglobulines dépend du pH. Ainsi, les IgG1, qui ne sont que partiellement absorbées à pH neutre, le sont à pH alcalin : 8,1.

- Réactifs :

Protéine A-sépharose 4B (PHARMACIA LKB, Uppsala, Suède).

4 ml de gel sont utilisés dans une colonne 8 x 80 mm. Toutes les manipulations sont effectuées en chambre froide à +4°C.

Tampons utilisés :
Tampon A : Phosphate de sodium 0,1 M - pH 8,9
Tampon B : Citrate de sodium/acide citrique 0,1 M, pH 5,5
Tampon C : Citrate de sodium/acide citrique 0,1 M, pH 4
Tampon D : Citrate de sodium/acide citrique 0,1 M, pH 3,5
Tampon E : Citrate de sodium/acide citrique 0,1 M, pH 3

Les tampons sont filtrés préalablement sur une membrane à 0,22 µm.

- Protocole :

L'échantillon à purifier peut être du liquide d'ascite ou du surnageant de culture. Son pH est ajusté à 8,9 avec de la soude 1 M ou par dialyse contre le tampon d'équilibrage (Tampon A).

La colonne est préalablement équilibrée avec le tampon A, pendant une nuit avec un débit de 6 ml/h. Pendant la phase de dépôt de l'échantillon, le débit est réglé à 6 ml/h. Pour les phases d'élution, il sera stabilisé à 18 ml/h.

La colonne est lavée avec le tampon A, jusqu'à ce que la D.O. des éluats, lue par spectrométrie d'absorption à 280 nm, atteigne 0. Ceci permet d'éliminer les protéines contaminantes, dont les IgM et les IgA qui ne se lient pas au support (en cas d'un immunsérum).

L'élution séquentielle permet de séparer dans la plupart des cas assez facilement les sous-classes. Les valeurs de pH utilisées sont récapitulées dans le tableau 4.

	IgG1	IgG2a	IgG3	IgG2b
pH recommandé pour l'élution	5,5	4,5	3,5	3
tampon utilisé	B	C	D	E

Tableau 4 : pH et tampons recommandés pour l'élution des différentes sous-classes d'IgG.

La colonne est ensuite régénérée par passage pendant 1 h du tampon E, avec un débit de 18 ml/h.

Le cycle se termine par un rééquilibrage de la colonne à pH 8,9 avec le tampon A. Elle est prête pour une nouvelle utilisation. Elle peut être utilisée pour 50 cycles si elle est utilisée avec les précautions nécessaires.

II - 4 Analyses des protéines et peptides

II - 4.1 Dosage des protéines des surnageants de culture

La concentration en protéines a été mesurée par la méthode de Lowry (Lowry et al., 1951) qui permet de déterminer des concentrations protéiques dans un intervalle allant de 30 à 300 mg/l. Pour chaque dosage, on réalise une gamme étalon avec de la sérum albumin bovine.

II - 4.2 Vérification de la pureté des protéines

La détermination de la pureté des protéines se fait par électrophorèse en gel de polyacrylamide sodium dodécylsulfate (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970).

- Solution acrylamide, bis acrylamide :

Acrylamide		36,6 g
Bis acrylamide		1 g
H_2O	qsp	100 ml

- Composition des gels du système discontinu :

Concentration du gel	13 %	5 %
Solution acrylamide, bis acrylamide	8,7 ml	1,25 ml
Tampon Tris HCl 1 M, pH 8,8	7,5 ml	0
Eau bidistillée stérile	3,7 ml	6,9 ml
Temed 100 %	25 µl	20 µl
Persulfate d'ammonium 30 mg/ml	200 µl	50 µl
SDS 20 %	100 µl	100 µl
Tampon Tris HCl 1 M, pH 6,8	0	1,25 ml

Les échantillons à étudier ont été dissous dans du tampon de gel de concentration contenant SDS 1 % et 2-mercaptoéthanol 5 %. Puis le mélange est placé au bain-marie à 100°C pendant 3 min et mélangé volume à volume, à la solution comprenant du glycérol 20 % et du bleu de Bromophénol. Ce colorant permet de visualiser le front de migration. Le tampon de migration est composé de Tris/HCl 0,05 M, pH 8,9, glycine 0,3M et SDS 0,1 % avec un courant de 60 mA, 30 W, 500 V pour une plaque de 15 x 15 cm, pendant 2 h 30 environ.

Les protéines sont fixées dans une solution de TCA 12 % (P/V) pendant une heure. Puis colorées au bleu de Coomassie R 250 0,1 % (P/V) dans une solution eau/méthanol/TCA (1/1/2 V/V) pendant 2 heures.

Le gel est décoloré dans un mélange eau/éthanol/acide acétique (6,25/3/0,75 V/V).

II - 5 Détermination des caractéristiques des anticorps anti-hPL

II - 5.1 Marquage de l'hPL

Nous avons choisi la méthode à la chloramine T décrite par Greenwood et Hunter (1963). 20 ug d'hPL sont dissous dans 100 ul de tampon phosphate de sodium 0,5 M, pH 7,5 et 10 ul d'iodure de sodium radioactif (activité spécifique de

629 M Bq/ug et une concentration de 3,6 G Bq/ml), sont ajoutés. Pour initier la réaction (température ambiante), 20 ul d'une solution de chloramine T (solution à 1 mg/ml) sont ajoutés sous bonne agitation au Vortex, pendant 30 secondes.

La réaction est interrompue par addition d'une solution réductrice : 100 ul de métasulfite (2 mg/ml dans une solution de phosphate de sodium 0,5 M, pH 7,5). Le milieu réactionnel est immédiatement déposé sur une colonne PD 10 (PHARMACIA), contenant du gel Sephadex G50, équilibrée au préalable par une solution de tampon phosphate 0,05 M, pH 7,5 contenant de la BSA à la concentration de 10 mg/ml.

Le même tampon est utilisé pour l'élution et des fractions de 10 gouttes, soit environ 0,5 ml sont recueillies dans des tubes qui contiennent déjà 0,1 ml de BSA à 2 %, afin d'empêcher l'absorption de l'hormone marquée sur les parois des tubes. Le comptage est réalisé ensuite sur des parties aliquotes de 10 ou 100 ul avec un compteur gamma.

Le profil d'élution fait apparaître 2 pics bien séparés : par test ELISA, on détermine que le premier pic correspond à l'hormone marquée et le deuxième à l'iode libre. Les fractions provenant du premier pic sont rassemblées et conservées à +4°C.

II - 5.2 Détermination de la constante d'affinité

La détermination de la constante d'affinité est basée sur la compétition entre:

- le ligand radiomarqué (concentration fixe de ^{125}I-hPL),
- le ligand froid (concentration variable d'hPL froid), pour leur fixation à des anticorps monoclonaux anti-hPL.

- Dilution du travail :

Pour que la compétition s'établisse, il est indispensable que le nombre de sites d'anticorps offerts soit en défaut par rapport à la concentration d'antigène. Il faut donc, au préalable, rechercher une dilution d'anticorps qui permette en présence de faible quantité d'hormones marquées, d'avoir un rapport hormone liée (B*)/hormone libre (F) égal à 50 %.

- La compétition :

Dans une plaque flexible de 96 puits (FALCON 3911, Micro test III, Flexible ASSAY Plate), nous avons déposé 100 ul dans chaque puits d'une solution de l'anticorps monoclonal anti-hPL (la concentration de l'anticorps est celle qui a permis d'avoir un B*/F = 50 %) dans du tampon bicarbonate pH 9,6. La plaque est incubée une nuit à 4°C, puis lavée trois fois avec du PBS et les sites des puits restés libres sont saturés avec 100 ul de la solution de BSA à 2 %. La plaque est remise à incuber une nuit à 4°C ou une heure à 37°C. 50 ul d'hPL marqué à l'iode 125 à une concentration fixe (40 ng/ml) possédant une activité spécifique de 18,5 G Bq/ug, est déposée seulement dans 24 puits et sur les mêmes puits sont ajoutés le même volume d'hPL froid à des concentrations décroissantes en diluant au 1/2 à partir de 100 ng. Chaque point est répété 4 fois, la plaque est incubée 2 heures sous agitation à 37°C. Après 5 lavages avec du PBS Tween, les puits sont découpés et la radioactivité fixée est comptée dans un compteur gamma.

II - 5.3 Recherche des épitopes de l'hPL

La stratégie que nous avons utilisée pour localiser les épitopes de l'hPL, est la digestion enzymatique ou chimique de cette hormone, suivie de la purification des différents fragments dont l'activité immunologique sera testée par la technique ELISA avec chaque anticorps obtenus dans les différents clones.

II - 5.3.1 Dénaturation de l'hPL

La plupart des épitopes ou déterminants antigéniques sont situés à la surface de la protéine et formés par la structure tertiaire : ils peuvent être des épitopes discontinus, c'est-à-dire constitués d'acides aminés non continus, mais juxtaposés à la surface de la protéine à l'état native (Richards et coll., 1981 ; Benjamin et coll., 1984 ; berzofsky et coll, 1985 ; Van Regenmortel, 1986).

II - 5.3.1.1 Coupure des ponts disulfures

La méthode utilisée est celle de Konisberg (1972), qui consiste à faire une solution d'hPL à 1 % dans un tampon Tris/HCl 0,5 M, pH 8, 8 M d'urée et 2 mM d'EDTA. Les tubes sont saturés à l'azote, fermés et chauffés à 50°C pendant 30 min. A la protéine dénaturée, on ajoute un agent réducteur : le dithiothreitol (DTT), 50 fois molaire, en excès par rapport à la molarité des ponts disulfures.

La solution est saturée une nouvelle fois en azote, puis portée à 50°C pendant 4 heures. Après refroidissement, on ajoute un agent bloquant la reformation des ponts disulfures : l'iodacétamide, à une molarité double de celle du DTT, puis la solution est dialysée contre du PBS.

L'hPL dénaturée est testée par la technique ELISA, en la comparant avec un témoin positif qui est l'hPL native.

II - 5.3.1.2 Hydrolyse chimique par le bromure de cyanogène (CNBr)

Le CNBr coupe spécifiquement les liaisons méthionine-peptide et, dans la plupart des cas, quantitativement, du côté COOH de la méthionine. La Met étant comparativement rare dans les polypeptides (hPL en possède 6), ceci engendre des fragments dans la gamme de tailles désirées.

Un milligramme d'hPL est dissous dans une solution d'acide formique à 70 %, en présence de 2 mg de bromure de cyanogène (David et al., 1990), puis incubé pendant 16 h à température ambiante ou 3 h à 37°C. Après incubation, la solution est dialysée contre un grand volume d'eau physiologique jusqu'à élimination totale du bromure de cyanogène. La solution est évaporée à l'appareil "Speed-Vac", puis les tubes sont gardés à -20°C. La digestion est suivie au cours du temps par électrophorèse sur gel de polyacrylamide à une concentration de 20 % pour apprécier le temps où l'hydrolyse de l'hPL est complète.

II - 5.3.2 Séparation des fragments peptidiques par chromatographie HPLC

La séparation est obtenue sur un appareil MILLIPORE Waters, piloté par une station informatique NEC APC IV. Les chromatogrammes obtenus sont analysés à l'aide du logiciel Waters Maxima 820, version 3-02.

Un volume de 100 ul, équivalent à 100 ug de fragments, est déposé sur une colonne C4 Butyl Aquapur Applied Biosystems (4.6 x 250 mm, 300 x 10^{-10}). Le débit est de 0.6 ml/min, en gradient linéaire d'acétonitrile (CH_3CN) en présence de 0,1 % d'acide trifluoroacétique (TFA) ; la lecture se fait à 214 nm.

II - 5.3.3 Séparation des peptides par électrophorèse capillaire

L'appareil utilisé, le P/ACE System 2000 (BECKMAN), équipé d'un capillaire de 75 um de diamètre et 75 cm de longueur (la longueur utile jusqu'au détecteur est de 50 cm). Les électrogrammes sont analysés par le logiciel Maxima 820 Waters.

Les peptides sont élués par un tampon citrate 20 mM, pH 2,5 à 30°C et la détection est faite à 200 nm.

II - 5.3.4 Identification des pics séparés par HPLC

Les fractions obtenues sont distribuées à raison de 100 ul par puits, pour chaque fraction dans une plaque de 96 puits ainsi qu'un témoin positif composé de l'hPL à 2 ug/ml dans le tampon bicarbonate pH 9. L'opération est poursuivie comme dans le cas d'un test ELISA spécifique.

II - 5.3.5 Séquençage et structure de l'épitope

Le séquençage a été effectué au CNRS au service central d'analyse (Docteur Denoroy, Lyon). Les séquences d'acides aminés identifiés après chaque cycle de dégradation, sont analysées selon leur agencement et leur position dans la structure générale de l'hPL pour définir la région où se trouve l'épitope.

II - 6 Etude de la relation hPL-AMPc

II - 6.1 Etude de la fixation de l'AMPc sur l'hPL

Nous avons étudié la réaction hPL anti-hPL en présence et en absence d'AMPc. Pour cela, nous avons distribué, à raison de 100 ul par puits dans une plaque de 96 puits, une solution d'hPL à 2 ug/ml dans le tampon bicarbonate, pH 9,6 (voir test ELISA). La suite de l'expérience est résumée sur le tableau 4.

La quantité d'AMPc fixé sur l'hPL étant révélée par un second anticorps marqué à la péroxydase (TAGO).

N° des puits	1-2	3-4	5-6	7-8	9-10	11-12
hPL 2 ug/ml (ul)	100	100	100	100	100	100
Rangée (A) anti-hPL 100 ul	pur	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
Rangée (B) anti-hPL 100 ul + 20 pM d'AMPc par puits	pur	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
Rangée (C) Témoin négatif anti-hPL	0	0	0	0	0	0

Tableau 5: Protocole de l'étude de la fixation de l'AMPc sur l'hPL.

II - 6.2 Dialyse à l'équilibre

Dans deux compartiments A et B séparés par une membrane semi-sélective, à seuil de coupure 1000 daltons, nous avons mis deux solutions formées de :

	Compartiment A	Compartiment B
PBS/ml	2	2
AMPc froid en nM	0,05	0,05
AMPc radioactif en nM	0,05	0,05
hPL en pM	0	0-12,5-25-50

Les tubes sont maintenus sous agitation à 4°C pendant 24 heures, puis la radioactivité de chaque compartiement est mesurée.

II - 6.3 Passage de l'hPL sur une colonne d'agarose-AMPc

Cette expérience nous permet de confirmer la liaison AMPc-hPL en utilisant l'AMPc fixé sur l'agarose comme ligand, pouvant présenter une affinité avec l'hPL.

- Réactifs :

- gel d'agarose-AMPc (SIGMA)
- tampon Tris/HCl , pH 7,5, NaCl 150 mM, Charps 2 %
- NaCl 150 mM
- Charps 2 % (3-[(3-cholamidopropyl)diméthylammonio]-1-propanesulfonate) (SIGMA)
- hPL 1 mg (UCP)
- SDS à 5 % et à 10 % dans du tampon Tris/HCl, pH 7,5

- Mode opératoire :

1 g de gel sec est mis à gonfler pendant 30 min dans le tampon Tris/HCl, pH 7,5 et lavé (100 ml) sur filtre MILLIPORE HA 0,45 um. Le gel est coulé dans une colonne (2 x 5 cm) qui est ensuite équilibrée avec le même tampon pendant une nuit à un débit de 4 ml/h.

L'hPL commercial est repris dans 1 ml d'eau distillée et il est déposé sur la colonne avec un débit de 4 ml/h, puis le débit est augmenté à 16 ml/h pour les phases suivantes. Après l'injection de l'échantillon, la colonne est lavée avec le même tampon afin d'éliminer les protéines non fixées, jusqu'à ce que l'absorbance des tubes, lue à 280 nm, revienne à 0.

Les tampons d'élutions Tris/HCl, NaCl 150 mM, pH 7,5 à 1 % et à 2 % de SDS sont passés successivement à un débit de 16 ml/h de manière à éluer l'hPL fixée sur le gel. La présence d'hPL dans les différents pics est testée par la technique ELISA.

Une deuxième expérience a été refaite en modifiant les conditions. Le charps et NaCl ont été enlevés du tampon. Le temps de contact entre agarose et l'hPL a été porté à 18 h.

L'élution se fait par 500 mmoles de NaCl dans le tampon Tris/HCl en mesurant la DO, puis par SDS 1 % dans le tampon Tris /HCl.

II - 6.4 Mesure de l'activité kinasique

Les kinases ou ATP protéines phosphotransférases catalysent le transfert du phosphate terminal de l'ATP sur des substrats protéiques variés.

L'activité kinasique est déterminée par la mesure de l'incorporation du ^{32}P dans des histones, ou de la caséine, selon la méthode de Tao (1972) et celle de Vuillemin-Gelot (1975).

II - 2.6.4.1 En utilisant la caséine comme substrat

- Réactifs :

- ATP marqué au ^{32}P en gamma (AMERSHAM) dilué au 1/25 : activité spécifique 74.10^6 Bq/nmole ; 37 G.Bq/ml
- Tampon Tris/HCl pH 8,5, 200 mM
- Caséine (MERCK) concentration initiale 50 mg/ml
- hPL (UCP) concentration initiale 1 mg/ml
- Protéine kinase AMPc dépendante de coeur de boeuf (SIGMA) à 1 mg/ml

- Mode opératoire :

Le protocole de la réaction est résumé dans le tableau 5. Le volume final du mélange réactionnel est de 0,2 ml.

La réaction est arrêtée par addition de BSA et d'acide trichloracétique. Le précipité est recueilli sur des disques de fibres de verre (WATMANN GF/C) et lavé 5 fois avec 2 ml d'acide trichloacétique à 10 %. La radioactivité des disques est comptées.

	Blanc	PK_2	hPL_1	hPL_2	hPL_3	hPL_4	hPL_5
Tampon µl	160	140	158	165	150	145	140
$ATPYP^{32}$ µl	10	10	10	10	10	10	10
AMPc ul (160 pMol/ml)	20	20	20	20	20	20	20
Caséine µl	10	10	10	10	10	10	10
PK µl	-	20	-	-	-	-	-
PK pmol	-	110	-	-	-	-	-
hPL µl	-	-	2	5	10	15	20
hPL pmol	-	-	92	231	462	693	924
Le mélange est incubé 10 min à 37°C, puis							
BSA 30 ng/ml	20	20	20	20	20	20	20
TCA 10% ml	2	2	2	2	2	2	2

Tableau 6 : Mode opératoire pour déterminer l'activité kinasique d'après TAO (1972).

La même mesure de l'activité kinasique a été faite en présence d'anticorps anti-hPL ajoutés à des doses constantes (voir résultats).

II - 6.4.2 En utilisant le lysat de lymphocytes humains comme substrat

Au cours de la grossesse, l'hPL passe dans la circulation maternelle et régule entre autre, le métabolisme énergétique chez la mère, afin que cette dernière puisse fournir au foetus les substrats dont il a besoin. Si l'hPL agit en tant que kinase, les cellules sanguines (lymphocytes) pourraient contenir le substrat spécifique de cette kinase. C'est pourquoi nous avons testé l'activité kinasique de l'hPL sur un lysat de lymphocytes humains.

- Préparation du lysat lymphocytaire :

Les cellules mononucléées du sang ont une densité différente de celle des granulocytes. Boyum, en 1968, décrivait la technique qui permet, par centrifugation en gradient de densité, de retenir les cellules mononucléées (lymphocytes et monocytes) et d'agglutiner la plupart des granulocytes.

- Matériel :

- centrifugeuse basse vitesse réfrigérée
- tubes à centrifuger de 50 ml transparents
- héparine Roche (5000 U/ml)
- PBS
- MSL (milieu de séparation des lymphocytes, MSL 2000, EUROBIO)

- Méthode :

Le lysat cellulaire est utilisé comme substrat pour mesurer l'activité kinasique de l'hPL.

- le sang est prélevé stérilement dans un flacon contenant 1 ml d'héparine pour 100 ml de sang
- le sang est dilué au 1/2 avec du PBS
- dans un tube à centrifuger de 50 ml, il est déposé 10 ml de MSL, auquel on ajoute 20 ml de sang dilué
- l'ensemble est centrifugé pendant 30 min à 580 g
- la couche supérieure du plasma est éliminée à l'aide d'une pipette Pasteur
- les lymphocytes sont lavés avec du PBS et centrifugés pendant 10 min à 390 g.
- le culot est repris dans 0,5 ml de PBS
- les cellules sont lysées par sonication durant 3 min
- les lysats des cellules sont centrifugées pour éliminer les membranes cellulaires
- pendant notre travail, nous avons utilisé une concentration de 3 mg/ml de protéines lymphocytaires
- mesure de l'activité kinasique

Le même protocole que précédemment a été utilisé ; la caséine a été remplacée par 10 µl de lysat lymphocytaire.

II - 6.5 Immunotransfert

La technique d'immunotransfert combine la résolution de l'électrophorèse sur gel et la spécificité de la détection immunochimique. Cette technique est utilisée pour déterminer certaines caractéristiques des protéines ainsi mises en évidence (quantité, poids moléculaire apparent et rendement d'extraction).

L'immunotransfert se déroule en six étapes successives :

1 - Préparation de l'échantillon
2 - Migration de l'échantillon sur gel d'électrophorèse
3 - Transfert des protéines sur une membrane
4 - Blocage des sites de fixation non spécifiques de la membrane
5 - Réaction avec l'anticorps
6 - Révélation

II - 6.5.1 Préparation de l'échantillon

40 µl de la solution hPL à 1 mg/ml est mélangée avec 40 µl du tampon : Tris/HCl 1 M, SDS 2 %, DTT 100 mM, pH 8,8 et bleu de bromophénol 0,01 %.

L'échantillon est placé dans un bain-marie à 100°C pendant 5 min. puis centrifugé à 10.000 g pendant 10 min. Le surnageant est récupéré. Les échantillons peuvent alors être conservés à -20°C, ils sont stables pendant plusieurs mois.

Les échantillons sont désormais prêts pour l'électrophorèse.

II - 6.5.2 Migration de l'échantillon sur gel d'électrophorèse

Nous avons utilisé un gel commercialisé (phast-gel, PHARMACIA) à 20 % de polyacrylamide imbibé dans un tampon d'acétate à 0,112 M, Tris 0,112 M, pH 6,8.

Le tampon utilisé au niveau des deux électrodes (anode et cathode) est :

- pour l'électrophorèse dans les conditions dénaturantes : tricine 0,88 M, Tris 0,20 M, SDS 0,55 %, agarose 2 %.

- pour les conditions non dénaturantes : alanine 0,88 M, Tris 0,25 M, agarose 2 %, pH 8,1.

II - 6.5.3 Transfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose

La méthode de transfert des protéines, du gel à la membrane de nitrocellulose, est souvent rapide, efficace et ne requiert pas de générateurs électriques de forte puissance.

- Mode opératoire :

- Les électrodes de l'appareil de transfert semi-sec sont rincées avec de l'eau distillée.
- Six feuilles de papier absorbant (watman 3 MM) ainsi que la membrane de nitrocellulose sont découpés à la taille du gel.
- La membrane de nitrocellulose est émergée dans un bain d'eau distillée pendant 20 min, puis immergée pendant 2 min. Le papier absorbant est mouillé dans le tampon suivant :

	Concentration	Pour 1000 ml
Tris base	48 mM	5,8 g
Glycine	39 mM	2,9 g
SDS	0,037 % (poids/volume)	0,37 g
Méthanol	20 %	200 ml
Eau distillée		qsp 1000 ml

- Sur la plaque inférieure de l'appareil sont déposés : le gel, la nitrocellulose et le papier absorbant dans l'ordre suivant :

* électrode
* trois feuilles de papier absorbant imbibés de tampon de transfert
* la membrane imbibée d'eau
* le gel de polyacrylamide légèrement mouillé avec de l'eau
* trois feuilles de papier absorbant imbibées de tampon de transfert

- L'électrode (la cathode) est ensuite placée soigneusement sur l'ensemble. Après avoir connecté les électrodes, le transfert est démarré. Le transfert dure de 45 min à 1 h 30, en utilisant 0,8 mA par cm^2 de gel, 20 V et 1 Watt à une température de 15°C.

- Après une heure de transfert, l'ensemble est démonté et la membrane est marquée pour conserver son orientation.

II - 6.5.4 Blocage des sites de fixation non spécifiques de la membrane

La membrane est lavée 5 fois dans du PBS, puis elle est incubée durant une nuit dans du PBS contenant 3 % de BSA à une température de 37°C sous agitation.

La membrane de nitrocellulose est lavée ensuite 5 fois avec du PBS pendant 5 min.

II - 6.5.5 Réaction avec les anticorps

Les protéines fixées sur la membrane sont détectées grâce à une réaction antigène-anticorps. Les anticorps peuvent être marqués, permettant de détecter directement l'antigène (détection directe), ou non marqués. Ils seront alors révélés par des réactifs secondaires marqués (détection indirecte).

Nous avons choisi la deuxième méthode, car les réactifs secondaires commercialement disponibles sont nombreux.

La membrane est incubée dans 1 ml de la solution d'anticorps à 60 ug/ml dans du PBS pendant une nuit sous agitation.

II - 6.5.6 Révélation

La membrane est lavée 5 fois dans du PBS-Tween 0,05 % (NaCl 150 mM, Tris 50 mM, pH 7,5) pendant 5 min. La membrane est ensuite incubée pendant 2 h à 37°C avec le deuxième anticorps anti-IgG de souris lié à la phosphatase alcaline, dilué au 1/4000 dans du PBS. La membrane est lavée 5 fois avec du PBS pendant 5 min puis incubée pendant 30 min dans la solution de révélation préparée de la façon suivante :

- Préparation des trois solutions stock :

. dissoudre 0,5 g de NTB dans 10 ml de diméthylformamide 70 %

. dissoudre 0,5 g de BCIP dans 10 ml de diméthylformamide 100 %

. tampon pour la révélation de l'activité phosphatase alcaline : NaCl 100 mM, $MgCl_2$ 5 mM, Tris 100 mM (pH 9,5)

Toutes ces solutions sont stables à 4°C pendant au moins un an.

- Préparation de la solution de révélation :

66 ul de la solution stock de NBT sont ajoutés à 10 ml de tampon pH 9,5. Après avoir bien mélangé les solutions, 33 ul de la solution stock de BCIP sont ajoutés. Ce mélange doit être utilisé dans l'heure qui suit la préparation.

La réaction est arrêtée par rinçage de la membrane par du PBS contenant 20 mM d'EDTA.

III - RESULTATS

III - 1 Fabrication d'hybridomes anti-hormone lactogène placentaire

A 6 souris femelles F1 de 8 semaines ont été injectés, en intrapéritonéale, 3 fois 35 ug d'hPL + ACF, puis 6 mois après 250 ug d'hPL + IFA à celle qui présentait le taux d'anticorps le plus important.

$1,3.10^8$ lymphocytes ont été fusionnés avec 4.10^7 cellules de myélome dont le temps de doublement était de 15 h. Les cellules ont été réparties à raison de $3,2.10^5$ cellules fusionnées par puits. Nous avons obtenu 60 % de puits présentant des clones. 156 d'entre eux ont été testés (Tableau 7).

La démarche de sélection est résumée dans le tableau 8 :

Cette fusion a donné d'excellents résultats : les densités optiques du test ELISA ont été élevées dès le départ de la manipulation et le sont restées jusqu'au 5ème test.

Après le 3ème test ELISA, on peut remarquer que tous les clones sont issus soit du clone n° 1 (le plus sécrétant), soit du clone n° 10 (le moins sécrétant). Donc, là aussi, nous avons la preuve qu'il est difficile de sélectionner à priori les 3 ou 4 clones les plus sécrétants afin d'alléger les séries d'ELISA et de clonages.

III - 1.1 Production des anticorps in vitro

Le Tableau 9 donne le taux d'immunoglobulines anti-hPL, exprimé en DO, sécrété dans les surnageants de culture. Le suivi des sécrétions au cours du temps fait ressortir que les clones 1.1.4.4.1, 1.1.4.4.4, 1.1.4.4.5 et 1.1.4.4.6 sont toujours restés élevés en DO et on peut penser que la régularité dans la sécrétion est une preuve de la stabilité future des hybridomes.

156 puits

ELISA 1 ---> 100 % des puits à DO > 1

Clonage 1 sur les 10 plus sécrétants (1,6 < DO > 1,2)

ELISA 2 sur 93 puits ---> 98,5 % des puits à DO > 1,5

Clonage 2 sur les 7 plus sécrétants (2,2 > DO > 0,9)

ELISA 3 sur 138 puits monoclonaux ---> 86 % > 1,5 en DO

Clonage 3 sur les 10 plus sécrétants

ELISA 4 sur 115 puits monoclonaux ---> 98 % > 1,5 en DO

Clonage 4 sur les 9 puits les plus sécrétants

ELISA 5 sur 74 puits monoclonaux ---> 100 % > 1,5

Conservation des 10 puits les plus sécrétants

Passage en ascite du clone 11.4.3.1

Congélation des puits

Mise en prolifération du clone 1.1.4.3.1 et du clone 10.8.10.9.10

Tableau 7 : Résumé des différentes étapes de la création d'hybridomes anti-hPL.

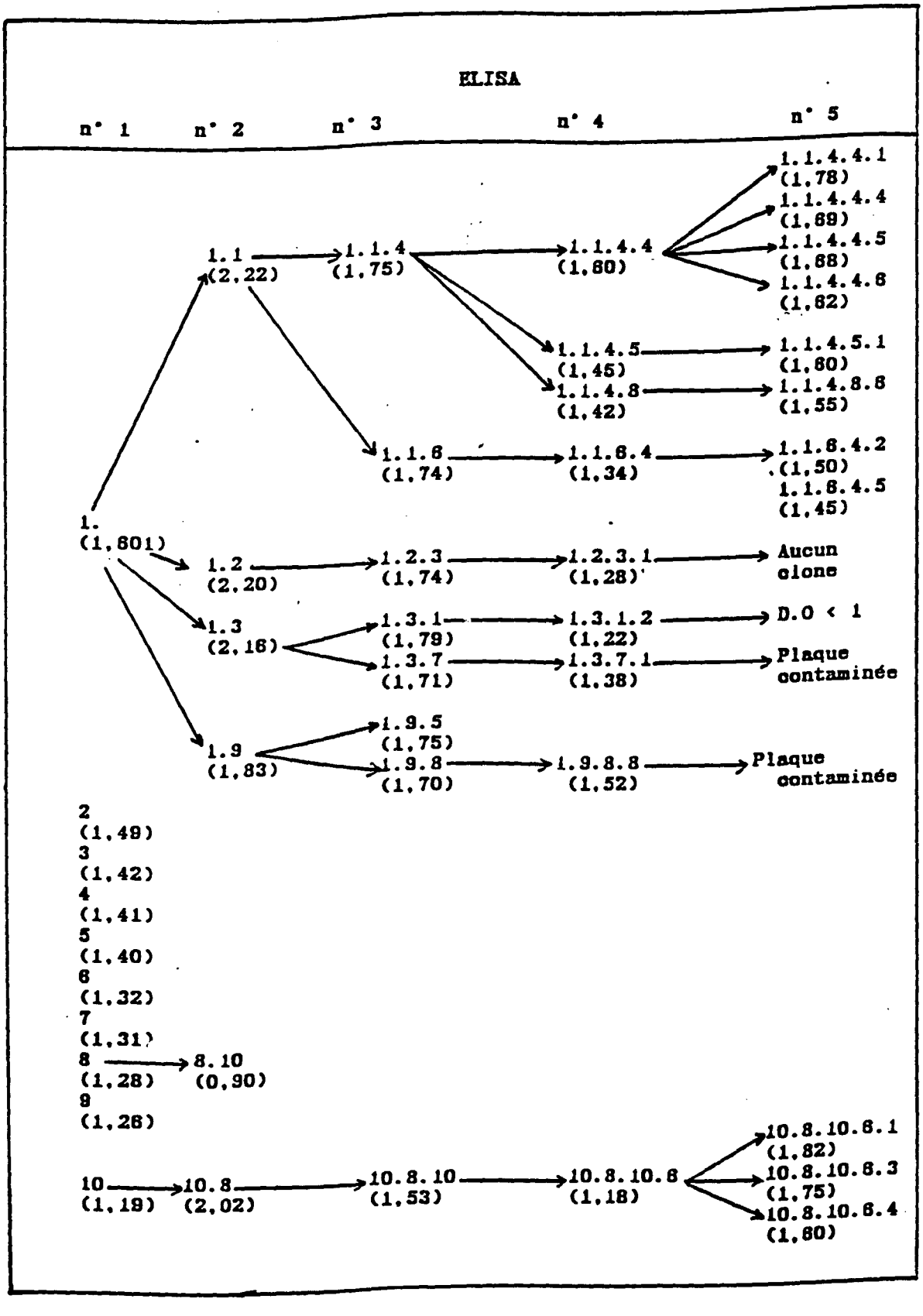


Tableau 8 : Suivi des DO au cours des différents test ELISA lors de la création d'anticorps monoclonaux anti-hPL après immunisation in vivo.

	Dilution			
	Pur	1/10	1/100	1/1000
Hybridomes				
1.1.4.4.1	1,78	1,220	0,760	0,150
1.1.4.4.4	1,69	1,134	0,740	0,151
1.1.4.4.5	1,68	1,369	0,680	0,131
1.1.4.4.6	1,62	1,093	0,720	0,150
1.1.4.5.1	1,60	1,314	0,593	0,130
1.4.1.8.6	1,55	1,170	0,700	0,175
1.1.6.4.2	1,50	1,222	0,750	0,144
1.1.6.4.5	1,45	1,042	0,655	0,205
10.8.10.6.1	1,82	1,166	0,550	0,120
10.8.10.6.3	1,75	1,269	0,630	0,130
10.8.10.6.4	1,60	1,049	-	-

Tableau 9 : Concentration en anticorps monoclonaux spécifiques anti-hPL, sécrétés par les hybridomes sélectionnés. Les résultats sont la moyenne des densités optiques (DO) de trois essais obtenus par test ELISA. La longueur d'onde de lecture est comprise entre 450-650 nm.

Nous travaillons la plupart du temps avec ces souches d'hybridomes qui sont en effet facile à cultiver et bien sécrétantes.

Ces 4 hybridomes ont été cultivés à long terme, dans des flacons de 25 cm^2. Le milieu utilisé est du RPMI 1640 supplémenté avec 10 % de SVF. Les surnageants de culture sont conservés à -20° C jusqu'à la purification des anticorps.

Après 4 ans, il reste au laboratoire les 11 clones sélectionnés, conservés à -196° C et ils sont toujours sécrétants.

III - 1.2 Production d'AcM in vivo

Différents hybridomes issues de 5 clones sélectionnés, sont injectés dans des des souris Balb/c, le tableau 10 donne la concentration en anticorps dans les ascites obtenues lors des différentes expériences. Le taux d'anticorps dans les liquides d'ascites varie entre 0 et 8,5 mg/ml.

La durée de développement des tumeurs varie entre 1 à 3 semaines. Les souris 1 et 3 n'ont pas développé de tumeur et l'une d'elle est morte 2 mois après la première inoculation.

	Souris 1	Souris 2	Souris 3	Souris 4	Souris 5
Clones	1.1.4.4.1	1.1.4.4.4	1.1.4.4.5	1.1.6.4.5	1.1.6.4.2
Taux d'Ac obtenus dans l'ascite (mg/ml)	8,5	6,5	0	0	6,9

Tableau 10 : Les concentrations d'anticorps obtenus dans l'ascite.

III - 2 Isotypage des anticorps

Le tableau 11 donne le typage des anticorps à purifier. Tous les anticorps monoclonaux que nous avons obtenus par clonages successifs, sont de la sous-classe IgGI.

Hybridomes	Lignes de précipitation positive sur les bandes							
	IgA	IgM	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3	K	T+
1.1.4.4.1			+				+	+
1.1.4.4.4			+				+	+
1.1.4.4.5			+				+	+
1.1.4.4.6			+				+	+
1.4.1.8.6			+				+	+
1.1.6.4.2			+				+	+
1.1.6.4.5			+				+	+
10.8.10.6.1			+				+	+
10.8.10.6.3			+				+	+
10.8.10.6.4			+				+	+

Tableau 11 : Isotypage des anticorps monoclonaux anti-hPL sélectionnés.
T+ : Témoin positif ; il contient des anticorps anti-IgA, anti-IgM, anti-IgG2a, anti-IgG2b et anti-IgG3.

III - 3 Spécificité de l'anticorps

Nous avons étudié la spécificité de l'anticorps vis-à-vis de plusieurs hormones hypophysaires de structure voisine de celle d'hPL : HGH et prolactine. La figure 9 montre que l'anticorps monoclonal produit ne réagit qu'avec l'hPL.

III - 4 Purifications des anticorps contenus dans les milieux de culture ou d'ascites

Le dosage protéique est effectué selon la méthode de Lowry avant et après chaque étape de purification.

III - 4.1 Précipitation par le sulfate d'ammonium

La concentration de sulfate d'ammonium utilisée est de 45 %. Le précipité a été reconstitué dans un volume d'eau physiologique à 1/100 du volume de départ puis dialysé contre de l'eau distillée puis contre du tampon TRIS-HCl 10 mM pH 8.

Le tableau 12 donne les concentrations des protéines totales, la densité optique des IgG mesurées par ELISA, et le rendement de la précipitation au sulfate d'ammonium des échantillons comprenant un liquide d'ascite et 3 surnageants de culture. Nous constatons qu'après précipitation, la concentration en protéines totales est peu modifiée, alors qu'il y a une chute de l'activité de l'anticorps. C'est pourquoi nous n'avons pas retenu cette technique de précipitation pour la suite des expériences qui n'est pas suffisamment spécifique pour isoler les immunoglobulines.

III - 4.2 Chromatographie par échange d'ions en FPLC analytique

La chromatographie analytique permet de déterminer les conditions optimum qui seront ensuite appliquées à la FPLC préparative de séparation et de purification des immunoglobulines.

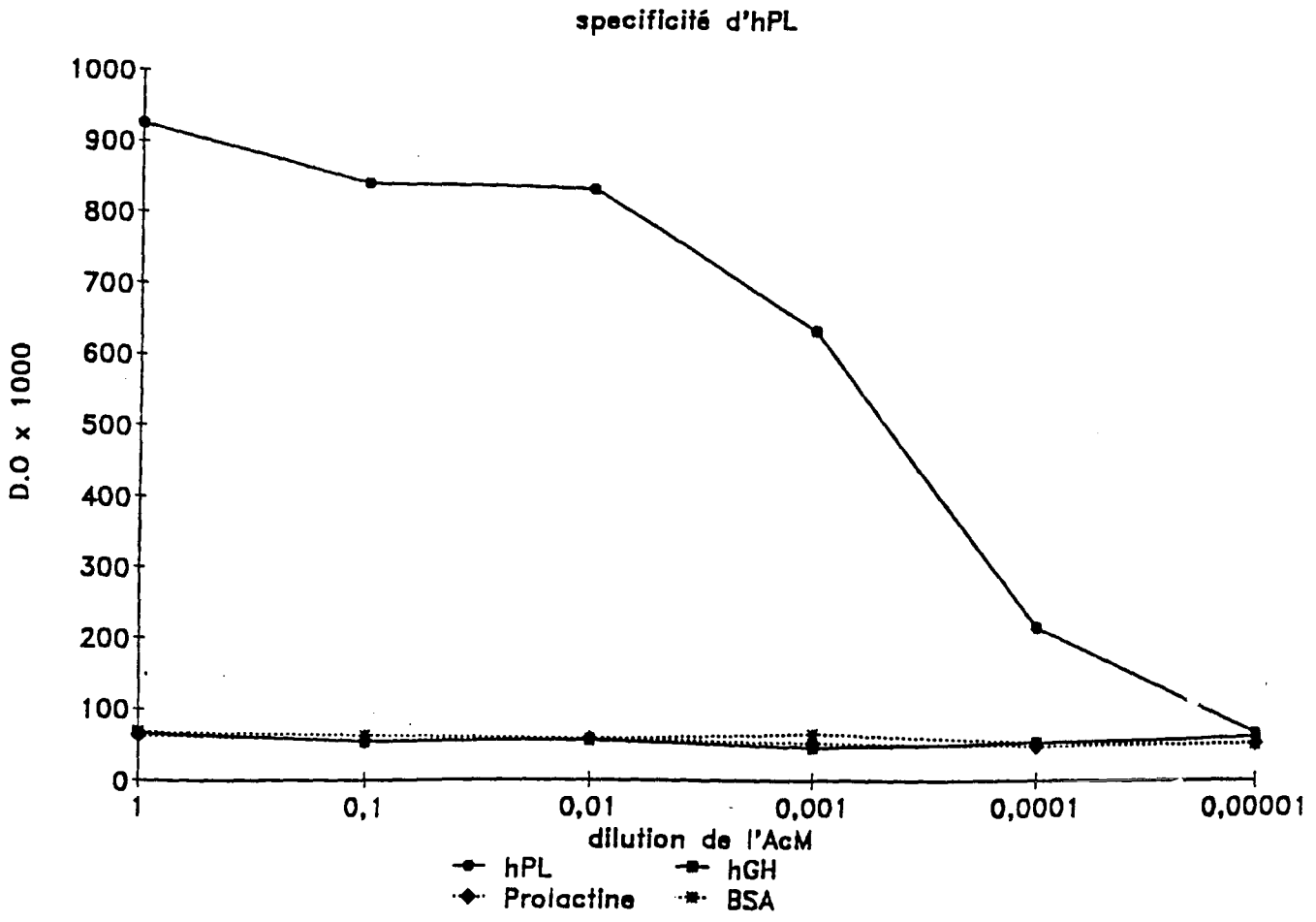


Figure 9 : Détermination de la spécificité de l'anticorps monoclonal anti-hPL obtenu avec le clone 1.1.4.4.1.

L'anticorps est incubé pendant une nuit à 4°C. La concentration des hormones est :

- hGH (2 µg/ml)
- Prolactine (2 µg/ml)
- hPL (2 µg/ml)
- BSA (0,6 µg/ml).

III - 4.2.1 Surnageant

La figure 10 montre le profil chromatographique d'un échantillon de 500 ul de surnageant, obtenu par incubation de 10^6 cellules/ml pendant 48 heures à 37° C. L'échantillon n'a pas été concentré. Après élution sous l'effet d'un gradient linéaire de NaCl compris entre 0 et 0,5 M, le profil présente 4 pics.

Les fractions correspondant aux différents pics obtenus, sont dosées en ELISA et des IgG sont détectées au niveau du pic n° 2 et 3 avec une densité optique très faible, il est donc nécessaire de concentrer l'échantillon par ultrafiltration et gel filtration.

III - 4.2.2 Chromatographie sur gel séphacryl S200

La figure 11 représente un profil type obtenu après filtration sur gel de séphacryl S200 de 3 ml de surnageant à 1 mg/ml de protéines, préalablement ultrafiltré sur membrane à seuil de coupure 100 000 et lyophilisé. Nous avons obtenus 2 pics, les fractions collectées correspondant à ces 2 pics sont rassemblées, et dosées en ELISA. Des IgG sont détectées au niveau des 2 pics avec une concentration plus importante pour le pic n° 1.

III - 4.2.3 Surnageant d'hybridome issu de gel filtration

La figure 12 montre le profil chromatographique obtenu à partir d'un échantillon de 500 ul issu du premier pic de gel filtration concentré 3 fois par ultrafiltration, lyophilisé et repris par 1 ml de la solution NaCl 0,1 M, Tris-HCl 10 mM, pH 8. Le profil obtenu avec un gradient continu de NaCl, présente 5 pics. Le dosage spécifique des anticorps anti-hPL dans les fractions correspondant aux différents pics, montre la présence d'anticorps anti-hPL au niveau des pics 3 et 4. Et quand le même échantillon est repris dans une solution NaCl 0,1 M, Tris-HCl 10 mM pH 7, nous avons obtenu 3 principaux pics (Figure 13) et la plupart des immunoglobulines se trouvent dans le premier pic.

Les immunoglobulines se trouvant dans le premier pic sont éluées entre 0 et 0,14 M de NaCl. En réalisant sur le même échantillon une purification par un gradient par palier de NaCl (Figure 14) 0 de NaCl pendant 10 min, 0,14 M de NaCl pendant 15 min, 0,3 M de NaCl pendant 30 min et 0,5 M de NaCl. Nous avons détecté effectivement que le premier pic élué par 0,14 M de NaCl, regroupe la plupart des immunoglobulines.

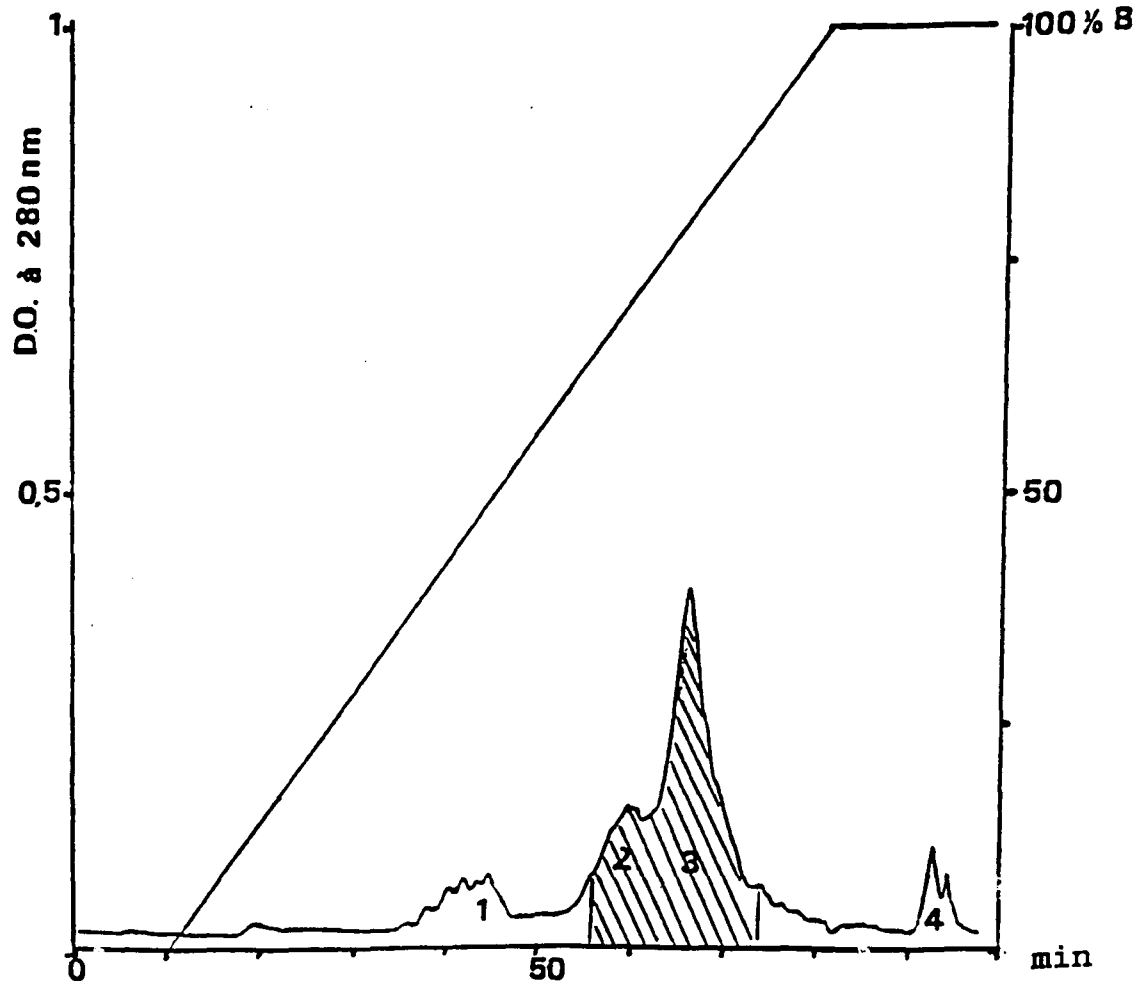


Figure 10 : Profil d'élution d'un surnageant d'hybridome 1.1.4.4.1.

Echantillon : surnageant d'hybridome 1.1.4.4.1 non concentré.

Injection : 500 µl (après filtration).

Débit : 1 ml/min.

Colonne LKB Ultrapac PSK DEAE 5PW 7,5/75 mm.

Phase mobile : solvant primaire-A- : Tris/HCl 10 mM pH 8

solvant secondaire -B- : Tris/HCl 10 mM pH 8, NaCl 0,5 M.

Détecteur : 280 nm.

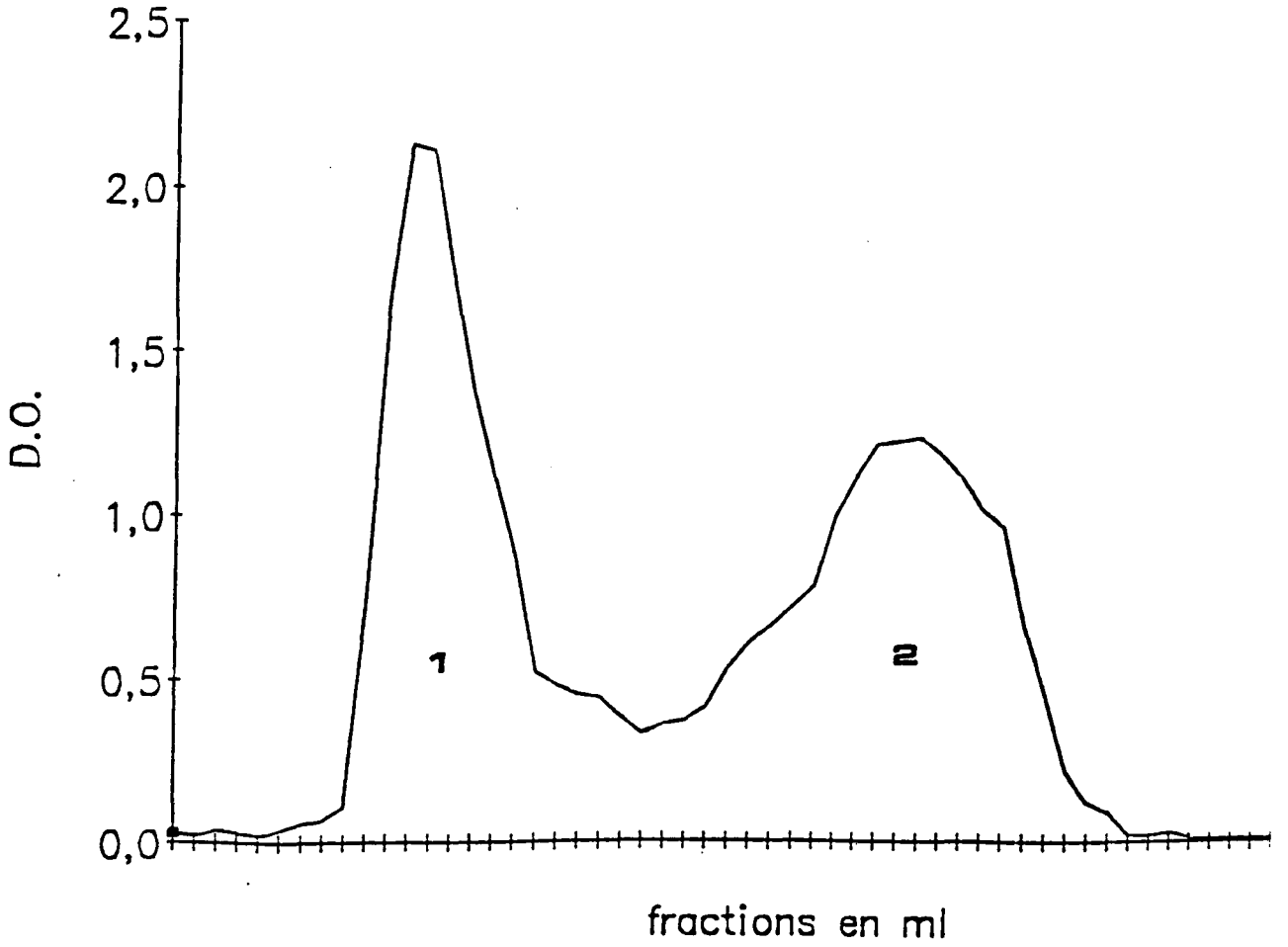


Figure 11 : Chromatographie sur Séphacyl S200 d'un surnageant d'hybridome 1.1.4.4.1 :

Colonne 1,5 x 80 cm, débit de 15 ml.h-1 ; tampon Tris/HCl 0,5 M pH 8,5.

3 mg d'échantillon lyophilisé, repris dans le même tampon, filtré et alourdi par du sucrose, ont été déposés.

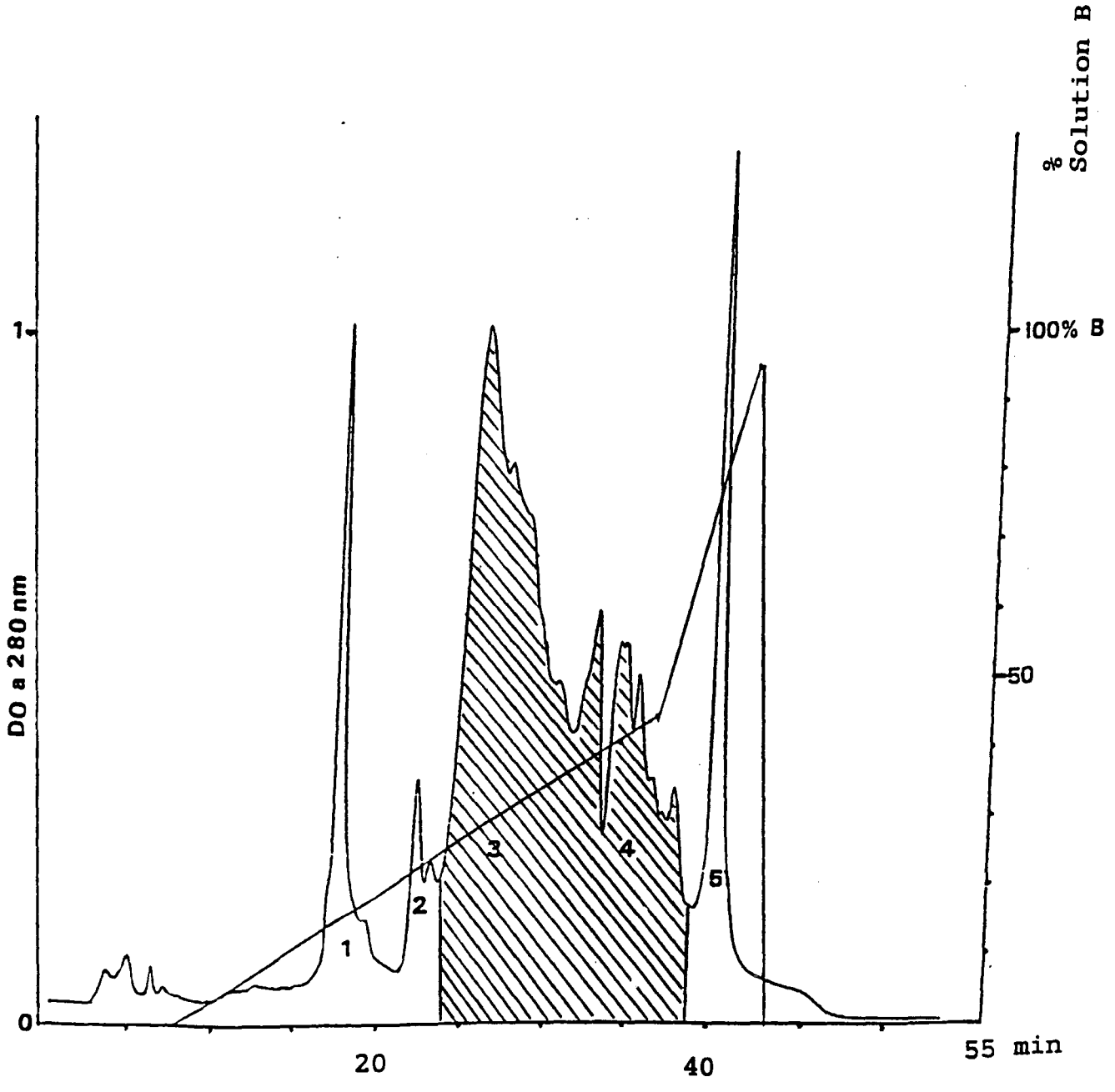


Figure 12 : Profil d'élution du pic 1 provenant de la chromatographie gel filtration sur Séphacryl S200.

Echantillon : 500 µg de protéines.

Injection : 500 µl (après filtration).

Débit : 1 ml/min.

Colonne LKB Ultrapac TSK DEAE 5PW 7,5/75 mm.

Phase mobile : solvant primaire -A- : Tris/HCl 10 mM pH 8.

Solvant secondaire -B- : Tris/HCl 10 mM pH 8, NaCl 0,5 M.

Détecteur UV : 280 nm.

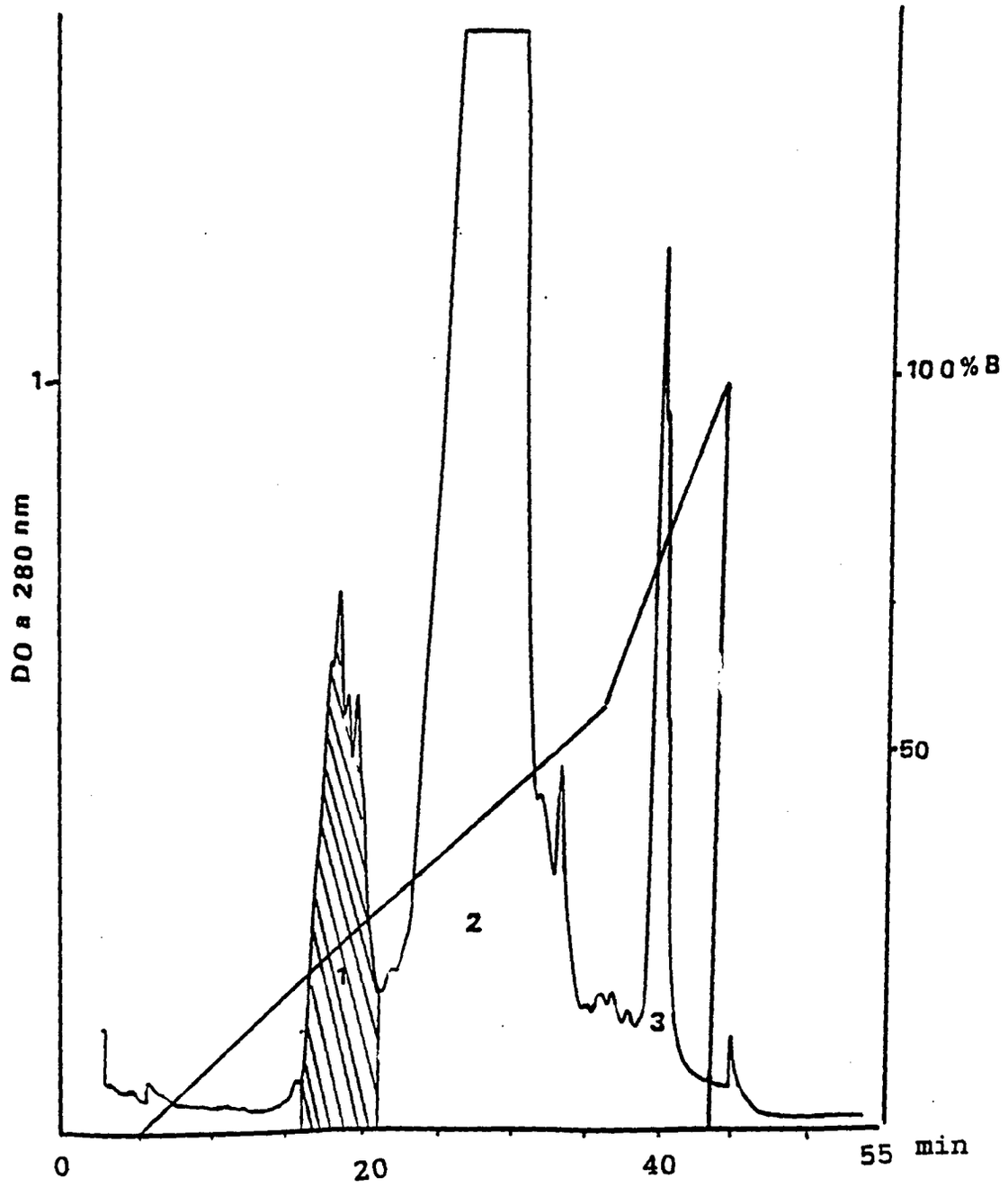


Figure 13 : Profil d'élution du pic 1 provenant de la gel filtration sur Séphacryl S200.

Echantillon : 500 µg de protéines.

Injection : 500 µl (après filtration).

Débit : 1 ml/min.

Colonne LKB Ultrapac TSK DEAE 5PW 7,5/75 mm.

Phase mobile : solvant primaire -A- : Tris/HCl 10 mM pH 7

solvant secondaire -B- : Tris/HCl 10 mM pH7 , NaCl 0,5 M.

Détecteur UV : 280 nm.

Provenance	Concentration en protéines totales (mg/ml)		Rendement (%)	DO 450-650 nm dilution à 10^{-4}	
	Av	Ap		Av	Ap
1.1.4.4.1 (Ascite)	199	183	92,2	1,34	0,66
				Dilution à 10^{-1}	
1.1.4.4.4 Surnageant culture (SC)	732	637	87,0	1,24	0,71
1.1.4.4.5 (SC)	633	602	95,2	1,37	0,68
1.1.6.4.2 (SC)	452	422	93,3	1,17	0,75

Tableau 12 : Dosage des protéines (en mg) et la DO dans les surnageants de culture et de l'ascite.

Le dosage est fait selon la méthode de Lowry avant (Av) et après (Ap) précipitation au sulfate d'ammonium.

La densité optique (DO) est déterminée par le test ELISA.

Le volume traité est de 100 ml pour les surnageant de culture, et de 6 ml pour l'ascite.

III - 4.3 Chromatographie par échange d'ions en FPLC préparative

La chromatographie préparative a été réalisée dans les mêmes conditions, sur un échantillon provenant du même surnageant, le volume d'injection est de 500 ul avec une concentration protéique de l'ordre de 10 mg/ml.

La figure 15 montre le même profil que celui obtenu en analytique, le deuxième pic est le seul à contenir les immunoglobulines.

III - 4.4 Purification par chromatographie d'affinité sur protéine A-Sépharose CL4B

Trois échantillons de 50 ml de surnageant de culture, correspondant à des clones 1.1.4.4.1, 1.1.4.4.4 et 1.1.4.4.5 sont concentrés par ultrafiltration sur membrane à seuil de coupure 10 000 jusqu'à un volume de 3 ml et sont injectés sur la colonne de 5 ml de protéine A-Sépharose CL4B.

Par la suite, 7,5 ml de liquide d'ascite correspondant au clone 1.1.4.4.1 sont injectés sur la colonne. Les fractions correspondant aux différents pics obtenus sont recueillies, rassemblées, concentrées par ultrafiltration sur membrane 10 000 et conservées en aliquotes de 1 ml à -20° C. Le profil d'élution du surnageant de culture et du liquide d'ascite du clone 1.1.4.4.1, représenté sur la figure 16 montre 5 pics :

- le pic pH 8,1 correspond aux protéines aspécifiques,
- le pic pH 5,5 correspond aux IgG1,
- le pic pH 4,5 correspond aux IgG2a,
- le pic pH 3,5 correspond ausIgG2b,
- le pic pH 3 correspond aux fragments restés fixés.

III - 5 Analyse par électrophorèse en gel d'acrylamide

Comme on peut le constater sur la figure 17, la séparation électrophorétique en SDS des fractions provenant des différentes étapes de purifications : gel filtration, FPLC et chromatographie d'affinité, montre après la dernière étape seulement deux bandes correspondant à la chaîne légère et à la chaîne lourde. Dans les fractions obtenues par gel filtration et FPLC nous trouvons encore des protéines contaminantes.

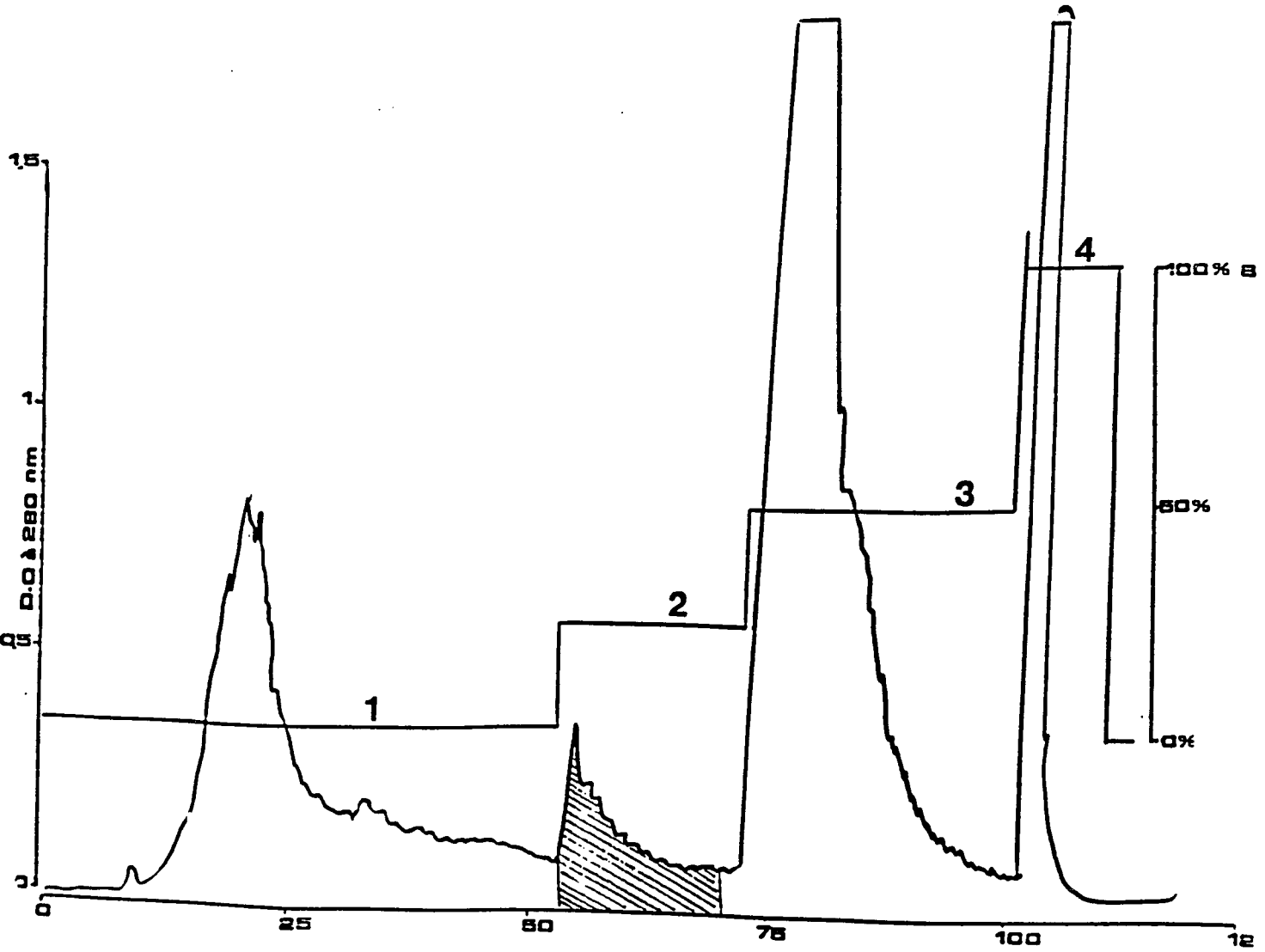


Figure 15 : Profil d'HPLC préparative d'une préparation enrichie en anticorps monoclonaux provenant du pic 1 de gel filtration.

Injection de 500 µl d'une solution à 10 mg/ml de protéines sur une colonne LKB 21,5 x 150 nm.

Phase mobile : solution A : Tris/HCl 10 mM pH 7

solution B : NaCl 0,5 M, Tris/HCl 10 mM.

Gradient par palier : 0 de NaCl pendant 53 min, 0,14 M de NaCl pendant 15 min, 0,3 M de NaCl pendant 20 min et 0,5 M de NaCl pendant 8 min.

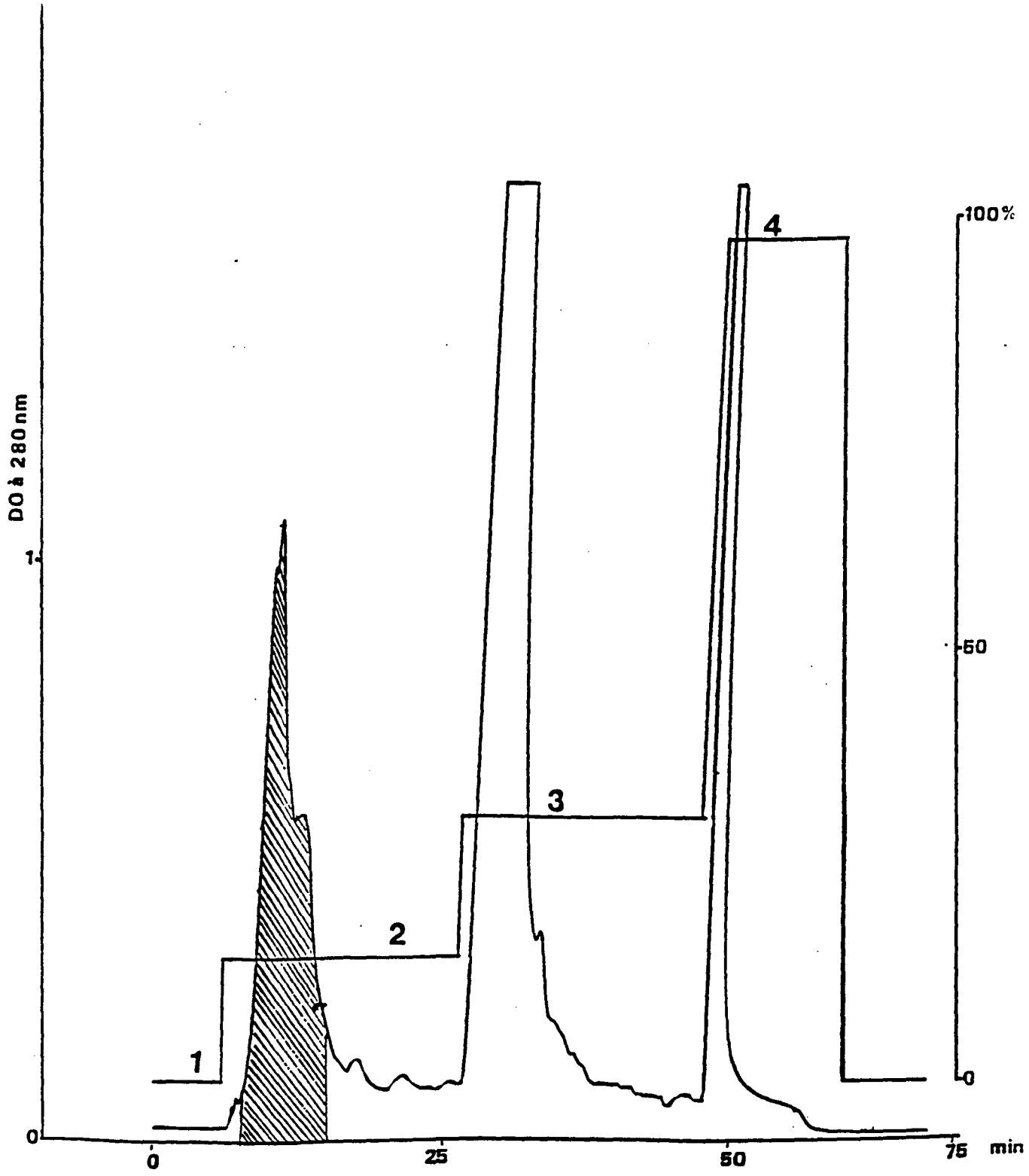


Figure 14 : Profil d'HPLC analytique d'une préparation enrichie d'anticorps monoclonaux provenant du pic 1 de gel filtration réalisée par palier en NaCl.

Injection de 500 µl sur une colonne LKB 21,5 x 150 mm.

Phase mobile : solution A = Tris/HCl 10 mM pH 7

solution B = NaCl 0,5 M, Tris/HCl 10 mM.

Gradient par palier : 0 de NaCl pendant 10 min, 0,14 M de NaCl pendant 15 min, 0,3 M de NaCl pendant 20 min et 0,5 M de NaCl en 8 min.

Détecteur UV : 280 nm.

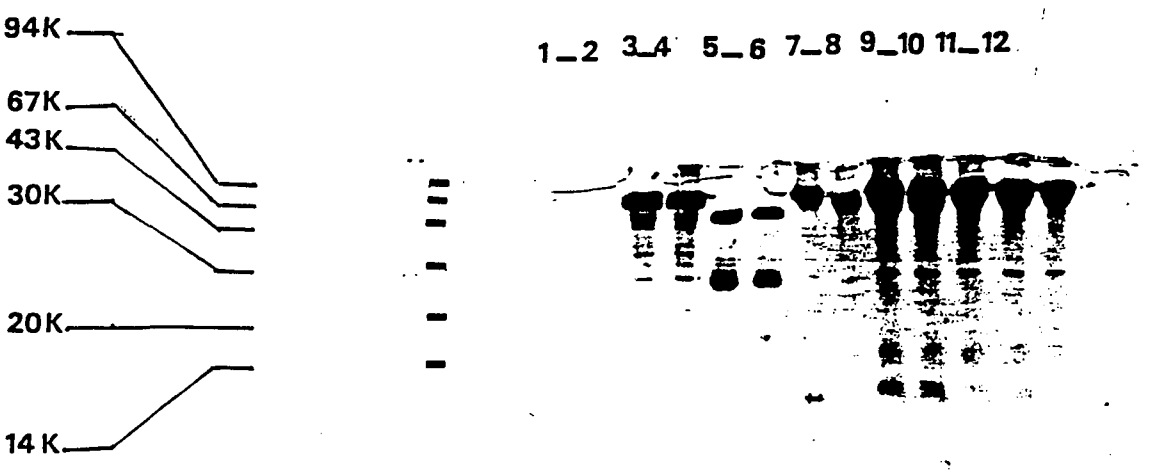


Figure 17 : Electrophorèse en PAGE-SDS (15 % d'acrylamide) des différents pics obtenus par différentes méthodes de purification.

Puits 1-2 : marqueurs de poids moléculaires
Puits 3-4 : milieu RPMI 1640 + 10 % de SVF
Puits 5-6 : pic 1 chromatographie d'affinité
Puits 7-8 : pic 3 HPLC préparative
Puits 9-10 : surnageant du milieu de culture avant purification
Puits 11-12 : pic 1 de gel filtration.

III - 6 Localisation des épitopes de l'hPL reconnus par les anticorps monoclonaux anti-hPL

Nous avons choisi l'anticorps provenant du clone 1.1.4.4.1 purifié par chromatographie d'affinité pour l'utiliser durant nos expériences, car il présente un meilleur degré de pureté, et la quantité obtenue est suffisamment importante pour effectuer toutes les expériences programmées.

Nous allons d'abord déterminer sa constante d'affinité avec l'hPL, ce qui nécessite le marquage de celle-ci en premier lieu.

III - 6.1 Marquage de l'hPL par l'iode 125

Nous avons marqué l'hPL avec l'iode 125 suivant la méthode de Greenwood et Hunter (1963). Le diagramme d'élution nous a permis d'établir la présence de deux pics de radioactivité (figure 18). Le test ELISA nous montre que le premier pic correspond à l'hormone marquée, et le second est de l'iodure en excès.

Le choix d'une faible quantité d'hormone permet une plus grande fixation d'iode par molécule (à priori),ce qui se traduit par un gain d'activité spécifique.

III - 6.2 Constante d'affinité de l'IgG1 (1.1.4.4.1 et 1.1.4.4.4)

Pour déterminer la constante d'affinité, nous avons d'abord cherché la dilution de travail (Tableau 13) qui permet de fixer 50 % de l'hPL marquée par l'anticorps.

Nous avons ensuite réalisé une compétition entre l'hPL non marquée et l'hPL marquée à l'iode 125 pour l'anticorps issu du clone 1.1.4.4.4 (Tableau 14) et l'anticorps issu du clone 1.1.4.4.1 (Figure 15). Les anticorps ont été utilisés à des dilutions de 10^{-4} et 10^{-5} respectivement.

Les courbes de compétition, obtenues avec les anticorps 1.1.4.4.1 et 1.1.4.4.4 sont comparables comme le montre les figures 19 et 20.

III - 6.3 Représentation de Scatchard

Dans le domaine où s'est établie la compétition, il est possible de procéder à une expression graphique des résultats selon la représentation de Scatchard.

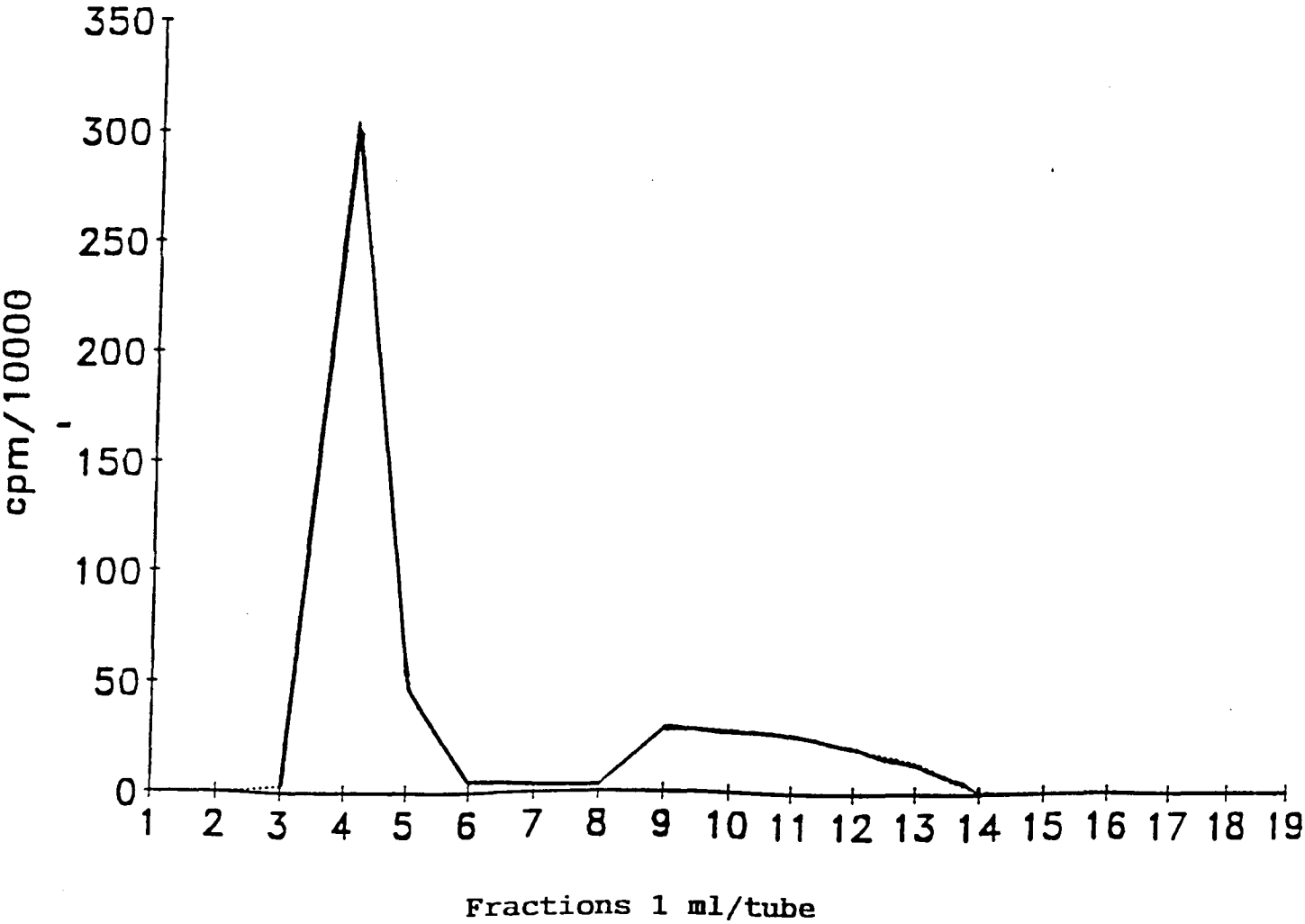


Figure 18 : Chromatographie sur G50 de 20 µg d'hPL marquée à l'iode 125.

Tampon phosphate de sodium 0,5 M pH 7,5 et 10 µl d'iodure de sodium marqué : activité spécifique = 629.10^3 Bq/µg, concentration = $3,6.10^9$ Bq/ml.

Dilution hPL	Anticorps 1.1.4.4.1		Anticorps 1.1.4.4.4	
	cpm/min	%	cpm/min	%
10^{-2}	2225	76	2184	82
10^{-3}	1961	73	2099	78
10^{-4}	1686	67	1609	59
10^{-5}	1413	52	1049	38
10^{-6}	851	30	602	21
10^{-7}	403	12	341	12

Tableau 13 : Détermination de la dilution de l'anticorps monoclonal purifié, permettant de fixer 50 % de l'hPL marquée.

Dilution 10^{-5} pour l'anticorps 1.1.4.4.1, 10^{-4} pour l'anticorps 1.1.4.4.4.

hPL froid ng	cpm/min	B/Bo	B/F
0,78	1346	52 %	117 %
1,56	1255	49 %	102 %
3,12	1240	48 %	98 %
6,25	1195	46 %	91 %
12,5	968	37 %	63 %
25	777	32 %	45 %
50	573	22 %	29 %
100	202	7,8 %	8,7 %

Tableau 14 : Compétition entre hPL marquée et hPL non marquée envers l'anticorps monoclonal 1.1.4.4.4 dilué à 10^{-4}. B_0 représente la fixation de radioactivité en absence de l'hPL non marquée.

hPL froide ng/ml	cpm/min	B/Bo	B/F
0,78	1061	41 %	111 %
1,56	1102	43 %	100 %
3,12	947	36 %	86 %
6,25	894	34 %	78 %
12,5	800	31 %	57 %
25	619	24 %	33 %
50	346	13 %	15 %
100	140	5 %	6 %

Tableau 15 : Compétition entre hPL marquée et hPL non marquée envers l'anticorps monoclonal 1.1.4.4.1 dilué à 10^{-5}. B_0 représente la fixation de radioactivité en absence de l'hPL non marquée.

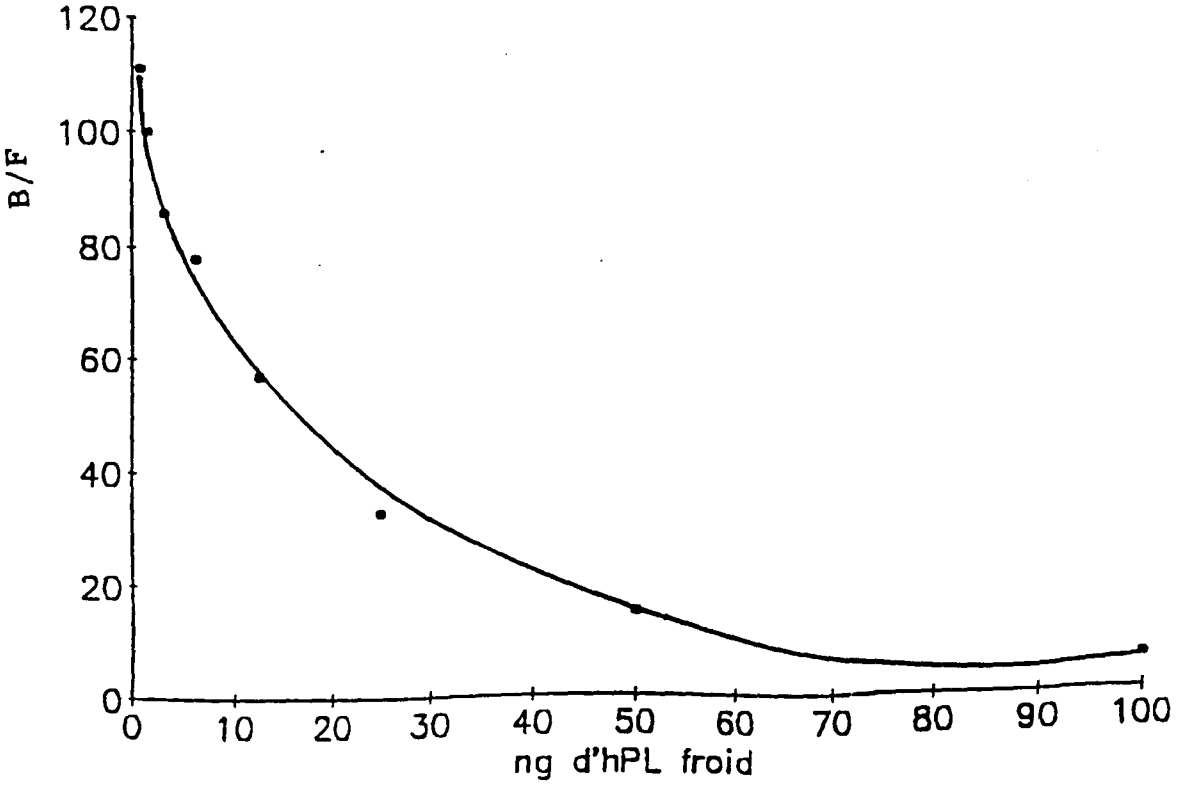


Figure 19 : Courbe de compétition entre hPL marquée et hPL non marquée pour l'anticorps du clone 1.1.4.4.4.

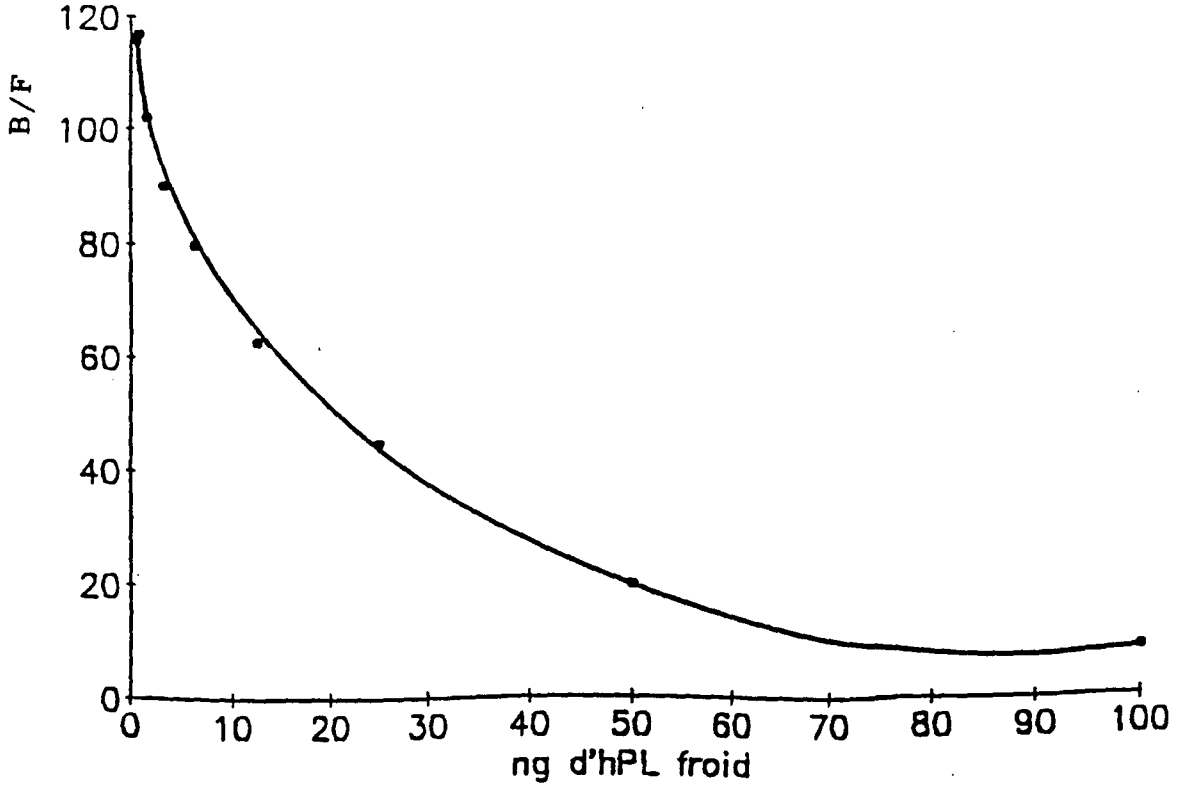


Figure 20 : Courbe de compétition entre hPL marquée et hPL non marquée pour l'anticorps du clone 1.1.4.4.1.

A cette fin, il nous faut connaître (en approximation) l'équivalent pondéral de l'antigène marqué utilisé. Une méthode grossière d'évaluation consiste à comparer la radioactivité utilisée (soit environ 7000 cpm) à celle que donnait le pool des tubes 3, 4 et 5 de la chromatographie sur G.50 et sensé contenir 20 ug d'hPL.

Il faut diluer 100 000 fois le contenu de ce pool pour obtenir la même activité que nous introduisons par puits de compétition. On peut dire que l'on utilise 0.02 ng de l'antigène chaud par puits. Soit une concentration de 0,2/0,05 = 4 ng/ml.

On calcule $B_t = R/1 + R (a_1 + a_2) =$, avec $R = B/F$ et a_1 et a_2 représentant les concentrations initiales d'antigènes chaud et froid (Tableau 16), et portant R en ordonnées et Bt en abscisse, nous obtenons une droite (Figure 21). Cette courbe est de la forme $Y = ax + b$.

La détermination de la pente de cette droite est la constante d'affinité. Or la pente est $a = (y_2 - y_1) / (x_2 - x_1) = R/B_t = K$.

La constante d'association de l'anticorps 1.14.4.1 est :

$K = 0,2/1,3.10^{-13} = 1,5 \times 10^{12}$ l/mole

La constante d'affinité de l'anticorps 1.1.4.4.4 est :

$K = 0,2/2,3.10^{-13} = 8,6 \times 10^{11}$ l/mole

III - 6.4 <u>Coupure et blocage des ponts disulfures</u>

Au niveau de cette expérience, nous essayons de mettre en évidence la nature de continuité ou discontinuité de l'épitope.

Il existe plusieurs procédés pour couper les ponts disulfures ; sulfitolyse ou réduction. Cependant, la réduction est le procédé le plus efficace quant à l'obtention d'une coupure complète et irréversible des ponts disulfures ; le milieu doit contenir un agent dénaturant tel que l'urée afin que la protéine soit dans une conformation permettant l'accessibilité des ponts disulfures à l'agent réducteur (Konisberg, 1972). L'agent réducteur utilisé est le dithiothréitol, la S-carboxyméthylation est obtenue par l'iodoacétamide.

Clone 1.1.4.4.1		Clone 1.1.4.4.4	
B/F	BT (ng liés/ml)	B/F	BT (ng liés/ml)
100	3,56	102	3,59
86	4,9	98	5,04
78	7,23	91	7,86
57	10,52	63	11,20
33	13,39	45	16,75
15	13,56	29	23,37

Tableau 16 : Résultats de la radioimmunocompétition entre hPL froide et marquée à l'iode 125 pour l'anticorps IgG1 issue du clone 1.1.4.4.1 et l'anticorps IgG1 issue du clone 1.1.4.4.4.

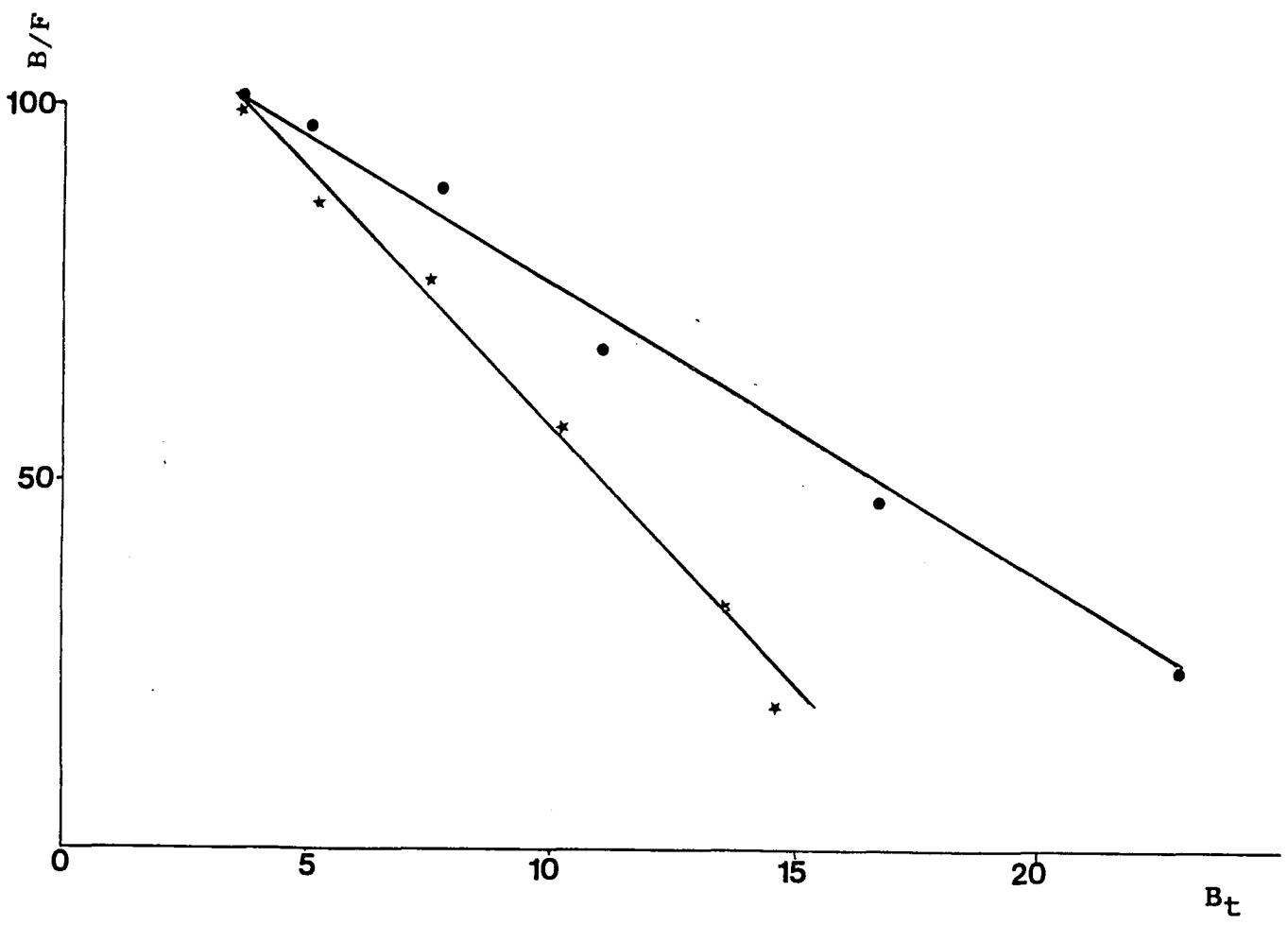


Figure 21 : Représentation selon Scatchard de la fixation de l'antigène sur l'anticorps monoclonal provenant du clone 1.1.4.4.1 (*) et 1.1.4.4.4 (●).

La figure 22 représente des courbes de réaction immunologique en fonction de la nature de l'hPL (native ou réduite par coupure des ponts disulfures suivie d'une S-carboxyméthylation).

Ces courbes révèlent qu'il n'y a aucune variation de la réaction antigénique entre l'hPL native et dénaturée, ceci permet de penser que l'épitope n'est pas lié étroitement à la structure tertiaire (présence des ponts disulfures) et qu'il s'agirait donc d'un déterminant antigénique de type continu. En effet, si on avait un déterminant antigénique discontinu, il n'y aurait pas de réponse pour l'hPL dénaturé.

III - 6.5 Séparation des fragments d'hPL obtenus après hydrolyse par bromure de cyanogène

Les points de coupure théorique par le bromure de cyanogène sont représentés dans la figure 23. En théorie, nous devons avoir 7 fragments dont deux sont reliées par un pont disulfure. Après avoir séparé les fragments par chromatographie HPLC, nous avons obtenus 8 pics, un chiffre qui dépasse le nombre théorique des fragments (Figure 24).

Le test ELISA réalisé sur les différents pics permet de distinguer 3 pics positifs (Figure 25) :

- un fragment le plus significativement antigénique, récolté au niveau du pic 4
- un fragment récolté au niveau du pic 5
- et le pic 6 qui est légèrement positif, ce qui veut dire qu'il contient une quantité non négligeable du fragment contenant le déterminant antigénique.

Nous avons procédé à une deuxième purification par HPLC phase reverse dans les mêmes conditions pour les pics qui s'avèrent très positifs (4 et 5), afin de séparer les fragments antigéniques de contaminants possibles.

Sur la figure 26, nous avons obtenus 4 pics à partir du pic n° 4. Seul le premier est positif. La figure 27 montre que ce pic redonne qu'un seul pic après une nouvelle chromatographie HPLC.

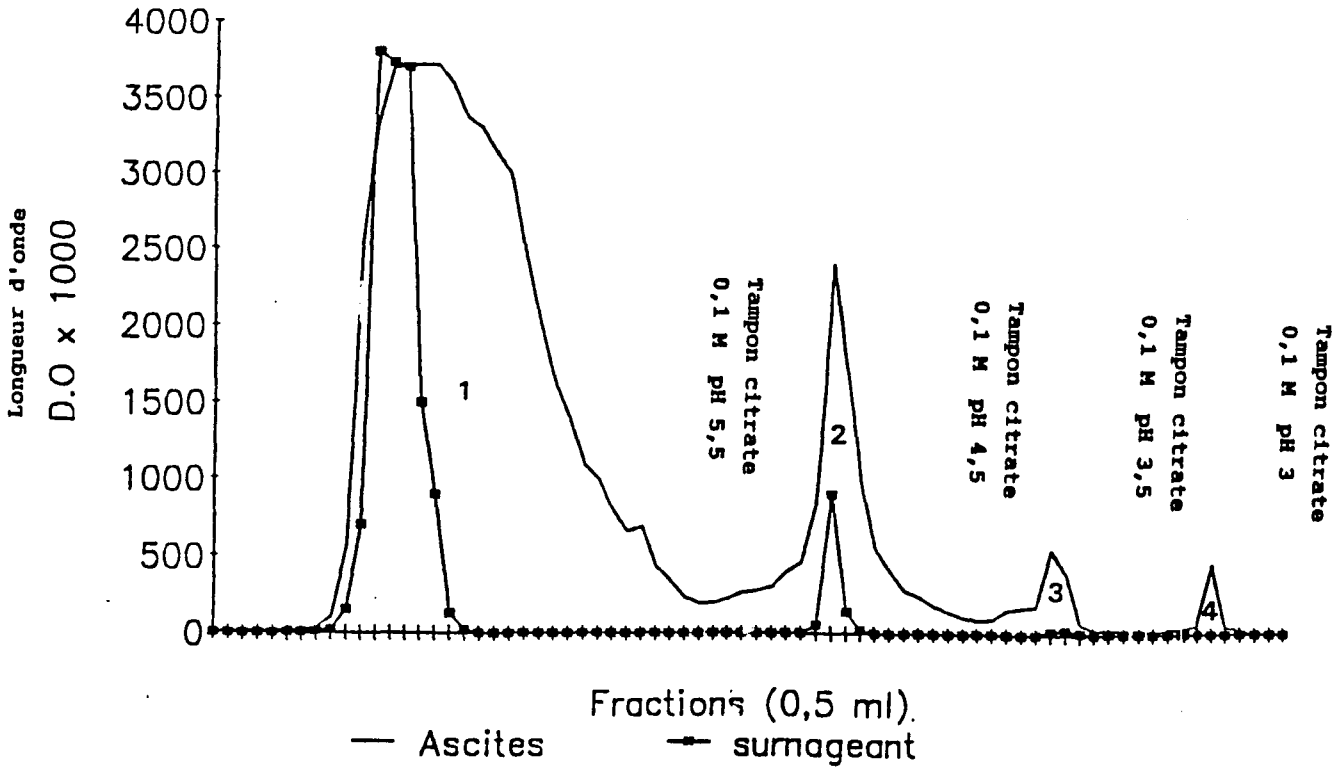


Figure 16 : Profil d'élution d'un liquide d'ascite de souris (—) et d'un surnageant de culture (▪—▪) contenant un anticorps monoclonal de classe IgG1, obtenu après chromatographie d'affinité sur protéine A-Sépharose CL-4B.

Le tampon initial est à pH 8,1.

THESE Hafid MAAZOUZI

La page 101

est manquante dans l'original.

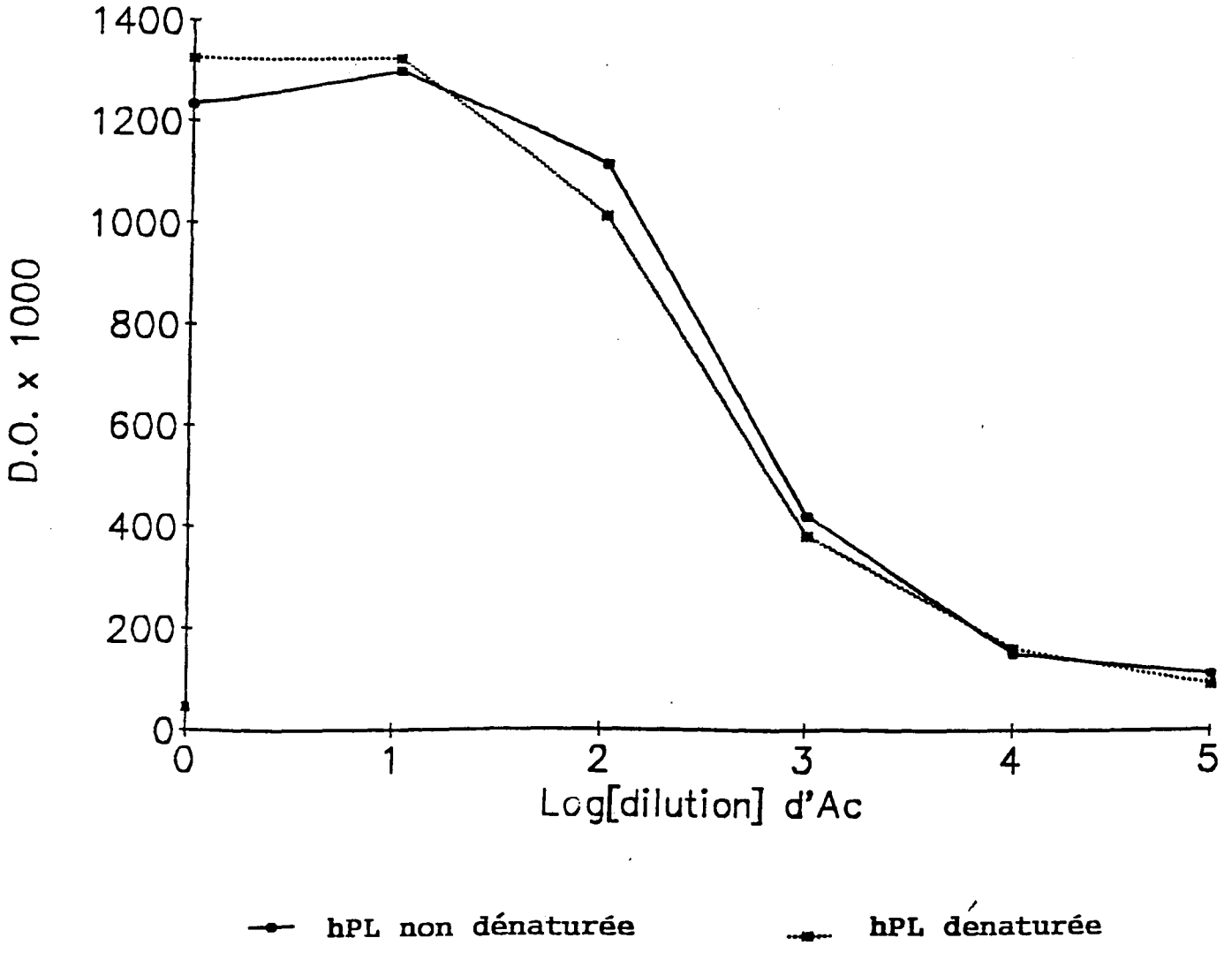


Figure 22 : Test ELISA avec hPL native et hPL sans ponts disulfures, en utilisant l'anticorps provenant du clone 1.1.4.4.1.

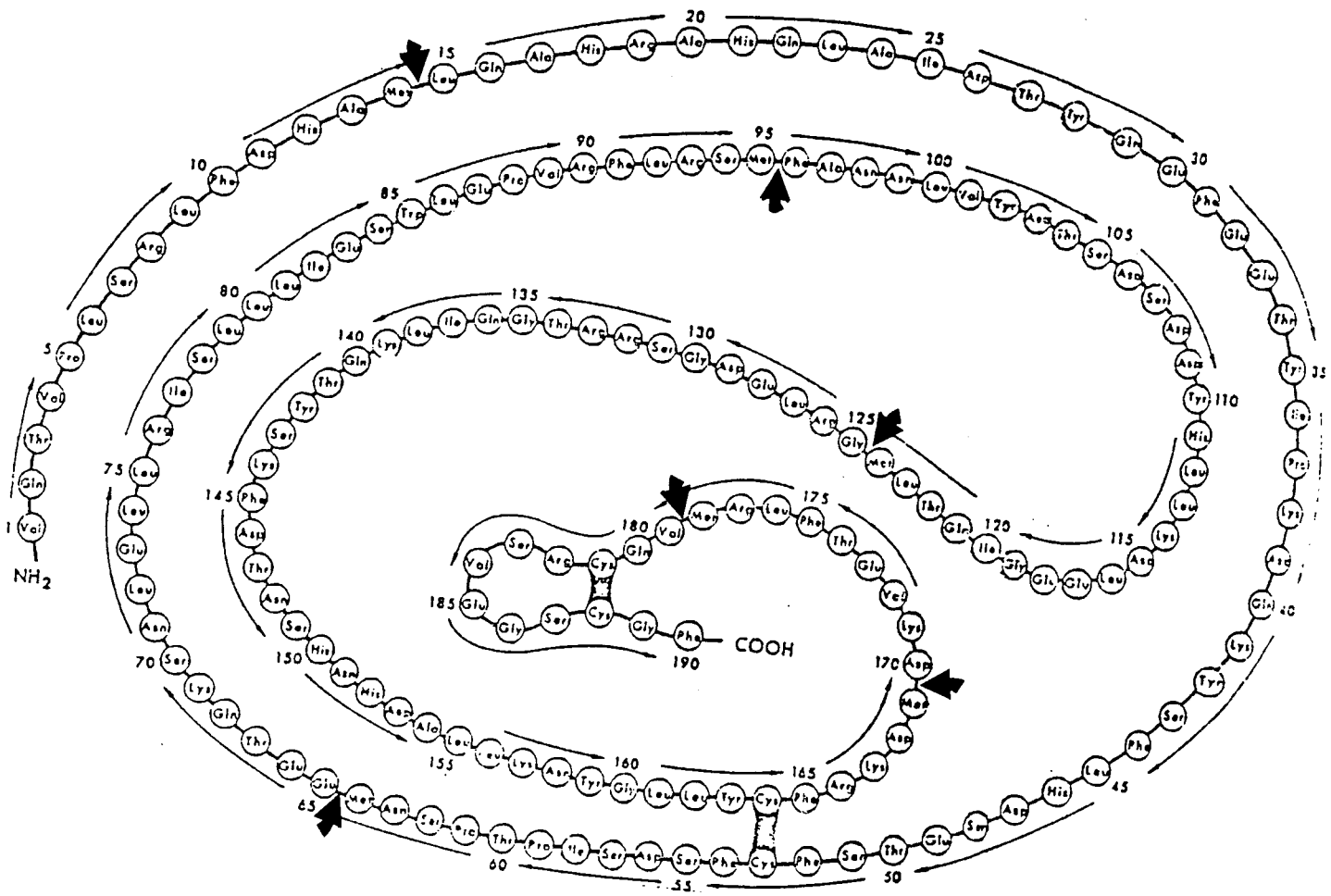


Figure 23 : Coupure théorique de l'hPL par bromure de cyanogène (➡) qui coupe au niveau des extrêmités carboxyle des résidus méthionine.

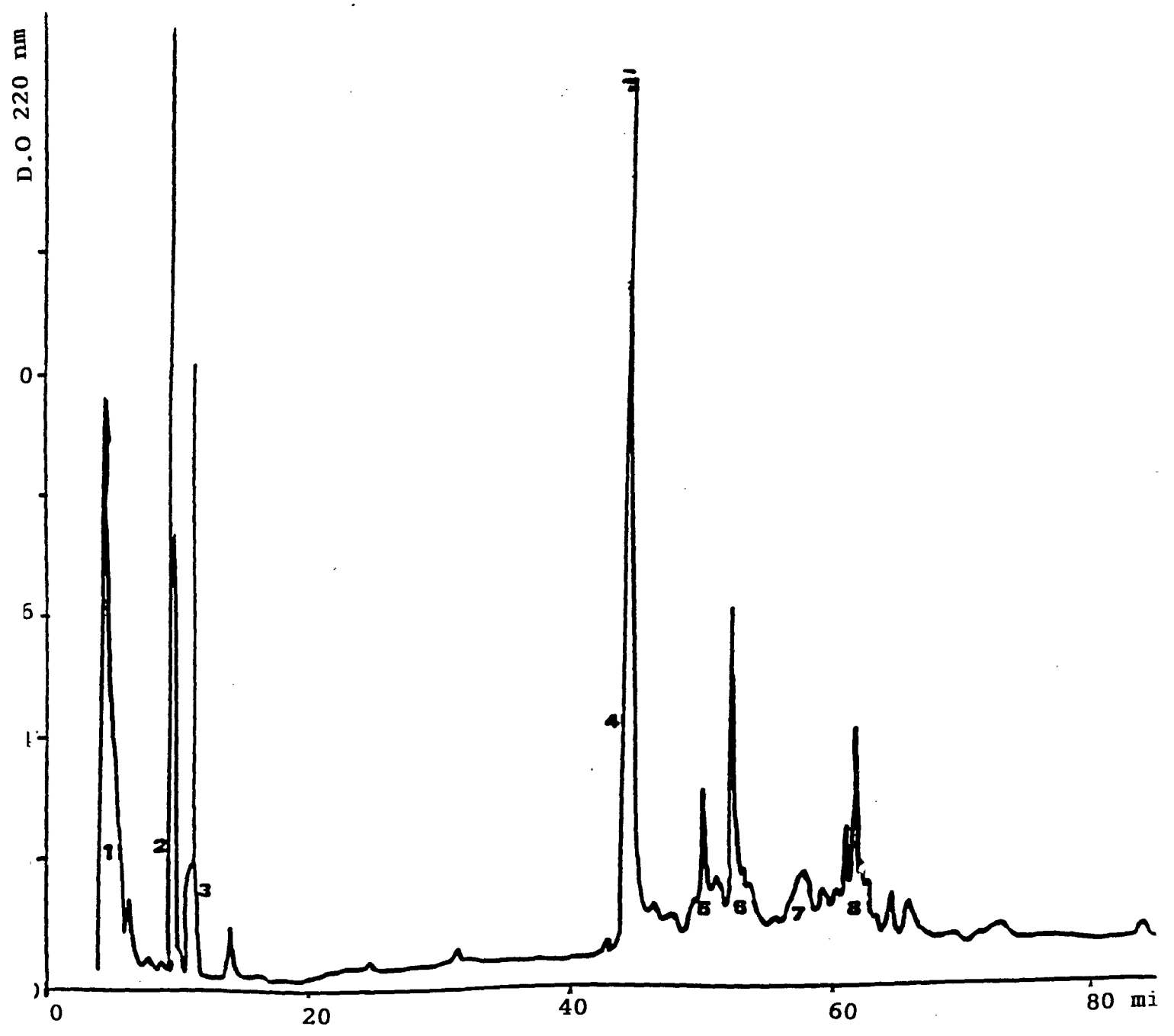


Figure 24 : Séparations par HPLC phase reverse des peptides obtenus par coupure avec le bromure de cyanogène.

Tampon d'élution : 0,1 % de TFA, 95 % de CH_3CN.

Colonne B4 butyl aquapor (Merck), 4,6 x 250 mm.

Détection : 220 nm.

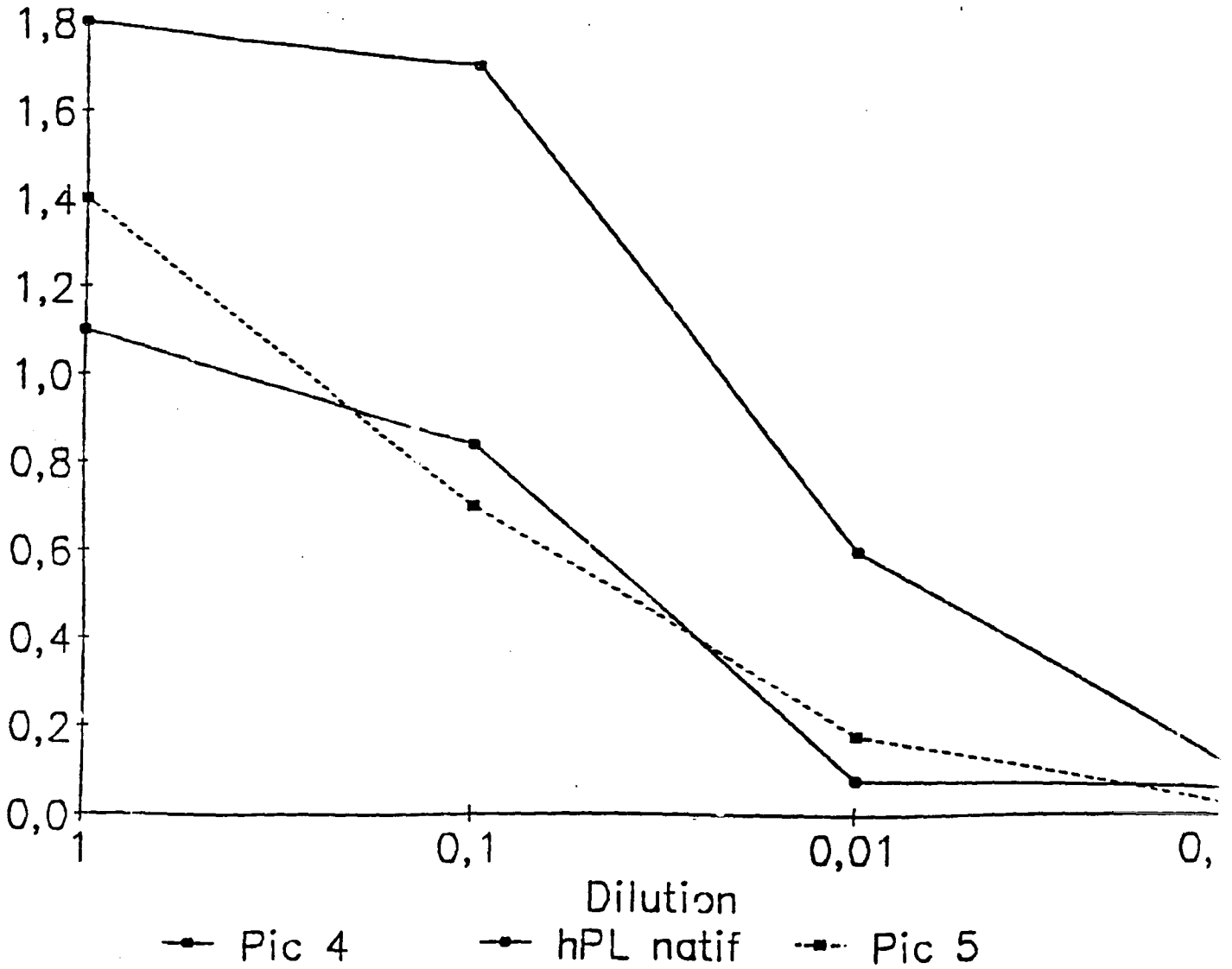


Figure 25 : Test ELISA avec hPL native et les différents fragments obtenus par digestion chimique au bromure de cyanogène contenus dans le pic 4 et le pic 5.

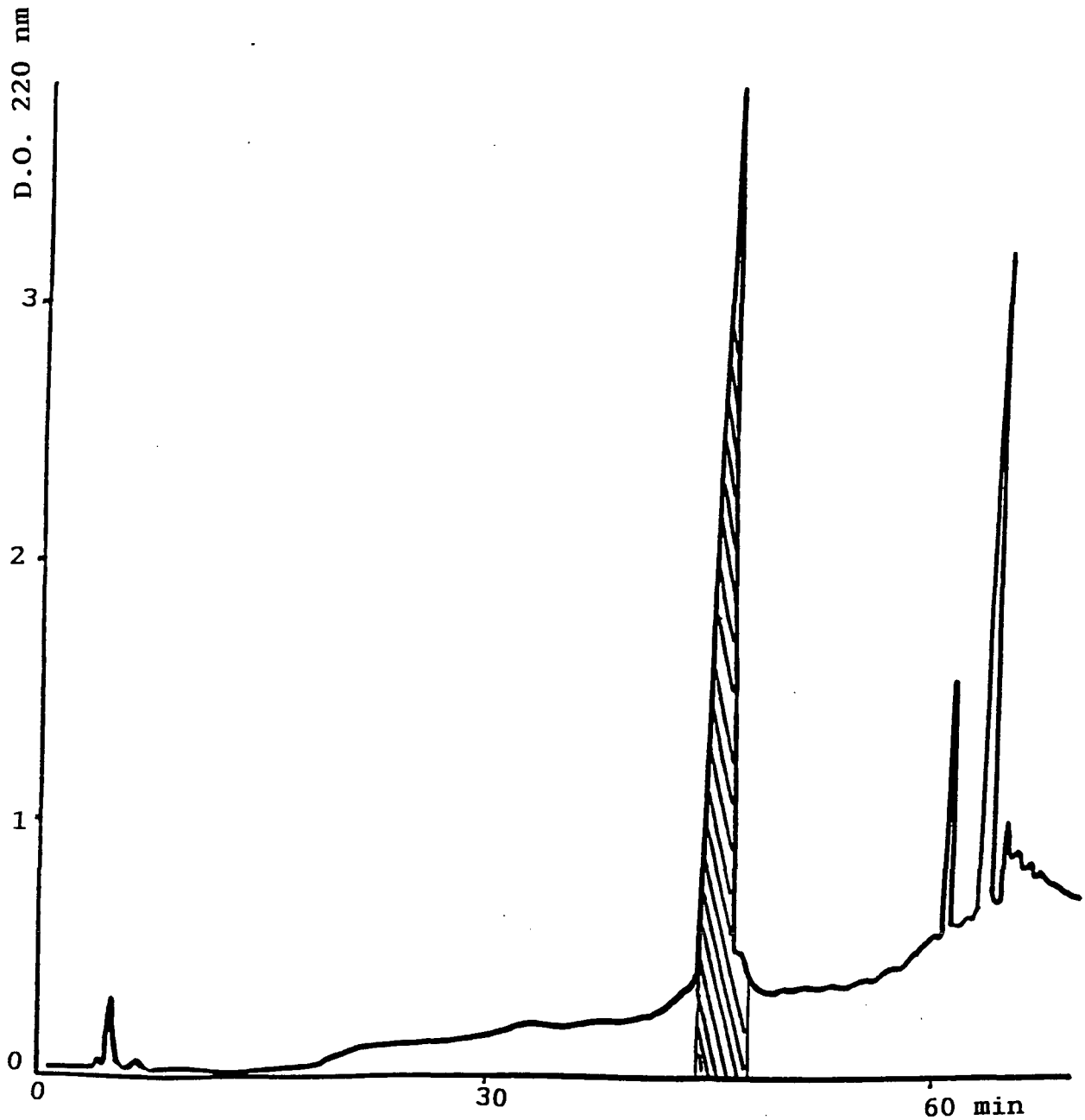


Figure 26 : Séparation des peptides contenus dans le pic 4 par HPLC reverse.
Tampon d'élution : 0,1 % de TFA, 95 % de CH_3CN.
Colonne B4 butyl aquapor (Meck), 4,6 x 250 mm.
Détection : 220 nm.

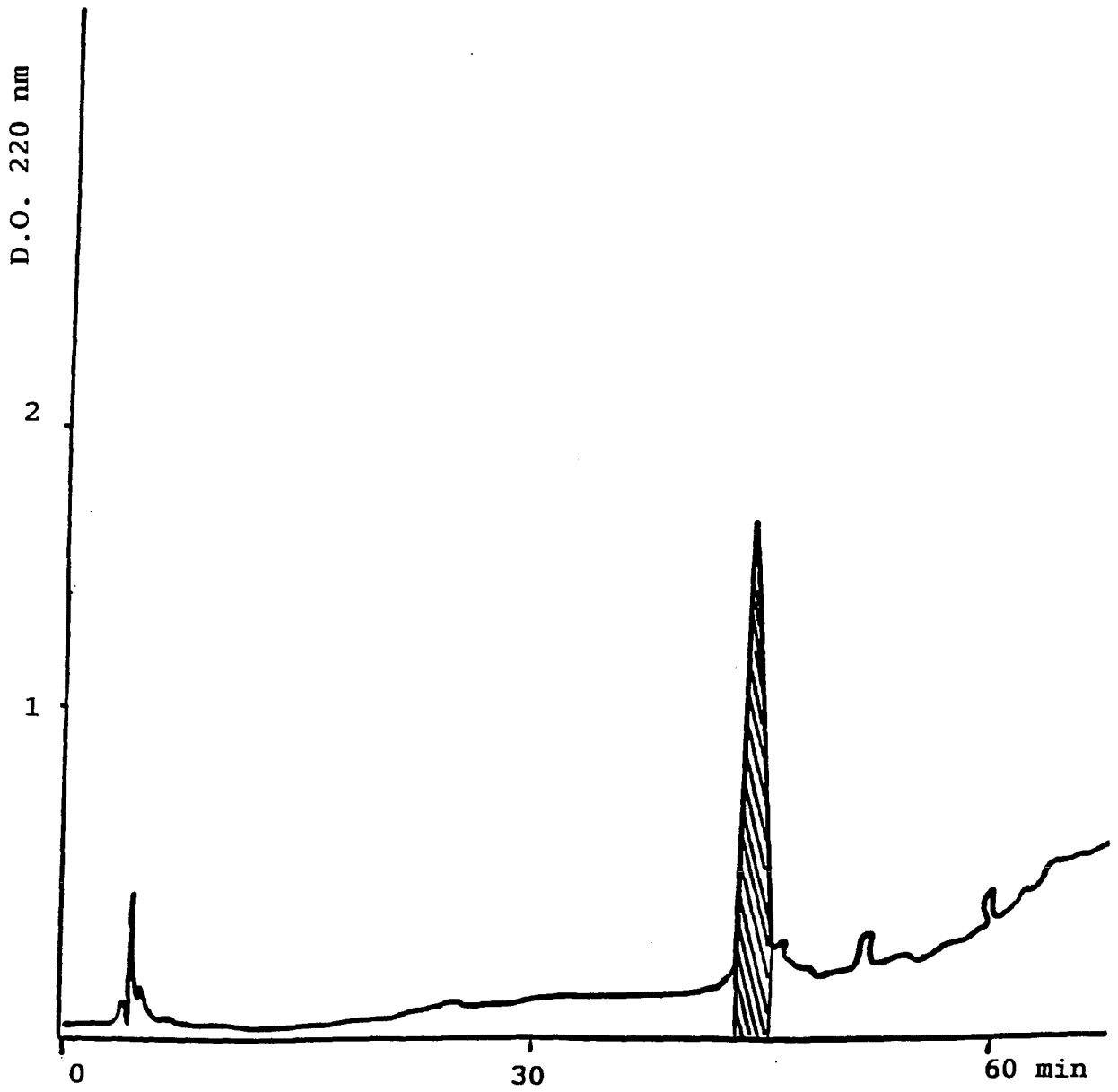


Figure 27 : Séparation des peptides contenus dans le pic 5 par HPLC reverse.
Tampon d'élution : 0,1 % de TFA, 95 % de CH_3CN.
Colonne B4 butyl aquapor (Merck), 4,6 x 250 mm.
Détection : 220 nm.

Cycles	Acides aminés	Quantités (pmoles)	Acides aminés	Quantité (pmoles)
1	Gly	239,9	Leu	262,1
2	Arg	49,1	Gln	188,6
3	Leu	150,4	Ala	164,7
4	Glu	123,6	His	50,5
5	Asp	101,4	Arg	65,0
6	Gly	91,3	Ala	126,8
7	Ser	16,6	His	52,1
8	Arg	60,0	Gln	135,5
9	Arg	18,9	Leu	9,8
10	Thr	16,0	Ala	111,6
11	Gly	65,0	Ile	98,5
12	Gln	64,0	Asp	77,2
13	Ile	59,1	Thr	18,5
14	Leu	63,4	Tyr	82,9
15	Lys	44,9	Gln	71,7
16	Gln	?	Glu	48,0
17	Thr	7,4	Phe	57,2
18	Tyr	46,5	Glu	26,9
19	Ser	4,7	Glu	?
20	Lys	18,0	Thr	6,0
21	Phe	23,2	Tyr	27,4
22	Asp	18,9	Ile	24,0
23	Thr	2,1	Pro	15,4
24	Asn	6,8	Lys	6,8
25	Ser	1,2	Asp	8,5
26	His	3,9	Gln	13,8
27	Asn	5,7	Lys	3,2
28	His	2,3	Tyr	12,4
29	Asp	1,3	Ser	0,5
30	Ala	6,7	Phe	9,7
31	-	-	Leu	9,6
32	Leu	3,5	His	2,6
33	Lys	1,7	Asp	3,5
34	Asn	5,0	Ser	0,6
35	Tyr	4,7	Gln	2,8

Tableau 17 : Résultats du séquençage des peptides provenants du pic 4 (Denoroy CNRS Lyon).

Cycle	AA	Quantité	AA	Quantité	AA	Quantité
1	-	-	-	-	-	-
2	Arg	2,8	Ala	?	Gln	15,6
3	Leu	4,9	Asn	8,5	Thr	2,1
4	Glu	6,3	Asn	?	Val	6,4
5	Asp	3,7	Leu	1,8	Pro	4,3
6	Gly	3,5	Val	4,6	Leu	?
7	Ser	1,5	Tyr	4,2	?	?
8	Arg	2,0	Asp	1,8	?	?
9	Thr	1,4	?	?	?	?
10	?	?	Ser	?	Phe	2,2
11	Gly	1,4	Asp	1,2	?	?
12	Gln	2,0	?	?	?	?
13	Ile	1,6	?	?	Ala	1,2
14	Leu	?	?	?	Met	?
15	Lys	?	Tyr	?	?	?

Tableau 18 : Résultats de séquençage des peptides provenants du pic 5 (Denoroy CNRS Lyon).

III - 66 Séquençage de la fraction positive

Les deux fractions positives ont été séquencées. Le tableau 17 montre les acides aminés en pmoles, libérés à chaque cycle depuis l'extrêmité N-terminale jusqu'à l'extrêmité C-terminale des fragments contenus dans le pic n° 4. Nous constatons qu'à chaque cycle, deux acides aminés sont libérés, ce qui signifie que nous sommes en présence de deux fragments au lieu d'un seul. Ces deux fragments correspondent à la séquence d'hPL 15-65 et 125-169 relié par un point disulfure. Le tableau 18 donne le séquençage des fragments contenus dans le pic n° 5, ce pic contient 3 fragments qui correspondent à la séquence 1-14, 97-124 et 125-169.

Le seul fragment qu'on trouve simultanément dans le pic 4 et dans le pic 5 est la séquence 125-169 (Figure 28). Ce fragment contient donc le déterminant antigénique qui réagit avec l'anticorps que nous avons fabriqué et purifié.

III - 7 Relation hPL-AMPc

III - 7.1 Mise en évidence de l'action de l'AMPc sur la réaction antigène-anticorps de l'hPL

L'AMPc modifie le comportement de l'hPL vis-à-vis des anticorps anti-hPL. Cet effet a été vérifié par établissement d'une courbe hPL-anti-hPL sans surcharge et avec surcharge de 20 pmoles d'AMPc par tube ; les résultats obtenus avec les anticorps polyclonaux de lapin (Figure 29), laissent à penser qu'il peut exister une liaison hPL-AMPc qui augmente l'affinité de l'hPL pour son anticorps (la courbe est déplacée vers la gauche).

L'utilisation des anticorps monoclonaux anti-hPL obetnus dans notre laboratoire, confirme que la présence d'AMPc modifie la réaction hPL-anti-hPL. Les résultats obtenus en RIA (Figure 30) et test ELISA (Figure 31) montre que l'AMPc déplace, d'une façon significative, la courbe standard d'hPL vers la gauche.

Dans les mêmes conditions, nous avons vérifié l'effet d'autres nucléotides GTP (Figure 32) et ATP (Figure 33), les résultats obtenus montrent que la présence de ces nucléotides ne modifient pas les propriétés immunologiques de l'hPL vis-à-vis de son anticorps.

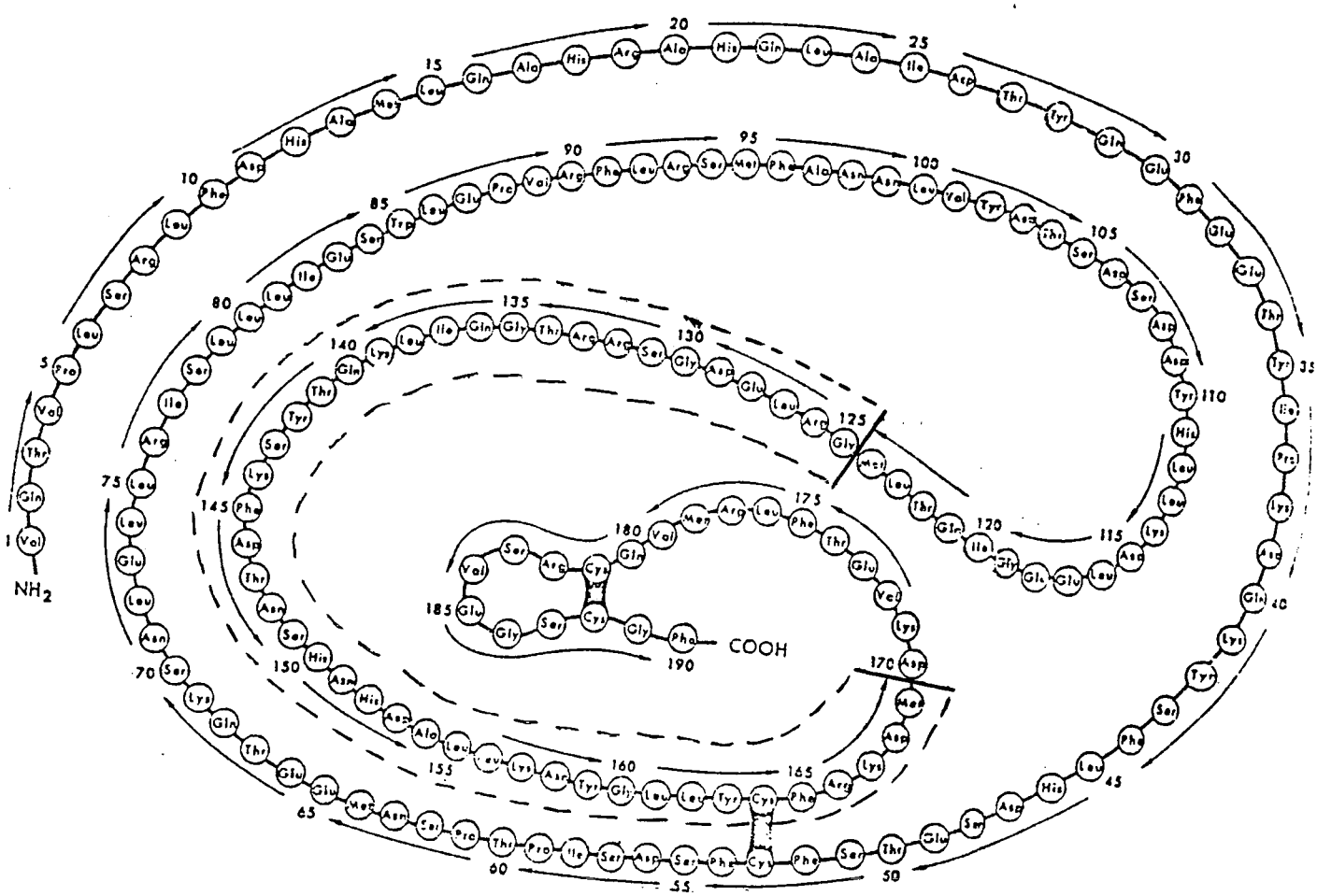


Figure 28 : Région d'hPL contenant l'épitope qui a réagit avec l'anticorps monoclonal purifié.

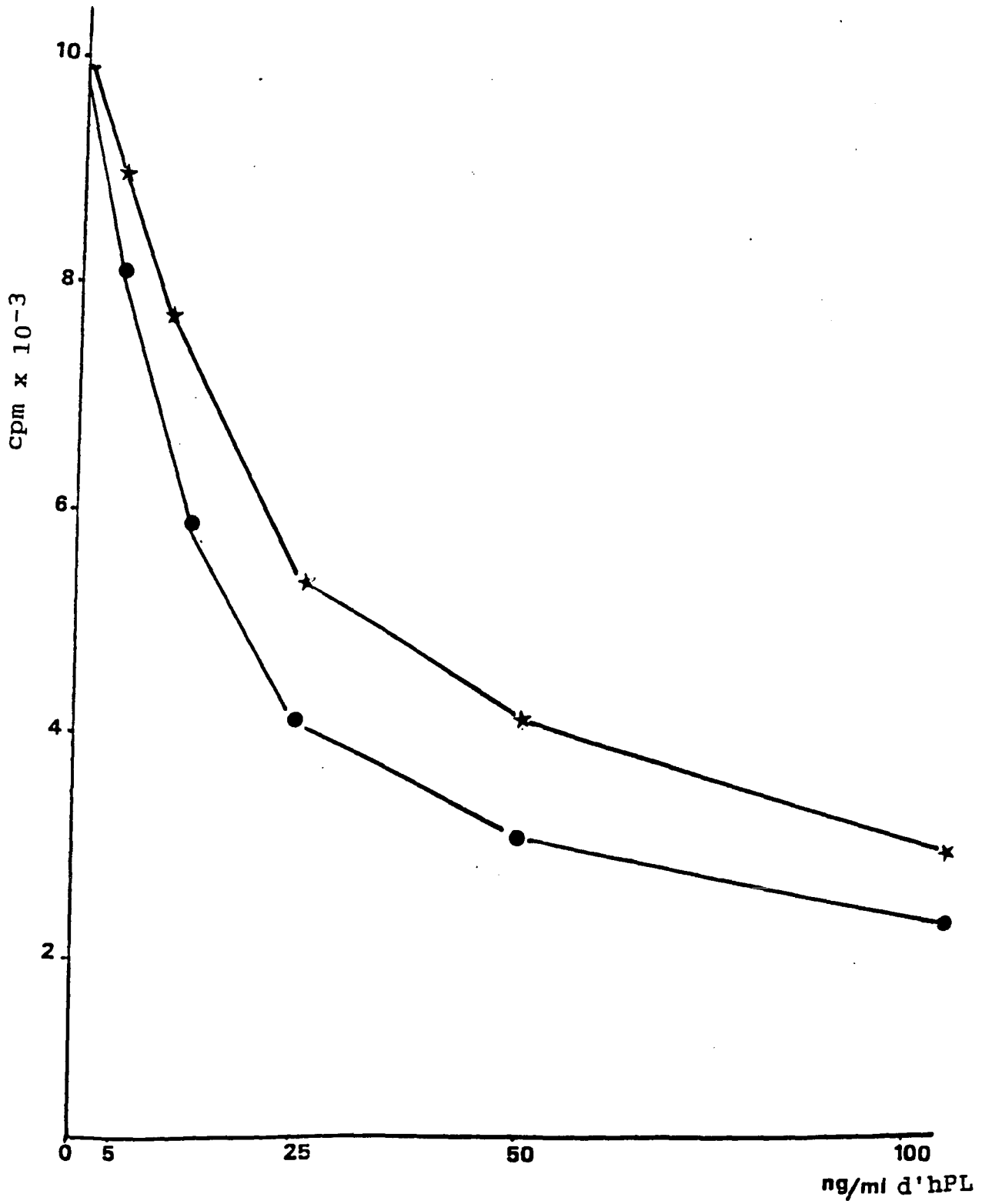


Figure 29 : Courbe de compétition réalisé par RIA entre hPL marqué par l'iode 125 et hPL froid (non marqué), vis-à-vis de leur anticorps polyclonal, en présence ●----● ou non de 20 pmoles d'AMPc ✶----✶ .

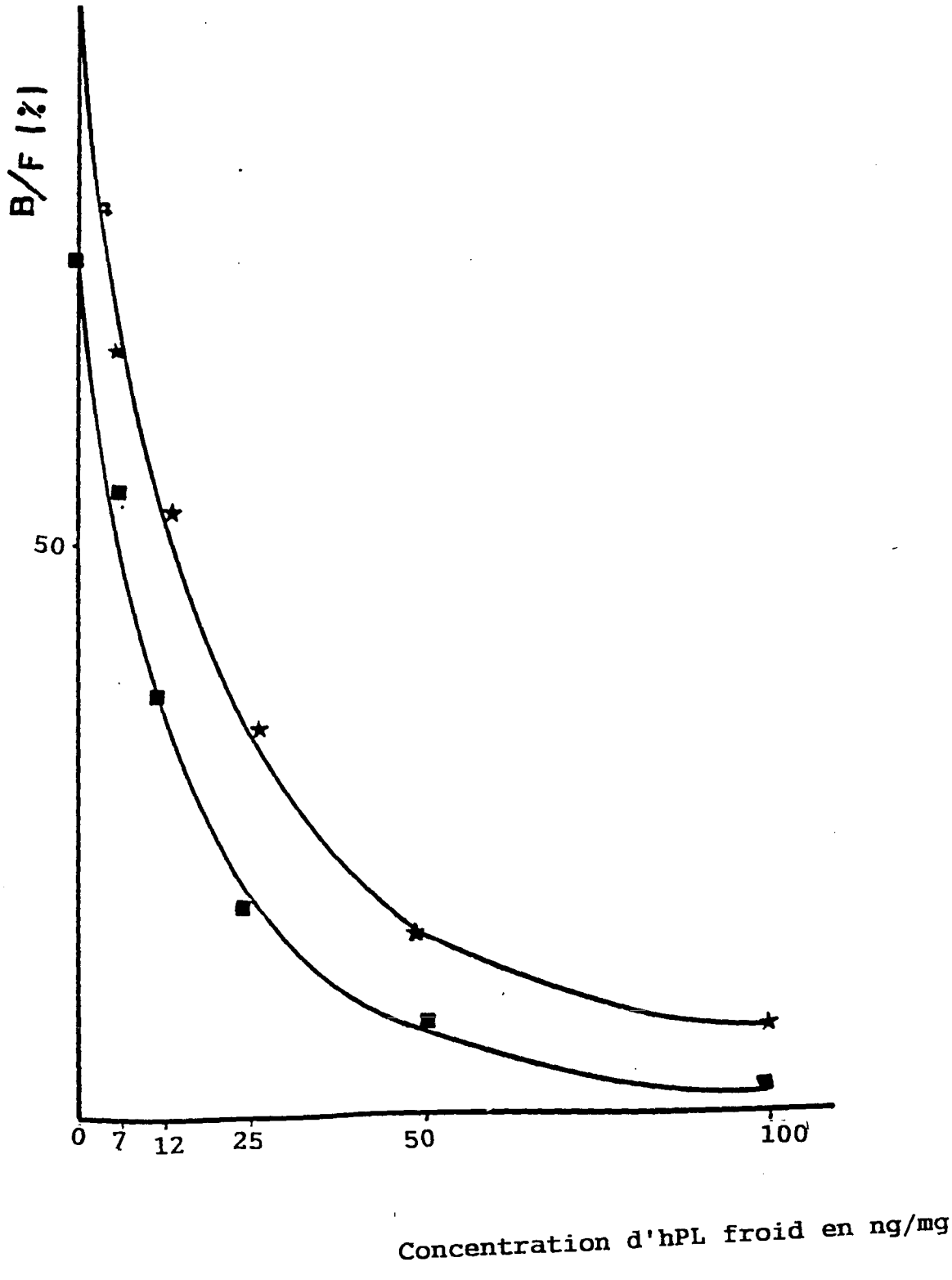


Figure 30 : Courbe de compétition réalisée par RIA entre hPL marqué par l'iode 125 et hPL froid (non marqué), vis-à-vis de leur anticorps monoclonal, en présence ■—■ ou non de 20 pmoles d'AMPc ✶—✶

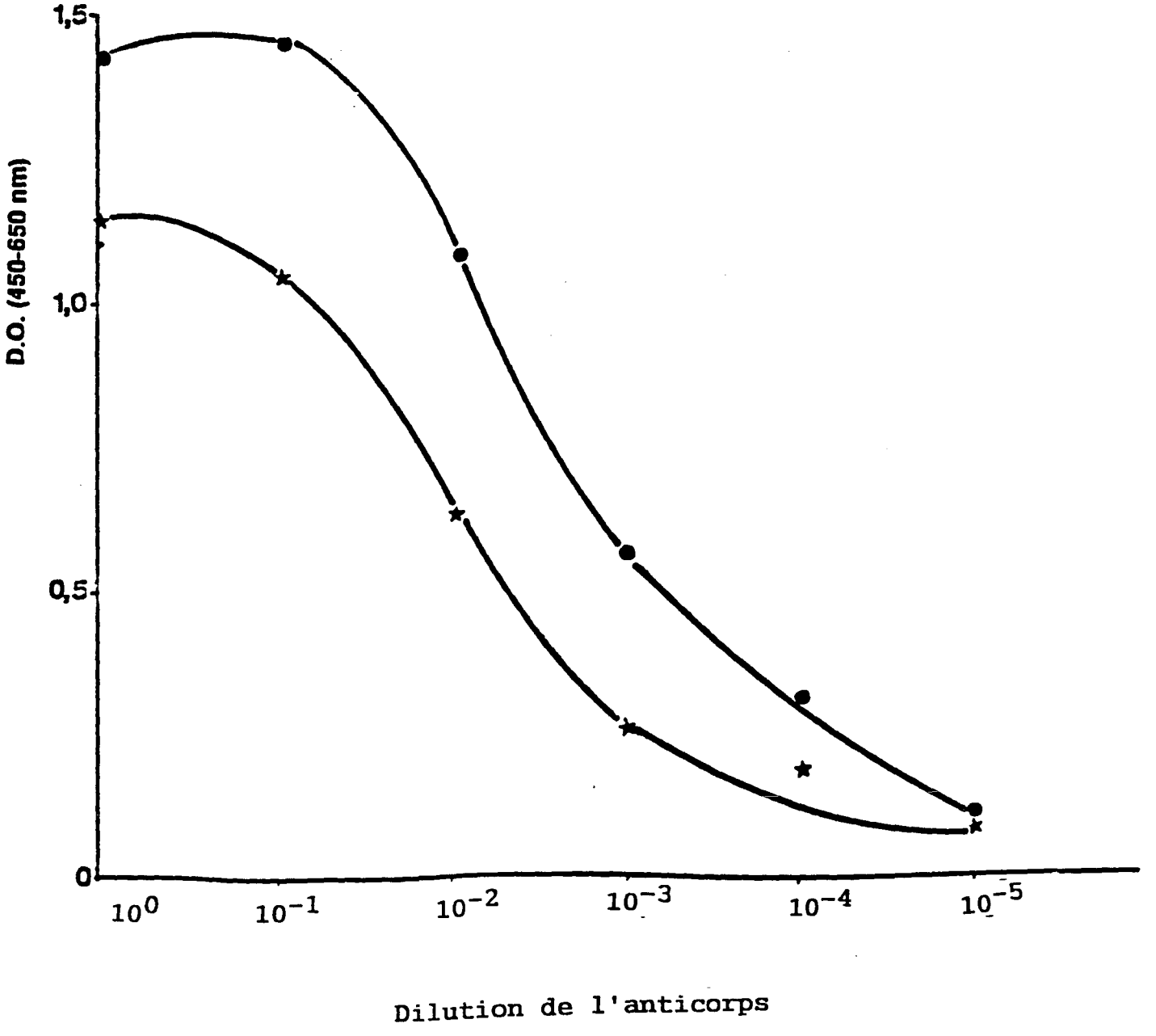


Figure 31 : Mesure par test ELISA de la réaction hPL-anti-hPL monoclonal en présence ●—● et en absence ✶—✶ de 20 pmoles d'AMPc.

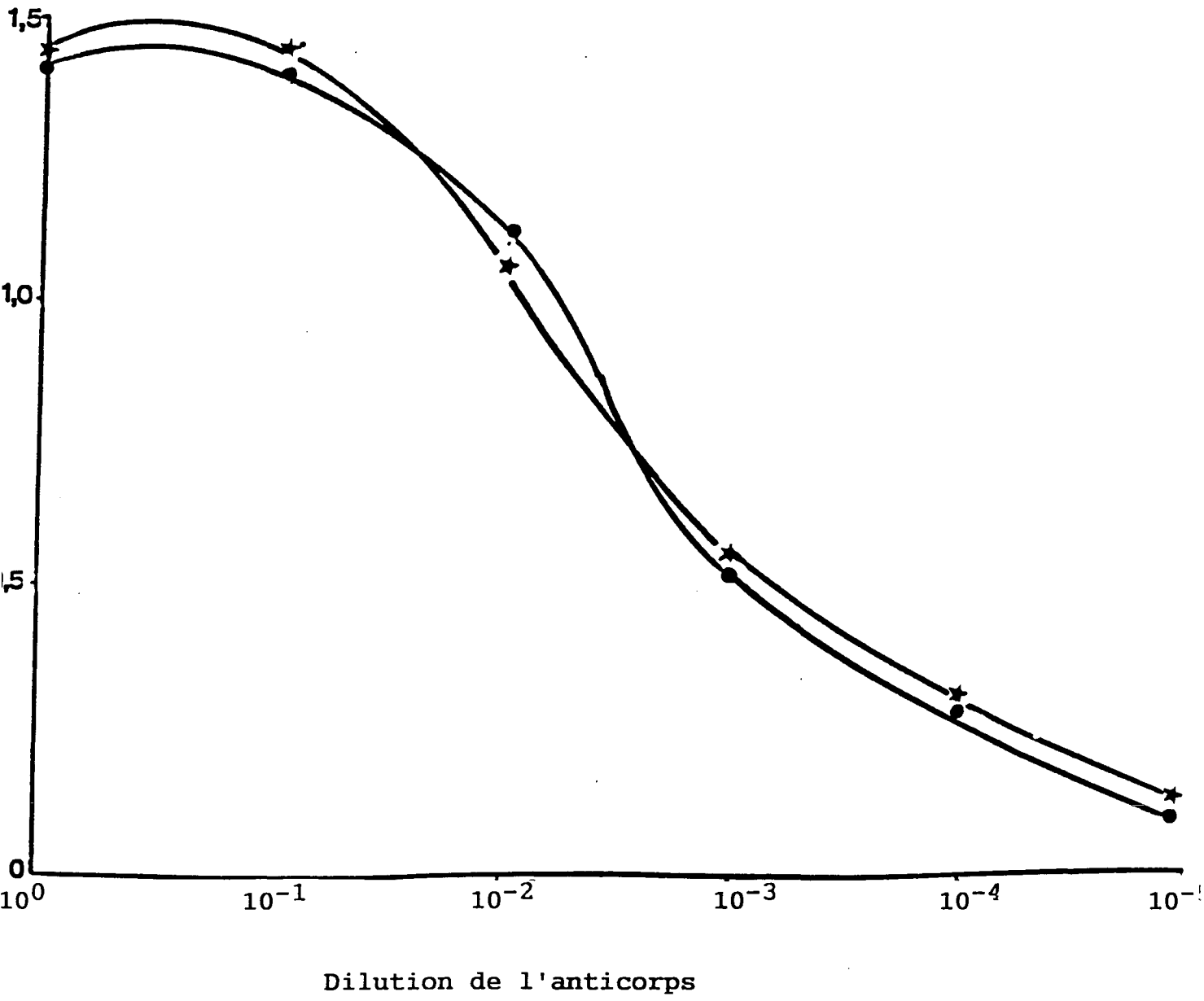


Figure 32 : Mesure par test ELISA de la réaction hPL-anti-hPL monoclonal en présence ✶—✶ et en absence ●—● de 20 pmoles de GTP.

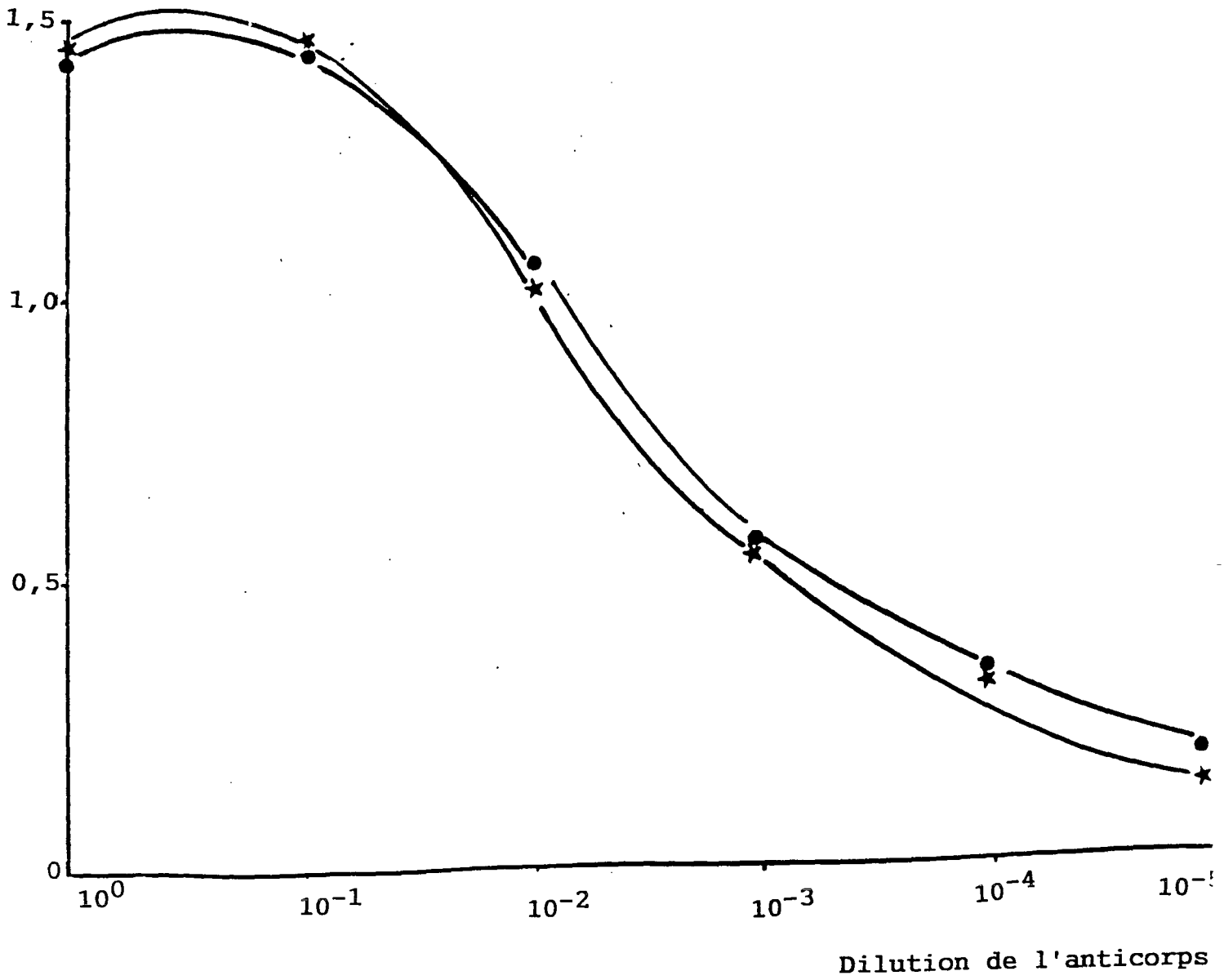


Figure 33 : Mesure par test ELISA de la réaction hPL-anti-hPL monoclonal en présence ✶—✶ et en absence ●—● de 20 pmoles d'ATP.

Comme l'ATP et GTP ne sont pas des nucléotides cycliques, nous avons utilisé dans les mêmes conditions un autre nucléotide cyclique : le GMPc. Le résultat obtenu (Figure 34) montre aussi qu'il n'a aucune action sur la réaction hPL-anti-hPL.

Afin de montrer que l'effet de l'AMPc est spécifique pour l'hPL, nous avons effectué le même test sur d'autres hormones, essentiellement hypophysaires telles que : la prolactine (Figure 35), luteinising hormone (LH) (Figure 36) et l'hormone de croissance (hGH) (Figure 37). Le résultat obtenu montre que la présence d'AMPc n'affecte pas la réaction antigène-anticorps de ces trois hormones.

III - 7.2 Dialyse à l'équilibre

Pour mettre en évidence d'une façon directe l'éventuelle fixation de l'AMPc sur l'hPL, nous avons utilisé la dialyse à l'équilibre. Cette technique consiste à mettre dans deux compartiments A et B séparés par une membrane semi-sélective à seuil de coupure 1000 daltons, un mélange d'AMPc froid et d'AMPc marqué à l'iode 125 (x, y pmoles/ml respectivement) (Figure 38).

Dans le compartiment A, il est mis des concentrations croissantes d'hPL. En posant l'hypothèse que l'AMPc se fixe sur l'hPL, à l'équilibre il y aurait passage d'AMPc libre du compartiment B vers A, afin de compenser la diminution de la concentration provoquée par la fixation d'AMPc sur l'hormone, et l'équilibre pour les molécules d'AMPc libre, va se rétablir entre les deux compartiments.

Nous avons effectué l'expérience avec plusieurs concentrations d'hPL : 50, 25, 12,5 et 0 pmoles/ml d'hPL (Tableau 19).

Le résultat obtenu (Figure 39) montre que plus la concentration d'hPL est élevée dans le compartiment B, plus la différence des cpm entre le compartiment qui contient l'hPL et celui qui n'en contient pas, est élevée. Ceci aussi est valable lorsqu'on augmente la concentration de l'AMPc pour une même concentration d'hPL (Figure 40).

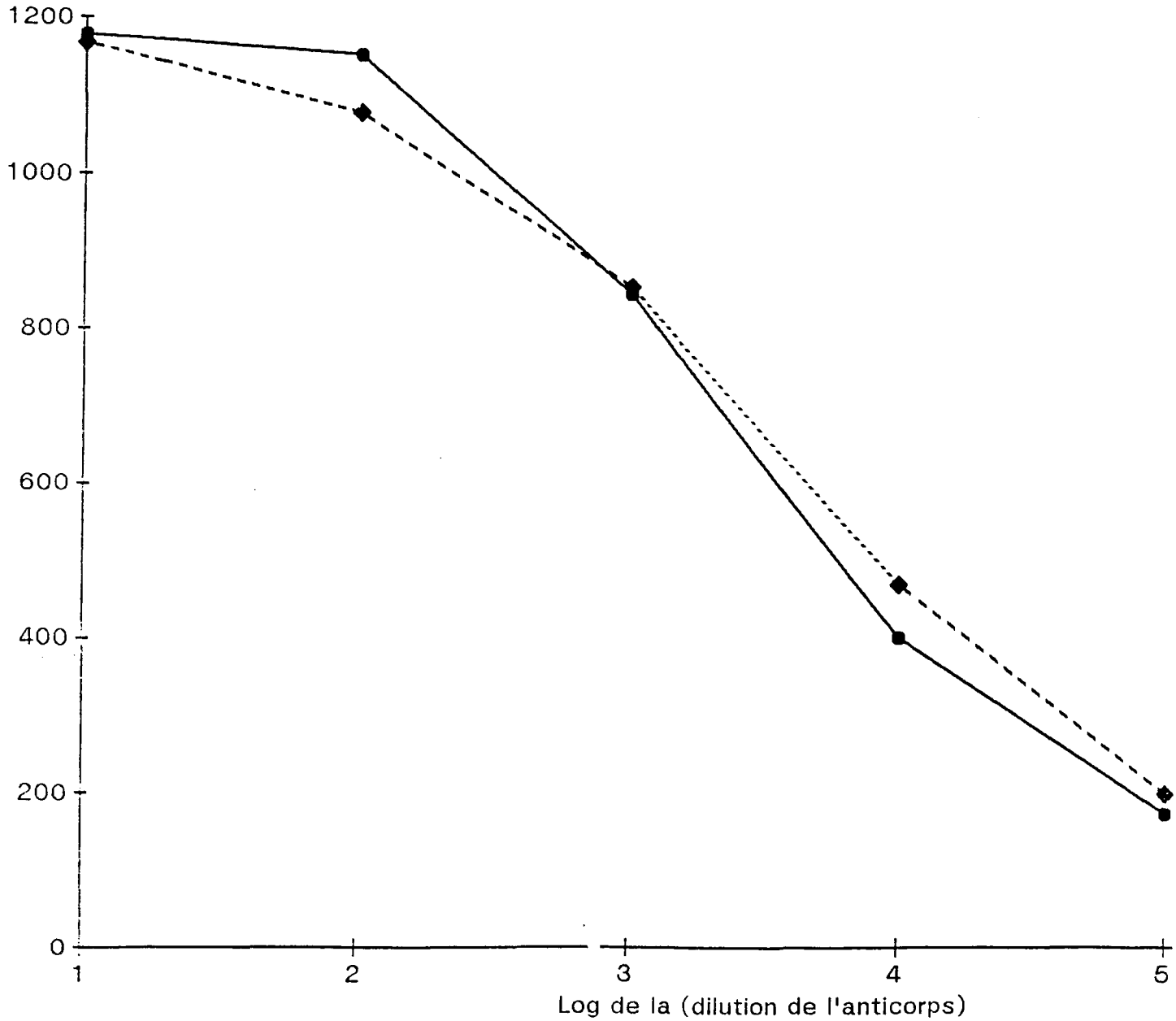


Figure 34 : Mesure par test ELISA de la réaction hPL-anti-hPL monoclonal en présence ●- et en absence -◆- de 20 pmoles de GMPc.

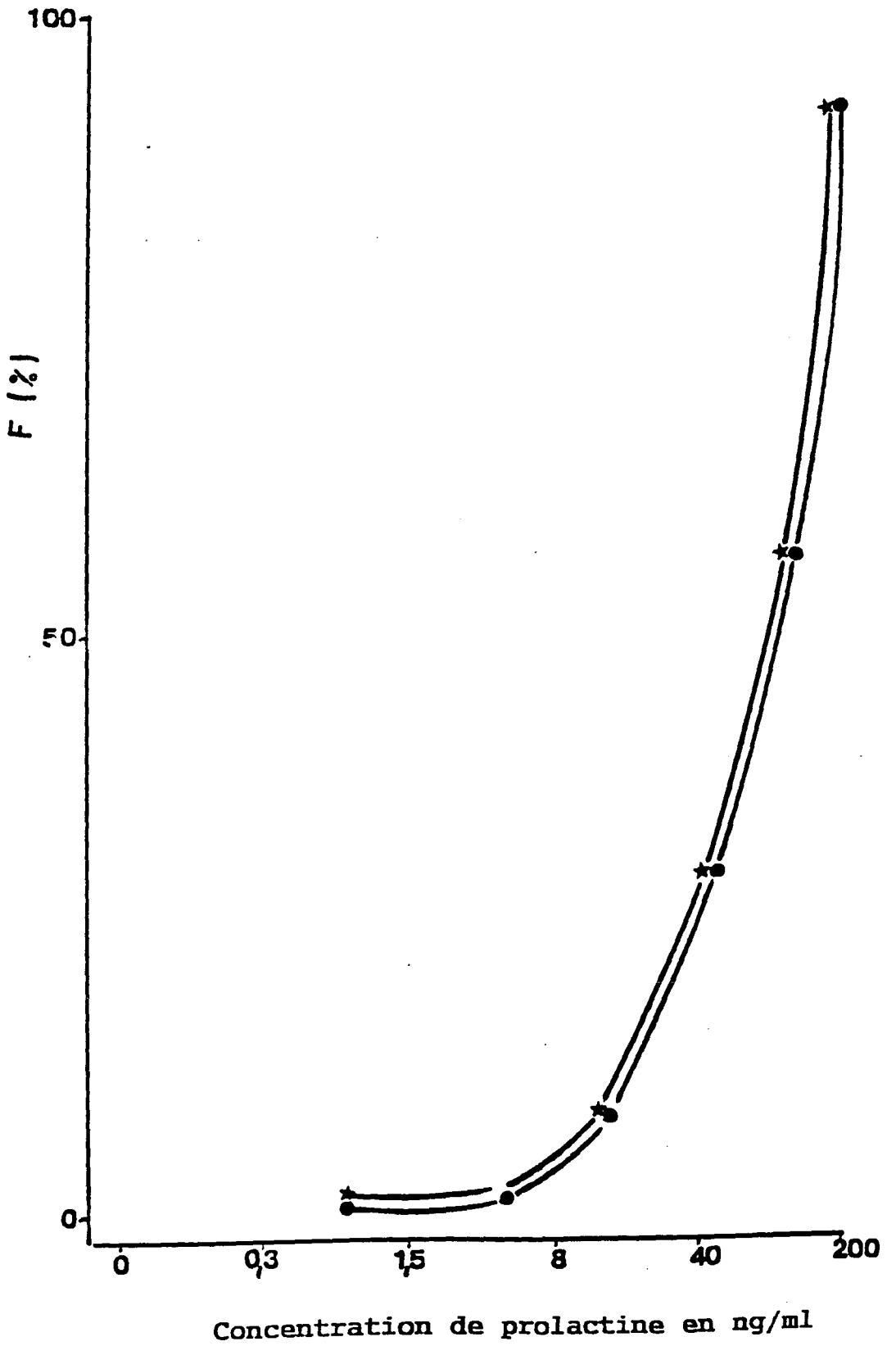


Figure 35 : Courbe de non compétition de la prolactine par RIA en présence ✶—✶ et en absence ●—● de 20 pmoles d'AMPc.

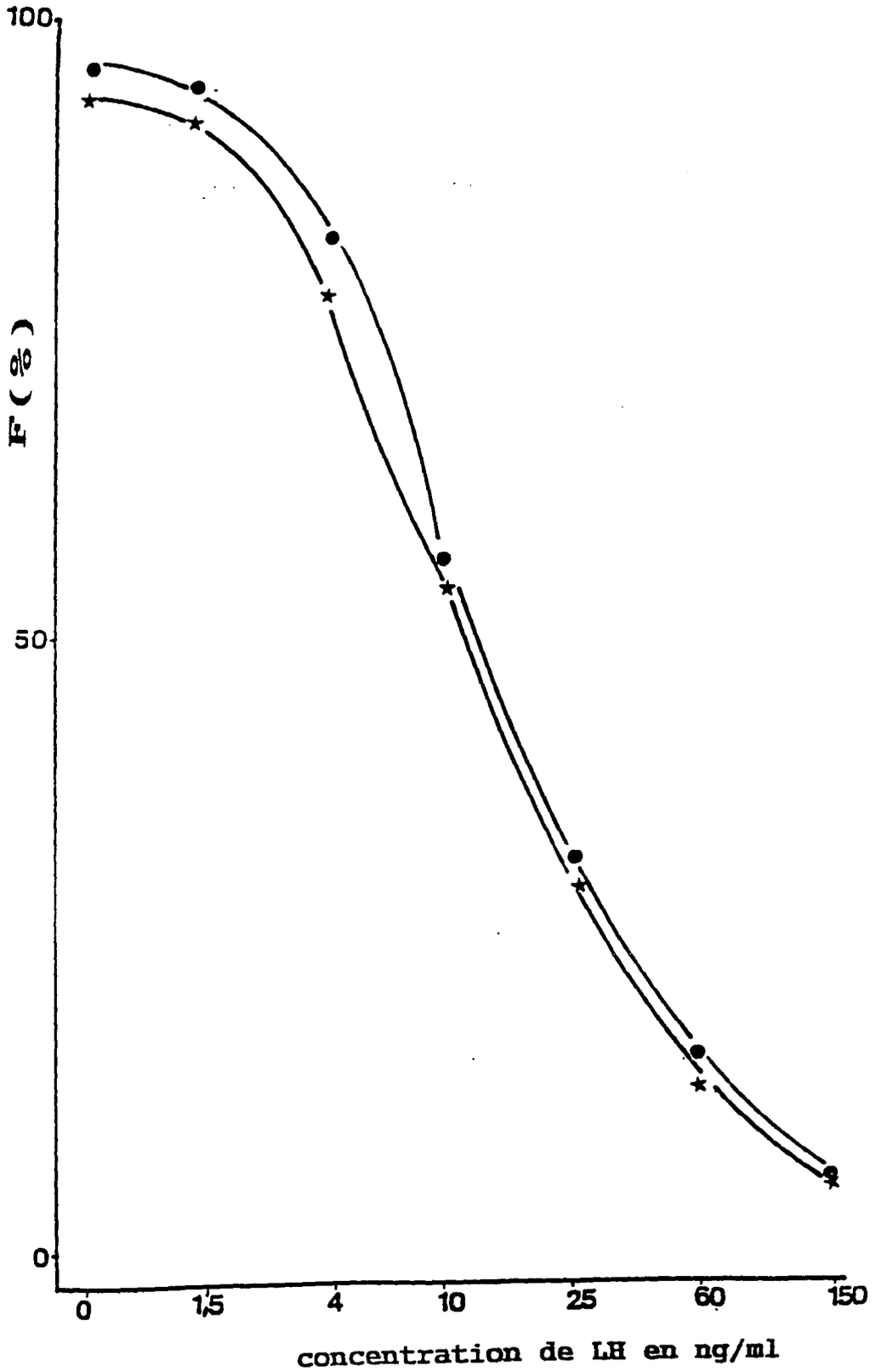


Figure 36 : Courbe de compétition réalisée par RIA entre la LH marqué à l'iode 125 et LH froide, vis-à-vis de son anticorps monoclonal en présence ✶----✶ et en absence de 20 pM d'AMPc ●----● .

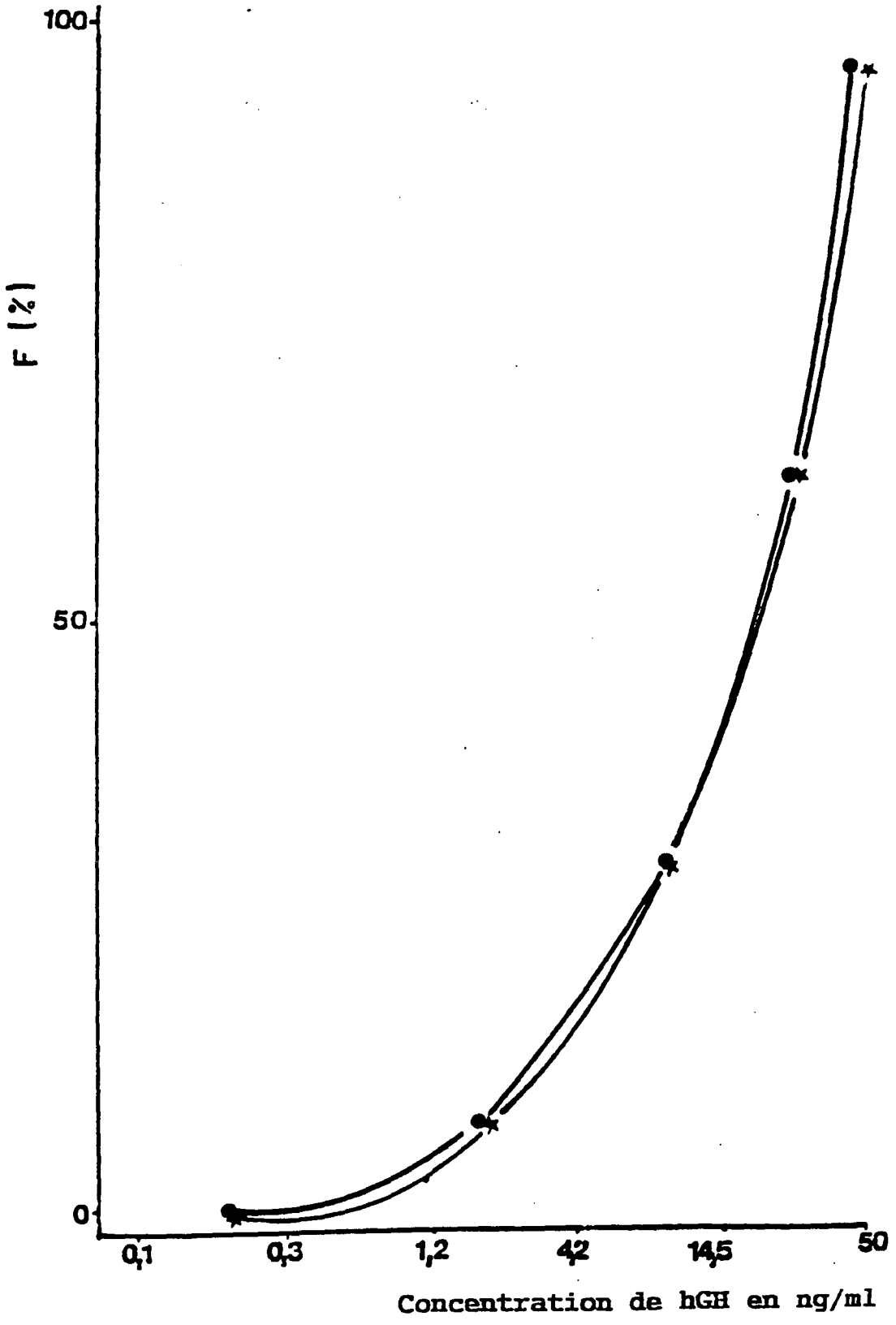


Figure 37 : Courbe de non compétition de l'hGH par RIA en présence ✶----✶ et en absence ●----● de 20 pmoles d'AMPc.

[AMPc] 1 = 50 pM/ml	[hPL] 1 = 50 pM/ml T = contrôle 0 pM d'hPL	Radioactivité (cpm) Compartiment avec hPL A	Compartiment sans hPL B	A - B
1	1	2128	1783	345
1	1/2	2103	1906	197
1	1/4	2155	2030	125
1	T	2077	2073	5
1/2	1	1045	895	135
1/2	1/2	1064	970	94
1/2	1/4	1049	958	91
1/2	T	1026	1018	8
1/4	1	602	475	127
1/4	1/2	580	473	109
1/4	1/4	598	523	77
1/4	T	550	544	6

Tableau 19 : Dialyse à l'équilibre : Résultats exprimés en cpm/min dans le compartiment A comprenant l'hPL, l'AMPc marqué à l'iode 125 (activité spécifique est 629 MBq/ug), et AMPc non marquée, et le compartiment B contenant uniquement le mélange d'AMPc marquée et non marquée. Les deux compartiments sont séparés par une membrane à seuil de coupure de 1000 daltons.

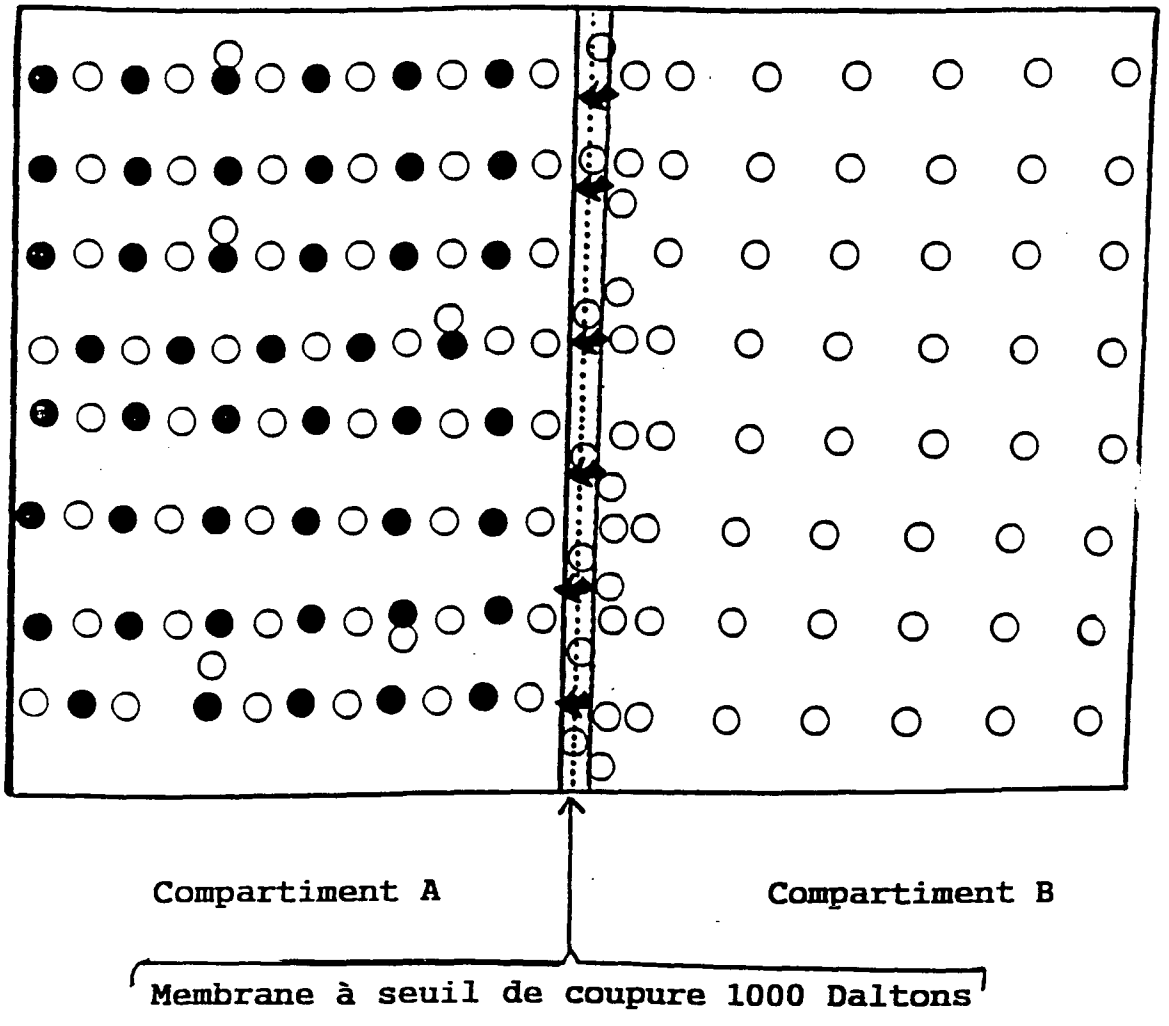


Figure 38 : Schéma représentant la dialyse à l'équilibre. Le compartiment A contenant l'hPL (●) et l'AMPc (○), est séparé du compartiment B contenant que de l'AMPc (○) par une membrane semi-sélective à seuil de coupure 1000 daltons.

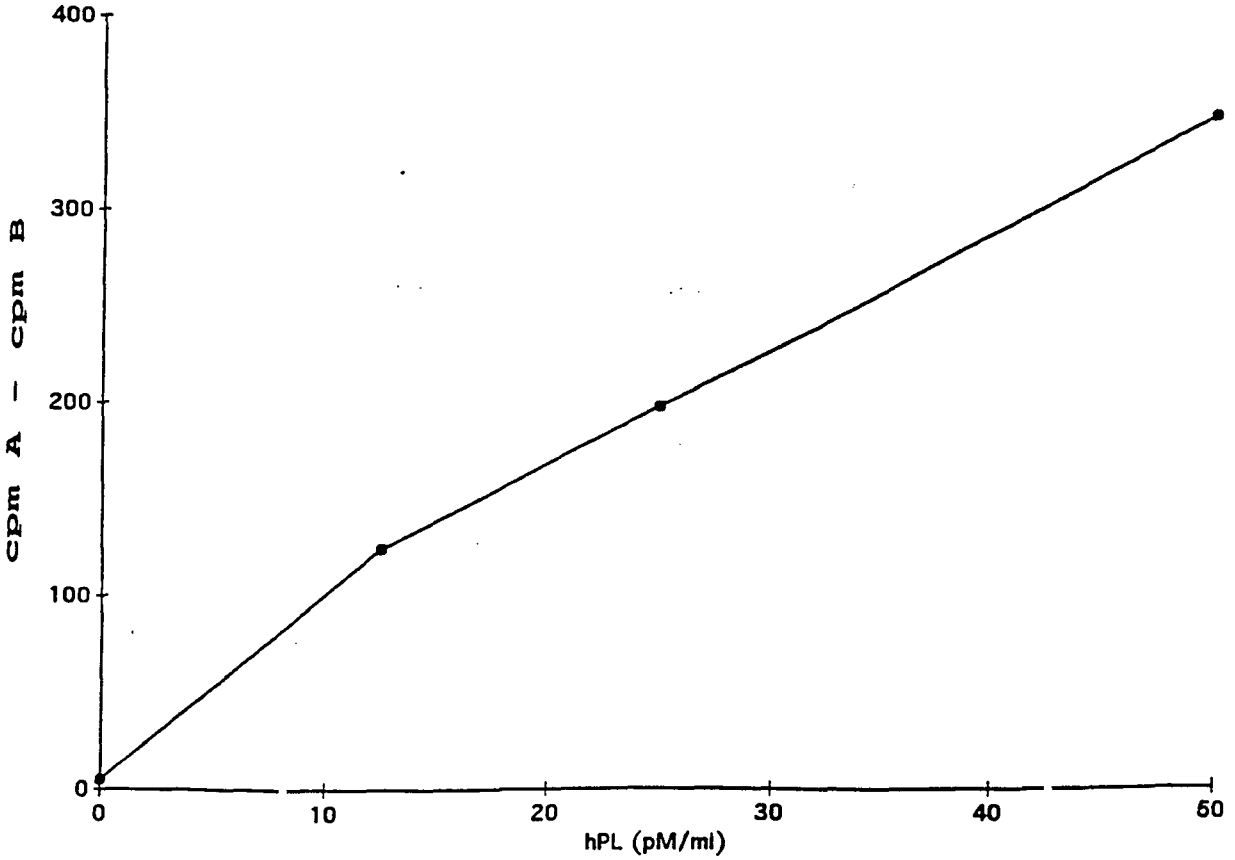


Figure 39 : Variation de cpm de l'AMPc marqué à l'iode 125 entre le compartiment A (contenant l'hPL + l'AMPc) et B (contenant que l'AMPc) en fonction de la concentration de l'hPL.

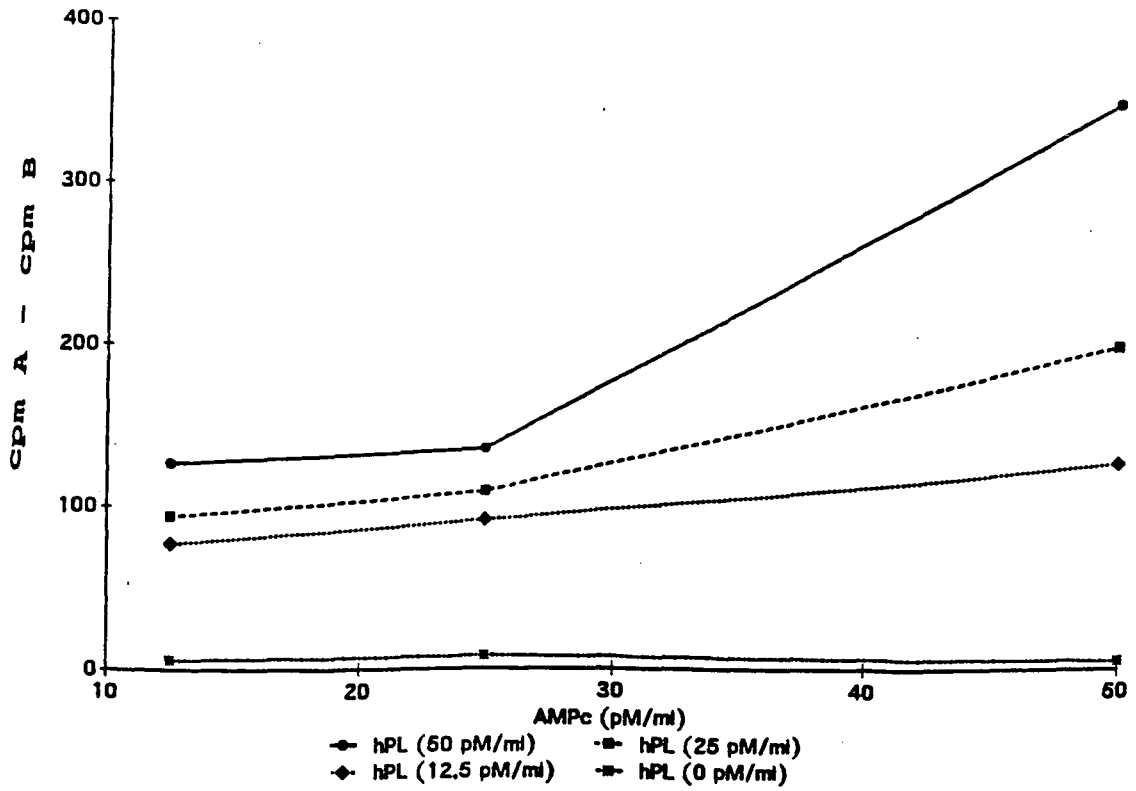


Figure 40 : Variation de cpm de l'AMPc marqué à l'iode 125 entre le compartiment A (contenant l'hPL + l'AMPc) et B (contenant que l'AMPc) en fonction de la concentration de l'AMPc.

III - 7.3 Chromatographie d'affinité de l'hPL sur agarose AMPc

Les expériences précédentes nous ont montré qu'il existe une fixation d'AMPc sur la molécule d'hPL, donc ce nucléotide peut jouer dans ce cas le rôle d'un ligand ; par conséquent, le passage de l'hPL sur gel contenant l'AMPc, devrait fixer une quantité de cette hormone.

La figure 41 rapporte le chromatogramme d'une solution (1mg/ml) d'hPL dans du tampon Tris/HCl, pH 7,5. Les pics analysés par test ELISA (Figure 42), montrent que le premier pic contient de l'hPL qui n'a pas été retenu par le gel, les 2 et 3ème contiennent la même hormone éluée respectivement par 1 et 2 % de SDS (il faut noter que le temps de contact entre l'hPL et l'AMPc-Agarose, avant lavage et élution a été court).

La figure 41 bis montre la même experience refaite avec un tampon Tris/HCl, pH 7,5 cette fois en absence de shaps et la duré de contact entre l'hPL et le gel est reporté à une nuit au lieu de 2 heures.
La figure 42 bis montre l'hGH ne réagit pas avec AMPc-agarose.

III - 7.4 Mesure de l'activité kinasique de l'hPL

Ayant montré que l'hPL fixe l'AMPc, il devenait intéressant de savoir si cette hormone avait une activité kinasique puisque généralement les protéines fixant l'AMPc ont une telle activité.

Nous avons essayé de mesurer l'activité kinasique en utilisant la même méthode de mesure et en travaillant dans les mêmes conditions que pour la protéine kinase AMPc dépendante, extraite du coeur de boeuf. Nous avons utilisé la caséine et le lysat de lymphocytes comme substrat.

III - 7.4.1 Caséine

Le tableau 20 nous montre que le transfert du phospore marqué vers la caséine est proportionnel à la concentration de l'hPL, dans le milieu réactionnel. Pour s'assurer que l'activité kinasique est bien due à l'hPL, nous faisons une mesure en présence d'anticorps monoclonal anti-hPL. Dans une première expérience, nous avons mis 10 ul de la solution d'anticorps contenant 6,5 mg de protéines par ml, on peut supposer que nous avons ajouté 430 pmoles d'IgG et nous avons bien neutralisé la moitié de l'hPL présent (924 pmoles). Dans une deuxième expérience, nous avons augmenté les concentrations en anticorps afin d'inhiber complètement la réaction (Figure 43).

III - 7.4.2 Lysat de lymphocyte humain

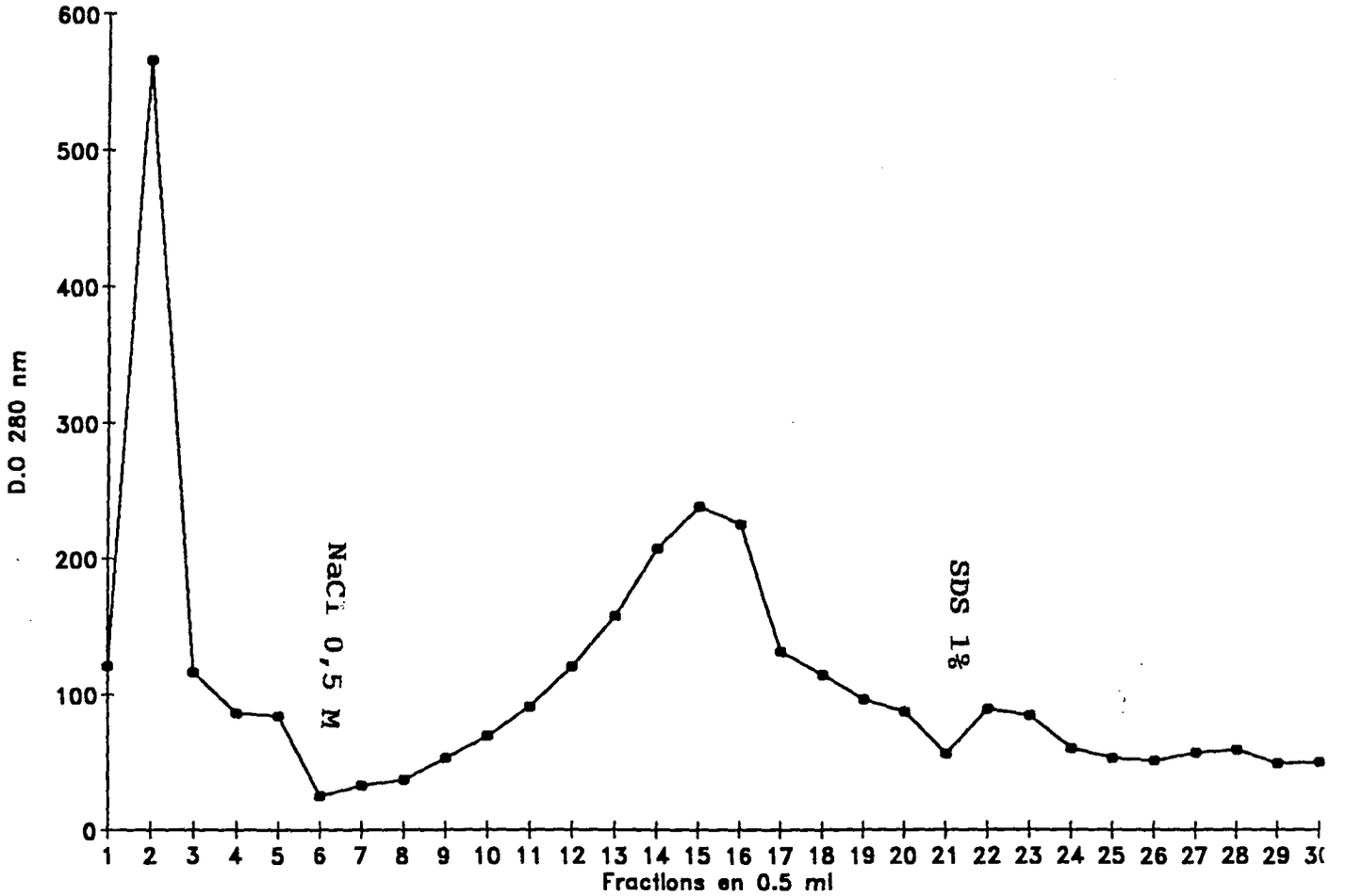


Fig 41 bis : Profil d'élution de l'hPL par chromatographie d'affinité sur agarose AMPc.
Le tampon est Tris/HCl pH 7,5.
Incubation une nuit à 4°C.

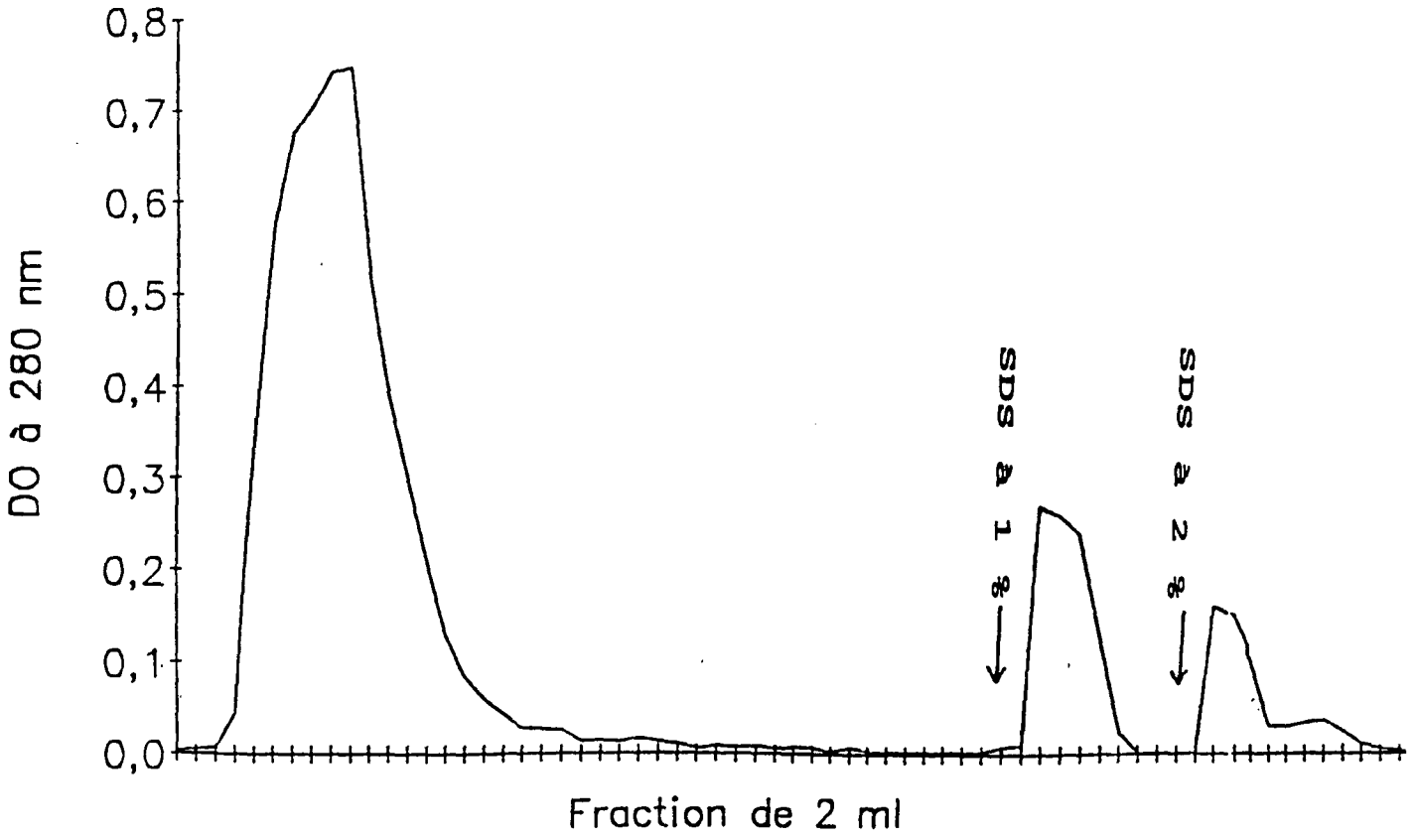


Figure 41 : Profil d'élution de l'hPL par chromatographie d'affinité sur agarose-AMPc.

Le tampon initial est Tris/HCl pH 7,5 ; NaCl 150 mM.

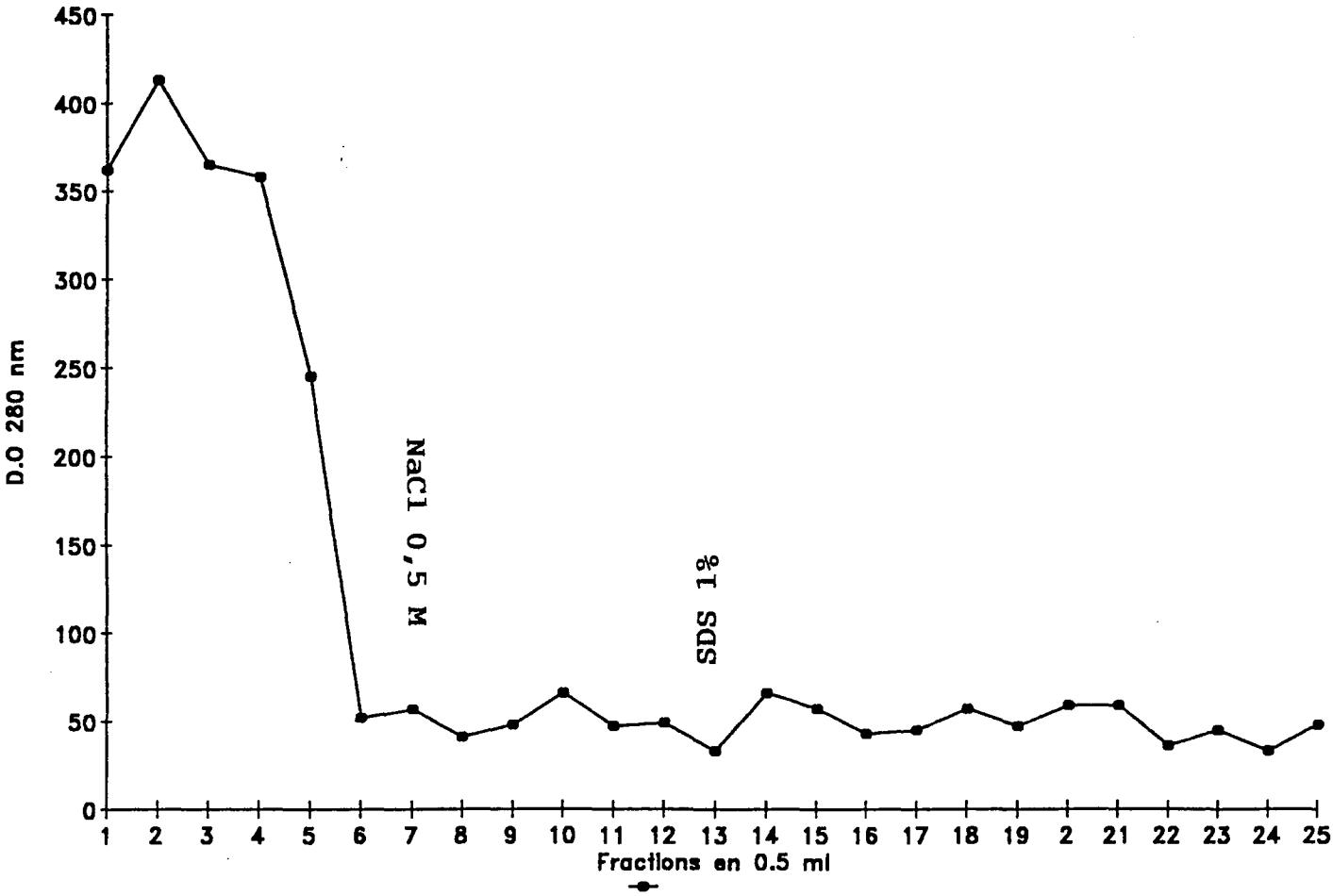


Fig 42 bis : Profil d'élution de l'hGH par chromatographie d'affinité sur agarose AMPc.
Le tampon est Tris/HCl pH 7,5.
Incubation une nuit à 4°C.

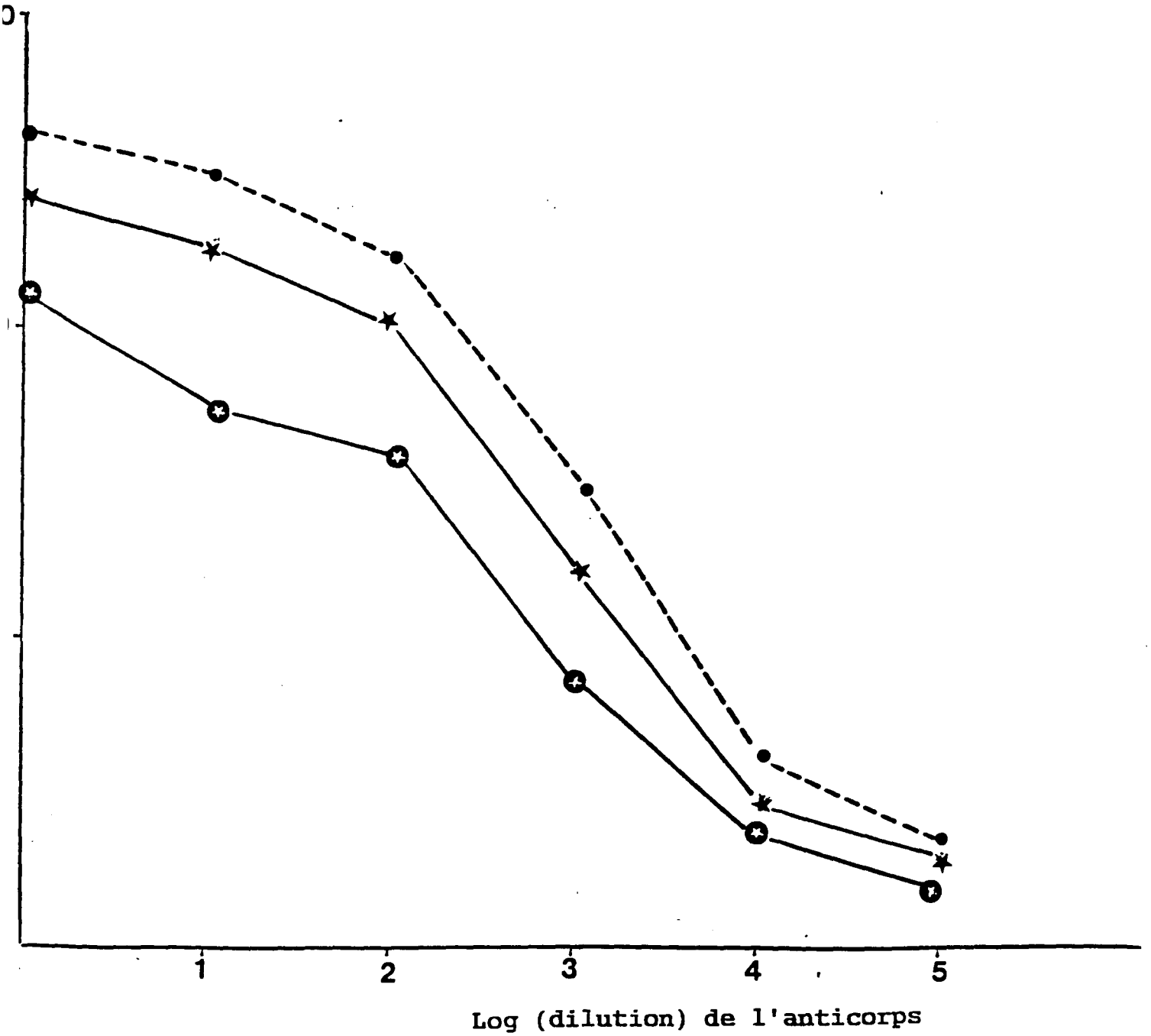


Figure 42 : Courbe réalisée par test ELISA de l'hPL native ●—● , du pic 1 ✶—✶ et du pic 2 ✪–✪ obtenu après chromatographie d'affinité sur agarose-AMPc.

Nous avons fait d'autres essais de l'activité kinasique de l'hPL en utilisant comme substrat, d'une part la caséine, et d'autre par le lysat cellulaire de lymphocytes. Les résultats sont rapportés dans le tableau 21. Avec les deux substrats employés, l'activité kinasique de l'hPL est faible. Elle est cependant supérieure avec le lysat de lymphocytes humains. Avec ce substrat, l'activité kinasique de l'hPL représente 58 % de celle de la PK2.

Echantillons	Nombre de pmoles	cpm
Blanc	0	342
Témoins positifs PK2	110	41549
hPL	92	852
hPL	231	1277
hPL	462	1604
hPL	693	2086
hPL	924	3101
hPL + anti-hPL (AMc)	924	1707

Tableau 20 : Mesure de l'activité kinasique de l'hPL en utilisant la caséine comme substrat. Les résultats sont exprimés en cpm.

Ces résultats laissent à penser que l'hPL a une activité kinasique faible mais mesurable. Cela est peut-être dû au fait que nous n'ayons pas le substrat spécifique.

III - 7.5 Electrophorèse de la solution contenant l'hPL et son transfert vers une membrane nitrocellulose

Nous venons de montrer que l'hPL possède une activité kinasique non négligeable par rapport à la protéine kinase AMPc-dépendante provenant du muscle de boeuf (SIGMA). Pour affirmer que seul l'hPL est responsable de cette activité kinasique et qu'elle n'est pas due à une contamination, nous avons soumis la solution contenant de l'hPL commercial à une électrophorèse native (Figure 44) et en présence de SDS (Figure 45). En électrophorèse native, on obtient 3 bandes dont la plus importante a un poids moléculaire apparent correspondant à celui de l'hPL. Nous avons effectué un immunotransfert sur une membrane de nitrocellulose

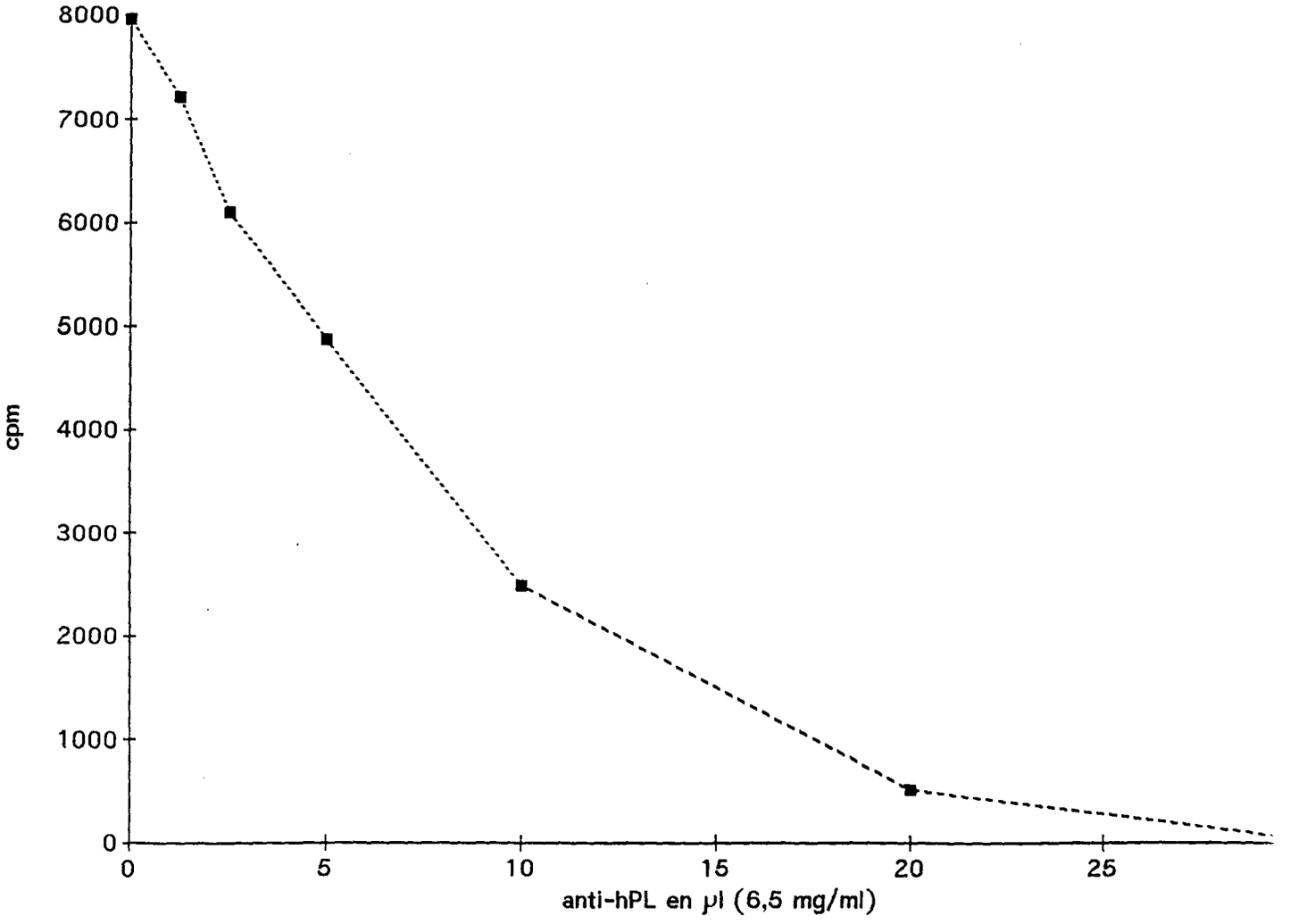


Figure 43 : Inhibition de l'activité kinasique de l'hPL par ajout des concentration croissantes d'anticorps monoclonal anti-hPL.

Echantillons	Nombre de pmoles	A cpm	B cpm
Blanc	0	400	460
Témoins positif PK2	110	7202	71000
hPL	92	1640	1240
hPL	231	2644	2058
hPL	462	4185	3823

Tableau 21 : Mesure de l'activité kinasique de l'hPL en utilisant comme substrat A : le lysat de lymphocytes ; B : la caséine. Les résultats sont exprimés en cpm.

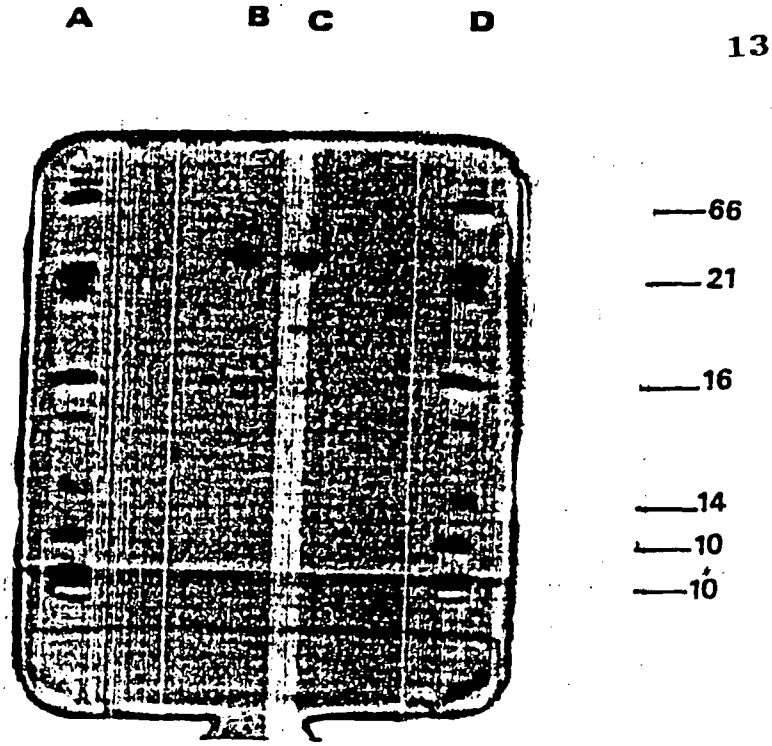


Figure 44 : Electrophorèse en PAGE native de la solution contenant de l'hPL.

Tampon de gel : 0,112 M d'acétate ; 0,112 M Tris ; pH 6,8.

Tampon d'électrode : 0,88 M L-alanine ; 0,25 M Tris ; pH 8,8.

Echantillon : 50 ng d'hPL.

Courant continu : 25 mA ; 1 watt ; 20 volt.

Puits A et D : marqueurs de poids moléculaire.

Puits B et C : solution d'hPL.

Coloration argentique.

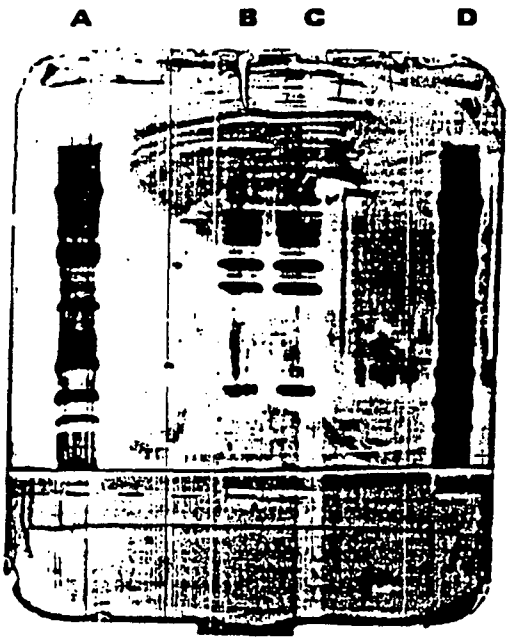


Figure 45 : Electrophorèse en PAGE SDS de la solution contenant de l'hPL.

Tampon de gel : 0,112 M d'acétate ; 0,112 M Tris ; pH 6,8.

Tampon d'électrode : 0,2 M -Tricine ; 0,2 M Tris ; pH 8,1.

Echantillon : 50 ng d'hPL.

Courant continu : 25 mA ; 1 watt ; 20 volt.

Puits A et D : marqueurs de poids moléculaire.

Puits B et C : solution d'hPL.

Coloration argentique.

et nous avons révélé que les trois bandes réagissent avec l'anticorps monoclonal (Figure 46). Compte tenu des poids moléculaires, ces bandes représentent l'hPL natif pour la plus importante, les deux autres bandes pouvaient être de l'hPL dégradée au cours de la conservation.

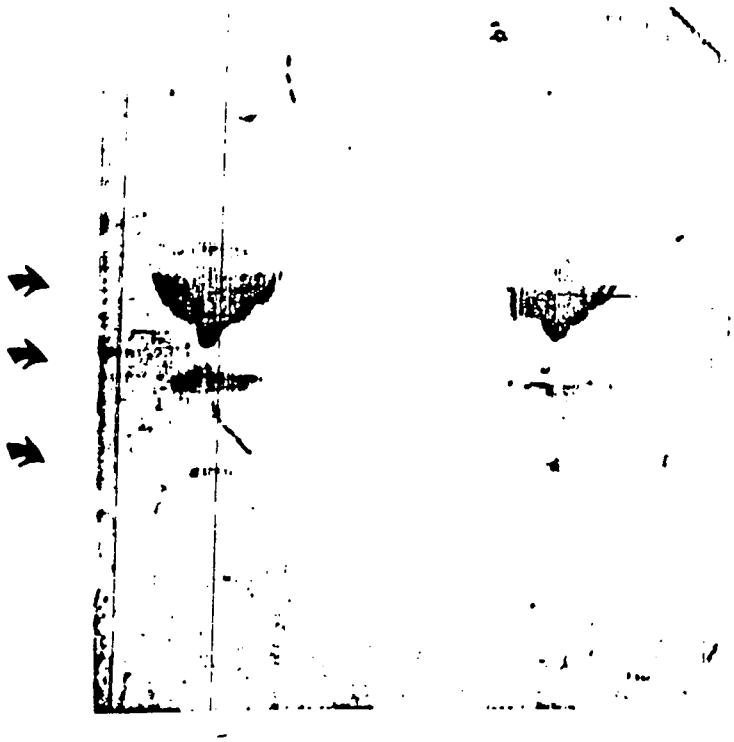


Figure 46 : Immunotransfert de l'hPL natif sur une membrane nitrocellulose.

Les bandes sont révélées par un anticorps monoclonal anti-hPL sur lequel est fixé un deuxième anticorps anti-souris marqué à la phosphatase alkaline.

IV DISCUSSION

IV - 1 Fabrication des anticorps monoclonaux

Les paramètres qui peuvent influencer le résultat final d'une fusion cellulaire, sont notamment l'immunisation des souris, la technique de fusion en elle-même, les méthodes de détection et de clonage utilisées, la purification des immunoglobulines produites.

Le choix du myélome murin est primordial : il ne doit pas, d'une part, sécréter par lui-même d'immunoglobulines, pour ne pas avoir à séparer du milieu de culture ses anticorps de ceux produits par l'hybridome, et d'autre part, il doit être déficient en une enzyme essentielle à la croissance cellulaire, ce qui permet d'utiliser un mode simple de sélection afin que les cellules non fusionnées soient éliminées.

Le choix de l'animal quant à lui, a été orienté vers la souris, notre laboratoire possédant un élevage conséquent et adapté. Nous avons réalisé une immunisation in vivo sur des souris femelles hybrides de première génération provenant d'une souris mâle Balb/c et d'une femelle C57 âgées de 6 semaines. Ces souris ont une réponse immunitaire importante.

En général la solution d'antigène injectée n'est jamais parfaitement pure. Des contaminants, même sous forme de traces, peuvent s'avérer suffisants pour stimuler des lymphocytes B. En effet, la réponse immune dépend en grande partie de l'immunogénicité de l'antigène introduit et est toujours polyclonale, ainsi l'hPL injectée seule à la souris est faiblement immunogène et l'emploi d'un adjuvant est nécessaire pour stimuler la réaction immunologique (Ivanyi et al., 1980). Le rôle des adjuvants immunitaires est de permettre une libération progressive de l'antigène et de provoquer une réaction inflammatoire, amplifiant ainsi la réponse immunitaire.

La structure tri-dimensionnelle de la molécule antigénique, le positionnement des épitopes sont également primordiaux. Au total, de très nombreux anticorps peuvent être produits, chacun dirigé contre un site particulier. Il faut ensuite qu'un maximum d'anticorps dirigés contre un enchaînement, bien spécifique de l'hPL fusionnent avec les cellules myélomateuses. Ici également, intervient la statistique : plus le nombre de lymphocytes correctement stimulés sera grand, plus on aura de chance de retrouver une spécificité bien particulière dans les hybridomes secrétés.

Parmi les différents protocoles mis en oeuvre, l'un, classique, consiste à injecter 35 ug d'antigène par souris, à 3 semaines d'intervalle et de faire une dernière injection de rappel 3 jours avant la fusion. D'après Brebeack et al. (1989), des immunisations répétées avant la fusion permettent une prolifération des

cellules spléniques. le rappel avant la fusion doit être administré par voie intraveineuse, 3 jours avant la fusion. Cette manipulation est techniquement efficace et rapide. Nous avons constaté au laboratoire que cette méthode donne de meilleurs résultats, comparés à des injections intrapéritonéales répétées chaque jour avant la fusion.

Bazin et al. (1988) ont montré que le temps écoulé entre le dernier rappel et la fusion dicte, en partie, la spécificité des anticorps monoclonaux produits et également le nombre d'hybridomes sécréteurs.

Le type de PEG utilisé, sa concentration et son pH dans la solution sont des éléments également importants. En effet, le PEG est connu pour sa cytotoxicité, il est donc vital pour les cellules de limiter au minimum leur exposition à ce fusogène. Il faut effectuer la manipulation en une minute environ, et maintenir le mélange constamment à 4°C (Lane et al., 1986).

D'autres méthodes sont applicables, la plus ancienne (Kölher et Milstein, 1975) utilise le virus de Sendai, mais elle produit des hybridomes moins stables (Winter et al., 1991). Plus tard, des méthodes d'électrofusion se sont développées, mais leur utilisation reste peu fréquente, vraisemblablement à cause du coût de l'équipement.

Un autre élément à prendre en compte pour la production d'hybridomes est l'utilisation de cellules nourricières (macrophages), conseillée par Hämmerling (1981). Elles sont apportées à la concentration de 10^4 cellules/ml. Elles servent à minimiser les effets de coopération entre les cellules par augmentation de la densité cellulaire (Coller et al., 1986) de ces premières étapes de la fusion. Néanmoins, certains auteurs (Samoilovich et al., 1987 ; Orlik et al., 1988 ; Newsholme et al., 1989) ont montré que lorsque les fusions sont effectuées sans cet apport, le pourcentage de croissance cellulaire ou du nombre de puits positifs n'est pas modifié.

Le milieu de base des cultures cellulaires doit apporter des sels pour assurer l'isotonicité, des oligoéléments, du glucose, des vitamines, des acides aminés essentiels et des cofacteurs tels le glutathion. Les hormones (insuline), les facteurs de croissance, les protéines de transport (transferrine, albumine), sont apportés par le sérum de veau foetal.

Ce sérum, préparé dans des conditions de complète aseptie, à partir de sang frais collecté sur des foetus de veau par ponction cardiaque, est soumis à des contrôles d'identité, de pureté et d'activité. Néanmoins, avant utilisation, des

clonages de cellules sont effectués en présence de plusieurs lots de sérum et celui où la croissance cellulaire s'avère maximale est choisi.

Après la fusion proprement dite, intervient la répartition des cellules dans les plaques de culture. Il est logique de penser qu'un nombre de plaques élevé permettra un pré-clonage par distribution physique des hybridomes. Donc, l'utilisation de plaques de culture de 96 puits au lieu de 24, augmentera les chances d'avoir un clone positif au cours de la répartition et diminue le laps de temps nécessaire à la croissance cellulaire et avant le premier test de détection. En effet, le volume du milieu de culture, plus petit dans des puits de faible contenance, aura plus rapidement une concentration en anticorps suffisante pour être détectée par test ELISA. Obtenir et maintenir la monoclonalité d'un hybridome sécréteur est l'objectif désiré. Pour y parvenir, une méthode adoptée par la majorité des laboratoires, est celle de la dilution limite. Une méhtode de clonage en milieu semi-solide d'Agarose a également été décrite (Kennet et al., 1982), mais des cellules adaptées à un milieu liquide ne se multiplient pas de façon optimale dans l'agar.

La population cellulaire résultant d'une fusion est hétérogène : elle contient des hétérocaryons qui pourront devenir des hybridomes, des lymphocytes et des cellules myélomateuses qui seront peu à peu éliminés par un processus de mort naturelle pour les uns, par la sélection HAT pour les autres. Néanmoins, chaque hybridome n'est malheureusement pas un clone sécréteur, et encore moins un clone sécréteur d'anticorps de spécificité voulue. L'application de la méthode de dilution limite suivant une équation binominale de probabilité d'une loi de Poisson (Coller et al., 1986), permet de sélectionner en trois clonages ou plus l'hybridome désiré.

Cette méthode de clonage a donc un intérêt dans la culture à long terme des hybridomes. Dès qu'une perte sensible de production d'anticorps est détectée, il faut recourir à des dilutions limites.

Après avoir mis en oeuvre toutes les conditions pour obtenir des hybridomes, il faut choisir une méthode de détection valable pour mener à bien les clonages. Plusieurs qualités sont nécessaire à ce test : il doit tout d'abord être fiable et sensible, il doit être rapide pour tester au plus vite les innombrables cellules produites par certaines fusions, être reproductible et évidemment, pour des questions économiques, peu coûteux. En raison de l'existence, dans notre laboratoire, d'une technique bien maîtrisée, nous avons utilisé l'Enzyme Linked Immuno-Sorbent-Assay, communément appelé E.L.I.S.A.

La caractérisation finale des anticorps de souris produits est la détermination de l'isotype. Elle se fait souvent par la technique d'Ouchterlony, nous avons choisi un kit (Mouse monoclonal antibody isotyping kit, Amersham), qui est rapide et sensible. La totalité des anticorps produits est de classe IgG1, ceci peut s'expliquer par le hasard du choix des clones.

IV - 2 Purification des anticorps

Nous allons maintenant aborder le problème de purification de ces anticorps monoclonaux anti-hPL, puis l'identification des épitopes de l'hPL.

L'intérêt de notre travail réside dans l'obtention d'un anticorps hautement purifié présentant une bonne affinité pour l'hPL. Ce préalable est indispensable avant de commencer la recherche sur l'épitope.

La purification des anticorps monoclonaux à partir de liquide d'ascite a été abordé par plusieurs auteurs (Kennel S.J., 1983 ; Burck, 1982 ; Goding, 1980 ; Bosthetti E., 1987 ; Halwani et al., 1990 ; Josic et al., 1991 ; Avest et al., 1992). Les liquides d'ascite présentent l'avantage d'avoir des concentrations en anticorps monoclonaux importantes (10 à 20 mg/ml). Cependant, les anticorps propres de la souris peuvent géner la purification et par ailleurs, il est quelquefois difficile d'obtenir des ascites. Différentes techniques ont été employées, notamment des techniques chromatographiques d'échange d'ions (Beggemann et al., 1990), et d'affinité sur protéine-A-Séparose pour certaines sous-classes d'IgG (Horstmann et al., 1990).

Le problème de la purification des anticorps monoclonaux produits in vitro, s'est posé sérieusement lorsque la production en masse de ces anticorps a été abordée. En effet, la concentration dans le milieu de culture est faible (10 à 50 ug/ml) et la présence des protéines apportées par le SVF peut aussi géner la purification.

Pour pallier certaines difficultés, et particulièrement la richesse des milieux de culture en protéines autres que les immunoglobulines, certains auteurs se sont penchés vers la mise au point de milieux artificiels présentant de faibles concentrations protéiques et permettant la croissance des hybridomes.

Dans les travaux que nous avons entrepris, nous avons abordé dans un premier temps, l'étude de différents moyens permettant de concentrer les anticorps monoclonaux produits in vitro. Cette étape est nécessaire, car elle permet d'une part la réduction des volumes des échantillons (ce qui rend leur manipulation plus facile) et d'autre part la concentration des immunoglobulines de l'échantillon.

Parmi les techniques disponibles, nous avons utilisé la précipitation au sulfate d'ammonium, la lyophilisation et l'ultrafiltration.La technique que nous avons souvent utilisé est l'ultrafiltration ; cette technique a été choisie, car elle constitue non seulement un mode de concentration, mais une étape de prépurification.

Les anticorps monoclonaux qui sont contenus dans nos échantillons sont de type IgG1, les membranes utilisées pour leur concentration ont un seuil de coupure de 10^5 daltons, ce qui entraîne théoriquement l'élimination des protéines, dont le poids moléculaire est inférieur à ce seuil de coupure. Mais, nous avons constaté que ces membranes ne permettent pas l'élimination totale des autres protéines de poids moléculaire supérieur à 50.000 daltons contenues dans l'échantillon et en particulier l'albumine, ceci ayant été vérifié par électrophorèse. Cette technique a été utilisée par d'autres auteurs pour la concentration d'anticorps monoclonaux purifiés (Namil L., 1978).

Il est possible pour les anticorps monoclonaux de type IgG1, d'utiliser au cours d'une premiètre étape de purification un échangeur anionique. Cette étape précédée par une filtration sur gel, nous semble présenter un intérêt pour augmenter le degré de pureté malgré une perte d'un tiers de la concentration des immunoglobulines de départ, cette perte pouvant être due à une mauvaise résolution de la colonne.

Lors de la purification du témoin négatif (milieur RPMI 1640 + 10 % de SVF), on constate que le pic 2 de la figure 10 correspond aux anticorps contenus dans le sérum de veau foetal. Lorsqu'on utilise un tampon Tris-HCl pH 8 (Malm 1987), les anticorps monoclonaux détectés par ELISA sont dispersés dans les pics 3 et 4 (Figure 12). En ramenant le pH à 7, les anticorps monoclonaux sont élués dans un seul pic pour une concentration comprise entre 0 et 0.14 M de NaCl.

La méthode de purification par chromatographie d'affinité sur protéine A-Sépharose, semble être reproductible, puisque des surnageants de culture d'une même lignée sont désorbés toujours de la même manière. Elle paraît également être spécifique puisque, d'après la figure 16, les fractions récoltées, rassemblées et testées par ELISA, présentent une D.O. beaucoup plus élevée que les fractions issues de la purification d'échange d'ions. De plus, cette méthode permet d'avoir un degré correct de pureté puisqu'aucune bande contaminante n'est décelée en électrophorèse SDS-PAGE.

IV - 3 Recherche des épitopes

L'anticorps monoclonal (IgG1) choisi pour faire la recherche d'épitope, présente une bonne affinité de l'ordre 1,5 x 10^{12} M, il se prête donc à ce genre de recherche.

Les différentes méthodes de prédictions antigéniques sont surtout basées sur des notions d'hydrophilicité et hydrophobicité (Van Regnmortel et Marcillac, 1988). Ces méthodes mettent en jeu la notion d'accessibilité de surface, appelée acrophilicité. Il existe des exemples où l'anticorps reconnaît non pas la composition chimique de l'antigène, mais sa configuration ; ceci suggère que les anticorps peuvent être dirigés non pas contre des structures chimiques spécifiques (ou linéaire), mais contre la forme tridimentionnelle des nuages électroniques. Donc, notre première démarche a été de montrer si l'épitope est de structure spaciale ou linéaire ; après avoir détruit les ponts disulfures, le résultat que nous avons obtenu montrent que nous sommes en présence d'un épitope dont la séquence est de type linéaire. Ce qui veut dire que la destruction de la structure tertiaire de l'hPL, ne modifie pas la région du déterminant antigénique.

Pour déterminer la séquence d'hPL qui contient l'épitope, il faut hydrolyser la molécule d'hPL. Plusieurs méthodes peuvent être utilisées : hydrolyse enzymatique ou chimique. Avec l'hydrolyse enzymatique soit par la trypsine ou la chymotrypsine, nous devrions obtenir un nombre très élevé de peptides qui seront donc difficiles à purifier et identifier. Par contre, une hydrolyse chimique avec le bromure de cyanogène, méthode utilisée par plusieurs auteurs (David et al., 1971 ; Mitchell et al., 1988 ; David et al., 1989 ; Willi et al., 1990), nous a semblé efficace. En tenant compte du nombre de résidus méthionine contenus dans cette hormone, le nombre de fragments peptidiques que nous devons théoriquement obtenir à partir de l'hPL est de 7, dont deux sont reliés par un pont disulfure.

Après les étapes de clivage de l'hPL par le bromure de cyanogène, les fragments peptidiques sont séparés par HPLC en phase reverse. Le nombre de pics obtenus en pratique dépasse légèrement le nombre théorique de fragments prévus, 8 au lieu de 7, ce qui peut s'expliquer par le fait que les pics contiennent probablement plusieurs fragments de tailles et séquences différentes.

Les différents pics contenant les fragments peptidiques ont été incubés en présence de l'anticorps monoclonal en test ELISA.

Les pics positifs (4 et 5) ont été rechromatographiés une deuxième fois afin d'obtenir des pics homogènes.

Le résultat du séquençage du pic 4 montre la présence de deux fragments reliés par un pont disulfure, et celui du pic 5 contient 3 fragments. Le seul fragment que nous ayons trouvé en commun est le fragment 5 qui correspond à la séquence 125-169 sur l'hPL. Les travaux réalisés par Neri et al. (1984) ont montré que l'hPL possède un épitope commun avec hGH dont la séquence est 166-174. Or, durant notre travail, nous avons montré que l'anticorps monoclonal purifié ne réagit pas avec l'hGH, par contre il réagit avec la séquence 125-169, donc notre épitope se trouve dans cette séquence.

Les acides aminés qui composent cette séquence sont :

- Thr-Gly-Gln-Ile-**Leu**-Lys... dans l'hPL
- Thr-Gly-Gln-Ile-**Phe**-Lys... dans l'hGH

Il y a un seul acide aminé qui diffère : c'est l'acide aminé qui occupe la position 139. La région 135-145 de l'hGH a été objet d'étude approfondie par plusieurs auteurs (Sing et Col., 1974 ; Lewis et al., 1977 ; Graf et al., 1982 ; Chêne et al., 1987). En supprimant cette séquence de l'hGH par digestion trypsique. Singh et al. (1983) ont constaté que l'hormone de croissance privée de ces 6 résidus d'aminoacides conserve intact ses propriétés de liaison aux récepteurs somatotropes et lactogènes. Elle réagit de manière identique avec un immunsérum anti-hPL et reste active dans le test de croissance in vivo du tibia de rat hypophysectomisé. Donc, on peut déduire que la leucine en position 139 de l'hPL est responsable de la spécificité de l'antigénicité de cette séquence, car notre anticorps monoclonal ne réagit pas avec l'hGH.

IV - 4 Relations AMPc-hPL

Vuillemin-Gelot (1975) a montré qu'il existe une relation étroite entre l'hPL et l'AMPc en mettant en évidence une activité liante de l'hPL purifié, elle a montré que la présence d'AMPc modifiait la réactivité immunologique d'hPL, lors du dosage radioimmunologique. Nous avons repris la même expérience en utilisant cette fois les anticorps monoclonaux anti-hPL. Nos résultats montrent qu'en présence de l'AMPc la réaction antigène-anticorps est modifiée, une augmentation de 30 % de la réaction antigène-anticorps est observée en présence d'AMPc soit en test ELISA, soit par dosage radioimmunologique. Cette inhibition est bien spécifique de l'AMPc, en effet elle n'est pas retrouvée si on utilise de l'ATP, du GTP, ou encore du GMPc.

Pour éliminer l'hypothèse que l'AMPc pourrait avoir une action générale sur les anticorps, et non pas une action spécifique sur la réaction hPL-anti-hPL nous avons testé l'action de l'AMPc dans d'autres dosages radioimmunologiques effectués de manière analogue : le dosage de la hGH, prolactine et LH. On constate que pour ces hormones, il n'y a pas d'inhibition de la réaction antigène-anticorps en présence d'AMPc.

La modification du comportement de l'hPL, vis-à-vis de son anticorps monoclonal est bien dû à l'AMPc, ce qui suppose une liaison même brève de l'hPL avec l'AMPc.

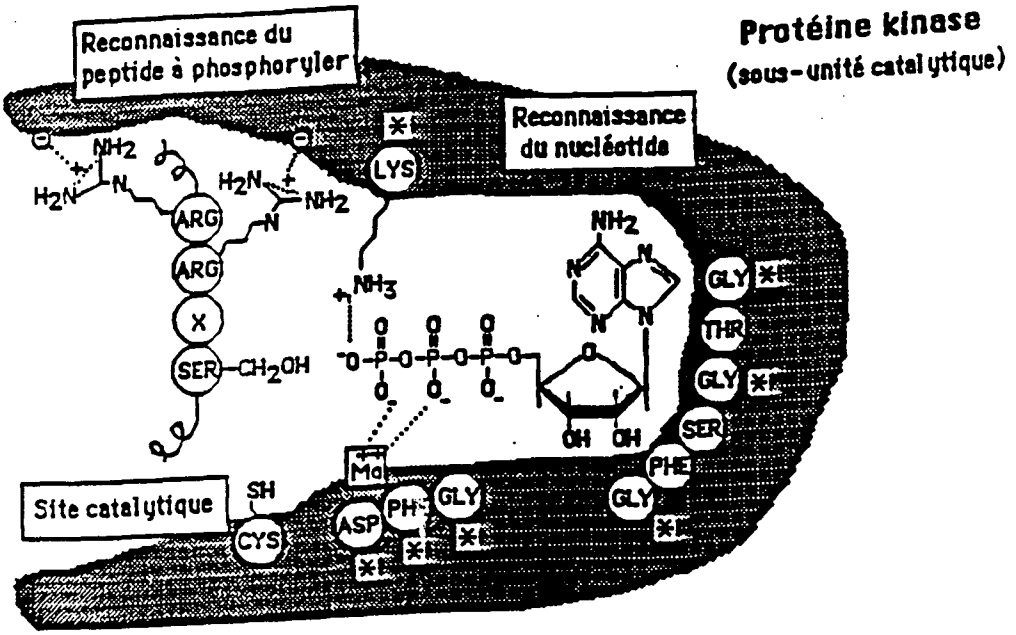
Il nous reste à mettre en évidence cette liaison d'une manière directe et concrète, pour cela nous avons procédé à la dialyse à l'équilibre. Le résultat obtenu montre que le nombre de coup par minute mesuré dans le compartiment contenant l'hPL est plus élevé que dans celui ne contenant pas l'hPL. Plus la concentration d'hPL est grande, plus la différence de cpm entre les compartiments est grande. On a pu déduire de ces expériences que l'hPL fixe l'AMPc.

Afin de mieux confirmer la liaison AMPc-hPL, nous avons passé de l'hPL purifié sur une colonne de gel Agarose-AMPc. Si il y a liaison AMPc-hPL, ce dernier sera retenu par la colonne. L'élution est faite par une solution de SDS (Dedra et al., 1990). Le résultat obtenu montre deux pics élués successivement par 1 et 2 % de SDS. Les deux pics testés en ELISA par l'anticorps monoclonal montre la présence d'hPL.

Brondeau (1980), avait déjà montré que dans un extrait placentaire existait une (ou des) protéine (s) liant l'AMPc dont l'affinité était de $1,1.10^6$ M^{-1}. Seulement il restait à prouver que cette protéine-liante était bien de l'hPL.

Les chaînes C (catalytiques) de la protéine kinase A-AMPc dépendante présentent des ressemblances évidentes avec toute une gamme de protéines à activité kinasique, impliquées de près ou de loin dans les régulations cellulaires : phosphorylase kinase, myosine kinase, facteur de croissance (EGF), récepteur de l'insuline, et oncogènes... d'où l'importance donnée par les recherches actuelles à ces kinases. Toutes ces protéines semblent avoir en commun leur aptitude à fonctionner comme kinase et à reconnaître spécifiquement d'autres polypeptides. Les ressemblances se traduisent par des homologies de séquence et une structure probablement similaire.

Le schéma suivant (d'après Taylor et al. (1988) montre les principales caractéristiques d'une protéine à activité kinasique. On a noté d'une astérisque toutes les positions d'acides aminés retrouvées comme invariable dans toutes les kinases.



On constate la présence de plusieurs résidus glycyl invariants. Ce petit acide aminé joue un rôle structurale important, un peu comme l'espace qui sépare deux mots dans une phrase. La conservation des résidus glycyl répétés dans une séquence est un indice d'une structure locale préservée au cours de l'évolution de la chaîne polypeptidique ( ).

Dans notre travail, nous avons essayé de vérifier si l'hPL a une activité kinasique ou seulement un pouvoir de fixation de l'AMPc. L'expérience a été faite en utilisant comme substrat la caséine.

Les résultats obtenus montrent qu'effectivement l'hPL à une faible activité kinasique par rapport à l'enzyme de référence (la protéine kinase AMPc-dépendant du coeur de boeuf) que cette activité est due uniquement à l'hPL. Nous avons effectué une électrophorèse native et dénaturante de l'hPL du commerce que nous avons utilisé durant tous nos travaux. Nous avons obtenus plusieurs bandes dont la plus importante correspondait à l'hPL elle-même, les autres ont un poids moléculaire inférieur à celui de l'hPL. Ces trois bandes réagissent avec l'anticorps monoclonal anti-hPL qui réagit contre l'épitope 125-160 de l'hPL, ce qui semble éliminer le fait que l'activité kinasique puisse être due à une contamination par une autre protéine.

La présence de 3 bandes séparées à l'électrophorèse s'explique par la dégradation probable de l'hPL au cours de la conservation.

On pourrait interpréter les résultats de la faible activité kinasique de l'hPL soit :

- en supposant que la caséine n'est pas un bon substrat,
- que cette activité est réellement faible, mais compensée par la très forte concentration de l'hPL au cours de la grossesse.

En utilisant un autre substrat qui est le lysat de lymphocytes, l'activité kinasique de l'hPL mesurée est supérieure à celle obtenue en présence de caséine, elle se rapproche de celle de la protéine kinase du coeur de boeuf testé sur ce même substrat. Cette expérience laisse supposer que l'hPL a bien une activité kinasique mais que nous ne connaissons pas son substrat spécifique.

L'activité kinasique est confirmée une deuxième fois par la mesure de l'activité en présence de quantités croissantes d'anticorps anti-hPL., on obtient une courbe d'inhibition de l'activité kinasique dépendante de la quantité d'anticorps présentes. L'inhibition est totale pour une concentration de 1 mg/ml..

On pourrait alors expliquer pourquoi la femme enceinte posséde une régulation "amortie" du métabolisme glucidique.

La figure 47 permet de comprendre comment les réactions de phosphorylation permettent de contrôler le métabolisme des glucides et des lipides chez la mère.

En effet, si on considère le métabolisme du glucide, on sait que la phosphorylase qui dégrade le glycogène en glucose 1P est activée par phosphorylation.

Par contre, la voie d'utilisation du glucose (la voie de la glycolyse) est inhibée lorsqu'il y a phosphorylation de la phosphofructokinase 1 et de la pyruvate kinase.

Donc le glucose libéré à partir du glycogène sera peu utilisé par la mère et pourra servir au foetus.

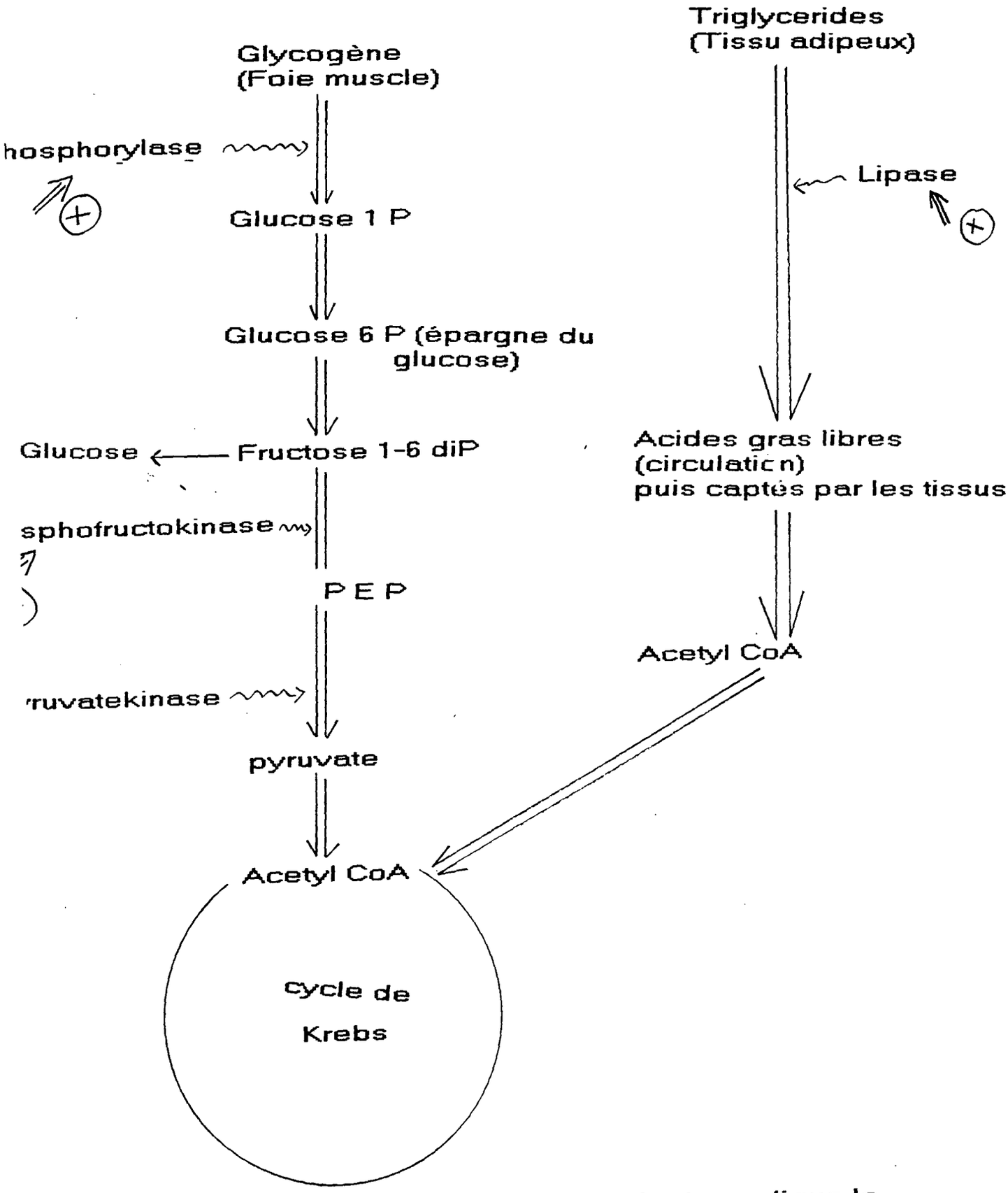
La mère, pour couvrir ses besoins énergétiques utilisera la voie de la lypolyse. En effet, la lipase du tissu adipeux est aussi activée par phosphorylation. Il y a donc une augmentation des AG circulants pouvant induire une résistance à l'insuline.

Puis ces AG seront captés par les tissus auxquels ils fourniront de l'énergie par la voie de la Beta oxydation.

L'activité kinasique faible de l'hPL amortirait les variations brusques du glucose nécessaire au foetus.

Chez la mère

UNIVERSITE de NANCY
BIBLIOTHEQUE
Section de Médecine



L'augmentation des acides gras circulants explique la résistance à l'insuline sur les cellules maternelles

V CONCLUSION ET PERSPECTIVES

UNIVERSITÉ de NANCY BIBLIOTHÈQUE Médecine

Le travail que nous avons entrepris comporte plusieurs parties :

1 - Fabrication d'anticorps monoclonaux anti-hPL.

L'obtention d'hybridome sécréteur et stable a permis de disposer d'un anticorps monoclonal de bonne affinité. Il a une constante d'association de 1,5 x 10^{12} l/mole. Dans la litterature, des constantes d'association de 1 x 10^{8} à 1 x 10^{12} l/mole sont rapportées. Après toute une série de démarches, nous avons déterminé l'épitope contre lequel l'anticorps monoclonal était dirigé.

Pour cerner la région de l'épitope, nous avons étudié la réaction antigène-anticorps dans des conditions variées :

. La coupure des ponts disulfure de l'hPL suivie d'une S-carboxyméthylation a mis en évidence la nature de continuité de l'épitope.

. L'hydrolyse de l'hPL par le bromure de cyanogène, suivie d'une séparation des peptides par chromatographie HPLC et HPEC nous a permis d'isoler le peptide ayant l'activité antigénique. Sa structure a été déterminée par séquençage. Il s'agit de la portion 125-169.

2 - Etude de la relation AMPc-hPL sur la réaction hPL-anti hPL.

Nous avons constaté que l'AMPc augmente la réaction hPL-anti hP. A partir de cette constatation, nous avons montré que l'AMPc se fixe sur l'hPL. Ceci a été démontré par dialyse à l'équilibre, et par chromatographie d'affinité sur gel agarose-AMPc. L'AMPc se fixent probablement sur le site ou près du site formant l'épitope, empêchant ainsi l'anticorps monoclonal de réagir avec l'hPL.
Il reste à déterminer la séquence d'acides aminés de l'hPL qui a une affinité avec l'AMPc.

Nous avons montré que l'hPL a une activité kinasique, elle permet de transférer un atome de phosphore vers une protéine réceptrice : la caséine. Cette activité kinasique est 10 fois plus faible que celle de la protéine kinase de référence (extraite du coeur du boeuf). L'activité kinasique de l'hPL est plus élevé lorsqu'on utilise comme substrat un lysat de lymphocytes.

UNIVERSITE de NANCY BIBLIOTHEQUE Faculté de Médecine

Nous avons montré que seule l'hPL est responsable de l'activité kinasique. En effet, nous n 'avons pas pu mettre en évidence par électrophorèse avec ou sans SDS de bande ne réagissant pas avec l'anticorps monoclonal anti hPL

.

- De plus, on constate une inhibition de l'activité kinasique de l'hPL par ajout de concentrations croissantes d'anticorps monoclonal anti-hPL jusqu'à inhibition totale de cette activité.

L'activité kinasique de l'hPL pourrait expliquer un moins en partie lles modifications métaboliques observées au cours de la grossesse avec une modification de la tolérance au glucose. L'activité kinasique faible observée semble être en relation avec les substrats utilisés, le substrat spécifique de l'hPL reste à déterminer. La découverte de l'activité kinasique éclaire d'un jour nouveau le rôle de cette hormone secrétée en quantité importante pendant la grossesse.

Résumé

L'objectif de ce travail a été dans un premier temps l'obtention d'anticorps monoclonaux anti-hormone lactogène placentaire. Pour remplir ce premier objectif, nous avons fabriqué des hybridomes souris-souris. Les anticorps produits ont été clonés, purifiés et la détermination de l'épitope spécifique des anticorps a été réalisée après coupure de l'hPL par le bromure de cyanogène, séparation des peptides obtenus par HPLC et séquençage des peptides purifés.

Dans un deuxième temps, nous avons montré que la réaction hPL-anti hPL était partiellement inhibée en présence d'AMPc (aucun effet de l'ATP GTP ou GMPc) et de l'hPL (aucun effet dans la réaction anticorps-hGH ou prolactine ou LH). Par dialyse à l'équilibre et chromatographie d'affinité, nous montrons qu'il y a bien une liaison AMPc-hPL. Les protéines liant l'AMPc ont habituellement une activité kinasique. En effet, en utilisant comme substrat soit la caséine, soit un lysat lymphocytaire, nous démontrons que l'hPL a une nette activité kinasique bien que cette activité soit faible, ce qui ouvre de nouvelles voies pour la compréhension du rôle de l'hPL dans le métabolisme de la femme enceinte.

VI REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

UNIVERSITÉ de NANCY BIBLIOTHÈQUE Section de Médecine

Allen M.J., Cleary S.F., Hawkridge F.M.
Antibodies affect the structure and function of ionic channels in a lipid membrane.
Proc. Int. Symp. 1989, 6 : 21-29.

Alonso-Whipple C., Couet M.L., Doss R., Kosiarz J., Ogunro E.A., Crowley W.F.
Epitope mapping of human luteinising hormone using monoclonal antibodies.
Endocrinology. 1988, 123 : 1854-1860.

Astwood E.B., Greep R.O.
A corpus Luteum stimulating substance in the rat placenta.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1938, 38 : 713-720.

Avest A.
Purification process monitoring in monoclonal antibodie preparation : contamination with viruses, DNA and peptide growth factors.
Biologicals, 1992, 20 : 177-186.

Bach J.F., Chatennoud L.
Anticorps monoclonaux anti-lymphocytes.
Biofutur., 1986, 44 : 59-64.

Barbier H.C., Teischer M.
L'hormone lactogène placentaire et la surveillance des grossesses à haut risque.
Entretien de Bichat-médecine. 1974, 369-372.

Barbier J.
Utilisation pratique des dosages d'hormone lactogène placentaire.
Entretien de Bichat, Gynécologie. 1977, 223-225.

Barrera-Saldana H.A., Robberson D.L., Saunders G.F.
Transcriptional products of the human placental lactogen gene.
J. Biol. Chem. 1982, 257 : 12399-12405.

Barrera-Saldana H.A., Seeburg P.H., Saunders G.F.
Two structurally different genes produce the same human placental lactogen hormone.
J. Biol. Chem. 1983, 258 : 3787-3793.

Barrett J., Golander A., Conn P.M., Handwerger S.
Characterisation and partial purification of a serum protein which stimulates the release of human placental in vitro.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 1986, 63 : 336-342.

Barsh G.S., Seeburg P.H., Gelinas R.E.
The human growth hormone gene family : structure and evolution of the chromosomal locus.
Nucleotiec. Acids. Res. 1983, 11 : 3939-3945.

Bazin H., Lemieux R.
Effect of the elapsed time after the final antigen boost on the specificity of monoclonal antibodies produced by B cell hybridomas.
J. Immunol. Methods 1988, 112 : 53-56.

Bazin H., Cormont F., De Clerq L.
Rat monoclonal antibodies. II. A rapide efficient method of purification from ascitic fluid or serum.
J. Immunol. Methods. 1984a, 71 : 9-16.

Bazin H., Xhurdebise L.M., Burtonboy G., Lebacq A.M., De Clercq L.
Rat monoclonal antibodies. I rapid purification from in vitro culture supernatants.
J. Immunol. Methods. 1984b, 66 : 261-269.

Beck P., Parker M.L., Daughaday N.H.
Radioimmunologic measurement of human placental in plasma by a double antibody method during normal and diabetic pregnancies.
J. Clin. Invest., 1967, 46 : 103-110.

Beck P., Daughaday W.H.
Human placental lactogen : studies of its acute metabolic effects and disposition in normal man.
J. Clin. Invest. 1965, 46 : 103-110.

Belleville F.
L'hormone somatomammotropine chorionique (HCS) : purification et études physico-chimiques. Variations de son taux en physiologie et en pathologie.
Thèse d'Etat en Pharmacie, 1972, Nancy.

Belleville F., Peltier A., Paysant P., Nabet P.
Isohormones : les formes moléculaires de l'hormone chorionique somatomammotropine humaine (HCS).
Path. Biol., 1976, 24 : 61-66.

Belleville F., Lasbennes A., Nabet P., Paysant P.
Etude de substances pouvant intervenir dans la régulation de la sécrétion de la somatomammotropine chorionique (HCS) in vitro par le placenta en culture.
C.R. Soc. Biol. (Paris) 1974, 168 : 1057-1061.

Belleville F., Lasbennes A., Nabet P., Paysant P.
HCS-HCG regulation in cultured placenta.
Acta Endocrinol. 1978, 88 : 169-181.

Belleville F., Lasbennes A., Nabet P., Paysant P
HCS regulation in cultured placenta : action of glucose.
Acta Endocrinol. 1979, 92 : 336-346.

Belleville F., Nabet P., Paysant P., Schweitzer A., Landes P.
Etude du taux en HCS du plasma et du liquide amniotique au cours de grossesses normales et pathologiques.
J. Gyn. Obst. Biol. Rep. 1974, 3 : 884-894.

Benjamin D.C., Berzofsky J.A., East I.J., Gurd F.R.N., Hannum C., Leach S.L., Margoliash E., Michael J.G., Miller A., Prager E.M., Reichlin M., Sercarz E.E.
The antigenic structure of proteins : a reappaisal.
Ann. Rev. Immunol. 1984, 2 : 67-73.

Berle P., Finsterwalder E. Apostolakis M.
Comparative studies on the effect of human growth hormone, human prolactin and human placental lactogen on lipid metabolism.
Horm. Metab. Res. 1974, 6 : 347-350.

Berzofsky J.A.
Intrinsic and extrinsic factors in protein antigenic structure.
Science 1985, 229 : 932-938.

Bewley T.A., Dixon J.S., Li C.H.
Sequence comparison of human pituirary growth hormone, human chorionic somatomammotropin and ovine pituitary and lactogenic hormone.
Int. J. Peptide Protein. Res. 1972, 4 : 281-287.

Bewley T.A., Li C.H.
Primary structures of human pituitary growth hormone and sheep lactogenic hormone compared.
Sciences 1970, 168 : 1361-1362.

Biggemann B.
Isolation and characterisation of monoclonal antibodies directed against different epitopes of type 1-like fimbriae from a multi fimmiated E. Coli, Strain.
Int. J. Med. Microbiol., 1990, 274 : 155-173.

Biswas S., Hindocha P., Dewhurts C.J.
Human chorionic somatomammotrophin in serum and urine in various stages of pregnancy : its correlation with enzymes and oestrogens.
J. Endocrinol. 1972, 54 : 251-259.

Bleicher S.J., O'Sullivan J.B., Scherrer J., Goldner M.C.
A lipid-mobilising substance in serum of pregnant women, of prolable placental origin.
Metabolism 1964, 13 : 583-591.

Boer M.D., Ossendorp F.A., Van Duijn G., Ten Voorde G.H.J. and Tager J.M.
Optimal conditons for the generation of monoclonal antibodies using primary immunisation of mouse splenocytes in vitro under serum-free conditons.
J. Immunol. Methods 1989, 121 : 253-260.

Boime I., Boothby M., Hoshina M., Mc Queen D.S., Darnell R.
Expression and structures of human placental hormone genes as a function of placental development.
Biol. Reprod. 1982, 26 : 73-91.

Bolanlander F.F., Fellows R.E.
Purification and characterization of bovine placental lactogen.
J. Biol. Chem. 1976, 251 : 2703-2708.

Borrebaeck C.A.K., Glad C.
Cross-reactivity of mouse monoclonal antibodies produced by in vitro or in vivo immunisation.
Eur. J. Immunol., 1989, 19 : 2885-2889.

Borri M.G., Casagli M.C., Antoni G., Neri P.
Interaction of human chorionic somatomammotropin monoclonal antibodies with fragments derived from the nicked from of the hormone.
Protides Biol. Fluids 1985, 33 : 619-622.

Botta R.M., Donatelli M., Bucalo M.L., Bellomonte M.L., Bompiani G.D.
Placental lactogen, progesterone, total estriol and prolactin plasma levels in pregnant women with insulin-dependent diabetes mellitus.
Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. 1984, 16 : 393-401.

Boyum A.
Separation of lymphocytes from blood and marrow.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 1968, 21 : 97-102.

Braustein G.D., Rasor J.L., Engrall E., Wade M.E.
Interrelationships of human chorionic gonadotropin, human placental lactogen, and pregnancy-specific beta 1-glycoprotein throughout normal human gestation.
Am. J. Obstet. Gynecol. 1980, 138 : 1205-1211.

Bruggermann M., Radbruch A., Rajewsky K.
Immunoglobulin V region variants in hybridoma cells. I. Isolation of a variant with altered idiotypic and binding specificity.
Emb. J. 1982, 1 : 629-634.

Bundle D.R., Gidney M.A.J., Kassam N., Rahman A.F.R.
Hybridomas specific for carbohydrates ; synthetis human blood group antigens for the production, selection and characterization of monoclonal typing reagents.
J. Immunol. 1982, 129 : 678-682.

Burchiel S.W., Billman J.R., Alber T.R.
Rapid and efficient purification of mouse monoclonal antibodies from ascites fluid using high performance liquid chromatography.
J. Immunol. Methods. 1984, 69 : 33-42.

Byatt J.C., Eppard P.J., Munyakazi L., Sorbet R.H., Veenhuizen J.J., Curran D.F., Collier R.J.
Stimulation of milk yield and feed intake by bovine placental lactogen in the dairy cow.
J. Dairy. Sci. 1992, 75 : 1216-1223.

Bywater R., Eriksson G.B., Torsten O.
Desorption of immunoglobulins from protein A-Sepharose CL-4B under mild condition.
J. Immunol. Methods 1983, 64 : 1-6.

Carlsson M. Hedin A., Ingaäs M., Härfast B., Blomberg F.
Purification of in vitro produced mouse monoclonal antibodies a two-step procedure utilising cation exchange chromatography and gel filtration.
J. Immunol. Methods 1985, 79 : 89-98.

Caufriez A., Frankenne F., Englert Y., Golstein J.
Placental growth hormone as a potential regulator of maternal IGF-I during human pregnancy.
Am. J. Physiol. 1990, 258 : 1014-1019.

Chan J.S.D., Robertson H.A., Friesen H.G.
The purification and characterisation of ovine placental lactogen.
Endocrinology. 1976, 98 : 1945-2950.

Chang K.J., Chatrecasas P.
Adenosine triphosphate dependent inhibition of insulin stimulated glucose transport in fat cells.
J. Biol. Chem. 1974, 249 : 531-540.

Chang T.H., Steplewsky Z., Koprowski H.
Production of monoclonal antibodies in serum free medium.
J. Immunol. Methods 1980, 39 : 369-375.

Chen E.Y., Liao Y.C., Smith D.H., Barrera-Saldana H.A., Gelinas R.E.
The human growth hormone locus nucleotide sequence, biology, evolution.
Genomics 1989, 4 : 479-485.

Chen L.J., Walsh D.A.
Multiple forms of hepatic adenosine 3' 5' monophosphate dependant protein kinase.
Biochemistry. 1971, 10 : 3614-3621.

Chêne N.
Relation structure-fonction d'hormone à activité lactogène et de croissance en vue d'applications à l'étude de la somatomammotrophine chorionique ovine (OCS).
Thèse de Doctorat d'Université 1987, Orsay.

Chiang M.H., Nicoll C.S.
Human placental lactogen inhibites growth without changing serum levels of IGF-1 in rats : zn apparent specific action of the hormone.
Acta. Endocrinol. 1992, 127, 146-151.

Chiang M.H., Kelly K.M., Nicoll C.S.
Human placental directly inhibits rat cartilage grwth processes in vivo and in vitro.
Acta. Endocrinol. 1993, 128, 65-68.

Chothia C.
The nature of the accessible and buried surfaces in proteins.
J. Mol. Biol. 1976, 105 : 1-12.

Cohen M., Haour F., Bertrand J., Dumond M.
L'hormone lactogénique placentaire (hPL), une nouvelle hormone chorionique.
Gynéc. Obstét. 1970, 69 : 197-217.

Cohen M., Dumont M., Bertrand J.
L'hCS au cours des grossesses normales et pathologiques.
Vie Méd. 1973, 10 : 1113-1122.

Contopoulos A.N., Simpson M.E., Bertrand J.
Growth promoting activity of pregnant rat plasma after hypophysectomy and after thyroidectomy.
Endocrinology. 1959, 64 : 1023.

Cooper C., Coll K.E., Williamson R.J.
Differencial effects of phorbol ester on phenylephrine and vasopressin-induced Ca^{++} mobilization in isolated hepatocytes.
J. Biol. Chem. 1985, 260 : 3281-3286.

Corthier G., Boschetti E., Charley-Poulains J.
Improved method for IgG purification from various animal species by ion exchange chromatography.
J. Immunol. Mehtods 1984, 66 : 75-79.

Coxam V, Davicco M.J., Relin J., Barlet J.P.
Growth hormone secretory patter anr somatomedin C plasma concentrations in newborn calves.
J. Dev. Physiol. 1987, 9, 113-121.

Creaven P.J., Stoll H.L.
Response to tumor necrosis factor in two cases of psoriasis.
J. Am. Acad. Dermatol. 1991,,, 22244 : 735-737.

Daffos F., Freund M.. Sarrot G., Zimmer R.
Intérêt des dosages de hCS au cours des grossesses compliquées de maladies vasculo-rénales.
Path. Biol. 1981, 6 : 384-385.

Daffos F., Freund M., Sarrot G., Chartier M.
Hypertension en cours de grossesse : définition, conduite à tenir.
La Revue de Médecine 1983, 14 : 639-642.

David R., Goodlett, Frank B., Johnathan R.C., Richard B., Breemen V.
Formylated peptides from cyanogen bromide digest identified by fast atom bombardment mass spectrometry.
Anal. Biochem. 1990, 186 : 116-120.

Debra A., Thompson, Gobing H.K.
Guanosine 3', 5'-cyclic nucleotide binding proteins of bovine retina identified by photoaffinity labeling.
Proc. Natl. Acad. Sci. 1990, 87 : 2201-2205.

Duckworth M.L., Kirk K.L., Friesen H.G.
Isolation and identification of cDNA clone of rat placental lactogen II.
J. Biol. Chem. 1986, 261 : 10871-10878.

Edwards M.S., Nicholson-Weller A., Baker C.J., Kasper D.L.
The role of specific antibody in alternative complement pathway-mediated opsnophagocytosis of type III. Group streptococcus.
J. Exp. Med. 1980, 151 : 12575-12587.

Ehrhardt K.
Über das lactations hormon des hypophysen-verderlappens.
Münich. Med. Wschr. 1936, 83 : 1163-1170.

Eisenbarth G.S.
Applications of monoclonal antibody techniques to biochemical.
Res. Anal. Biochem. 1981, 11 : 1-16.

Erez S., King T.M.
Anencephaly : a survey of 44 cases.
Obstet. Gynec. 1966, 27 : 601-604.

Florini J.R., Tonelli G., Breuer C.B., Coppola J., Ringler I., Bell P.H.
Characterisation and biological effect of purified placental protein (human).
Endocrinology. 1966, 79 : 692-708.

Fiddes J.C., Seeburg P.H., Hallewell R.A., Baxter J.D.
Structure of genes for human growth hormone and chorionic somatomammotropin.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1979, 76 : 4294-4298.

Franchimont P.
Présence d'une hormone de croissance dans le placenta.
Ann. Endocrinol. 1965, 23 : 346-355.

Franz A.G., Wilson J.D.
In : Williams textbook of endocrinology.
Wilson J.D. and Foster D.W. Eds. Saunders W.B. Co., Philadelphia, 1985, 402-408.

Freemak M., Comer M., Mularoni T., D'Ercole A.J., Grandis A., Kodack L.
Placental lactogen receptors in maternal sheep liver : effects of fasting and refeeding.
Am. J. Physiol. 1990, 258 : 334-346.

Friesen H.G.
Purification of a placental factor with immunological and chemical similary to human growth hormone.
Endocrinology. 1965, 76 : 369-375.

Friesen H.G.
The role of prolactine in breast cancer;
Recent. Result. Cancer. Res. 1976, 57 : 143-149.

Fukushima M.
Studies on somatotrophic hormone secretion in gynecology and obstetrics.
TONOKU, Jpn, Exp-Med. 1961, 74 : 161-173.

Garcia T., Buchou T., Renoir J.M., Mester J., Baulieu E.E.
A protein kinase copurified with chick oviduct progesterone receptor.
Biochemistry. 1986. 25. 7937-7942.

Garren L.D., Gill G.N., Walton G.M.
The isolation of a receptor for adenosine 3' 5' cyclic monophosphate from the adrenal cortex : the role of the receptor in the mechanism of action of cAMP.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 1971, 185 : 210-226.

Gaspard U.
Les hormones protéines placentaires.
Ed. Masson, Paris New-York Barcelone Milan, 1980.

Gaspard U., Franchimont P.
Variations sécrétoires des hormones polypeptidiques placentaires en culture de tissu.
C.R. Acad. Sci. Clin. 1972, 275 : 1661-1665.

Gluckman P.D., Brinsmead M.W.
Somatomedin in card blood : relationship to gestational age and birth size.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 1976, 43, 1378-1381.

Gluckman P.D., Barry T.N.
Relation between plasma concentrations of placental lactogen, insulin-like growth factors, metabolites and lamb in late gestation ewes subject to nutritional supplementation and their lambs at birth.
Domest. Anim. Endocrinol. 1988, 5 : 209-217.

Godberg N.D., Haddox M.K.
Cyclic GMP metabolism and involvement in biological regulation.
Am. Rev. Biochem. 1977, 46 : 823-896.

Goding J.W.
Antibody production by hybridomas.
J. Immunol. Methods 1980, 39 : 285-305.

Golander A., Barrett J.R., Tyret L., Fletcher W.H., Handwerger S.
Differencial synthetis of human placental and human chorionic gonadotropin in vitro.
Endrocrinology. 1978, 102 : 597.

Gomez C.M., Richman D.P., Berman P.W., Burres S.A. Arnason B.G., Fitch F.W.
Monoclonal antibodie against purified nicotinic acetycholine receptor.
Biochem. Biophysic. Res. Commun. 1979, 88, 575-582.

Gomez-Puyou A., Tuena de Gomez-Puyou M., de Meis L.
Synthetis of ATP by soluble
Biol. chem. 1985, 258 : 13673-13679.

Goodmann A.D., Tanenbaum R. and Rabinowitz D.
Existence of two forms immunoreactive growth hormone in human plasma.J. Clin. Endocrinol. Metab. 1972, 35 : 868-878.

Gottesman M.M.
Genetic approches to cyclic AMP effects in cultured mammalian cells.
Cell. 1980, 22 : 329-330.

Graf L., Li C.H., Jibson M.J.
Human somatotropin. Selection removal trypsin of residues 135-145 from the hormone molecule with no loss of biological activities.
J. Biol. Chem. 1982, 257 : 2365-2369.

Grandis A., Jorgensen V., Kodack L., Handwerger S.
High density lipproteins (HDL) stimulate placental lactogen secretion in pregnant ewes : further evidence for a role of HDL in placental lactogen secretion during pregnancy.
J. Endocrinol. 1989, 120 : 423-430.

Greenwood F.C., Hunter W.N.
The preparation of ^{131}I-labelled human growth hormone of high specific radioactivity.
Biochem. J. 1963, 89 : 114-123.

Grumbach M.M., Kaplan S.L., Sciarra J.J., Burr I.M.
Chorionic growth hormone-prolactine (CGP) : secretion disposition-biologic activiy in man and postulated function as the "growth hormone" of the second half of pregnancy.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 1968, 148 : 501-531.

Grumbach M.M., Kaplan S.L., Vinik A.
Human chorionic somatomammotropin (HCS) 2 : physiology : hormonal effects.
Methods in investigative and diagnostique endocrinology. 1973, S.A. Berson and R.S. Yalow (ed.) North Holland, Amsterdam, 797.

Gurney M.E.
Human immunodeficiency virus (HIV)-related antigens and antibodies.
Cl. C07K7\08. 1989.

Haddox M.K., Newton N.E., Hartle D.K., Goldberg N.D.
ATP (mg^{2+}) induced inhibition of cyclic AMP reactivity with a skeletal muscle protein kinase.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 1972, 47 : 653-661.

Handwerger S., Maurer W., Barrett J., Hurley T., Fellows R.E.
Evidence for homology between ovine and human placental lactogen.
Endocrinol. Res. Commun. 1974, 1 : 403-413.

Handwerger S., Michael C.P., Barrett J., Barry S., Golander A.
Human placental lactogen release in vitro : paradoxial effect of calcium.
Am. J. Physiol. 1981, 240 : 550-555.

Handwerger S., Barrett J., Quarfordt S.
Apolipoproteins AI, AII and CI stimulate placental lactogen release from human placental tissue : a novel action of HDL apolipoproteins.
J. Clin. Invest. 1987, 79 : 625-671.

Haour F., Cohen M., Bertrand J.
Radioimmunoassay of human chorionic somatomammotropin ; plasma levels in normal and abnormal pregnancies.
Rev. Europ. Etudes. Clin. et Biol. 1971, 16 : 124-130.

Houslay M.D., Griffith S.J.., Horton Y.M.
Regulation of intracellar cyclic AMP concentration in hepatocytes in volves the integrated activation and desensitization of adenylyl cycalase compled with the action phosphodiesterase.
Biochem. Soc. Trans. 1992, 20. 140-146.

Herlyn M., Steplewski Z., Herlyn D., Koprowski H.
Colerectal carcinoma-specific antigen : detection by means of monoclonal antibodies.
Proc. Natl. Acad. USA 1979, 76 : 1438-1452.

Hirt H., Kimelman J., Birnbaum M.J., Chen E.Y., Seebourg P.H., Eberhardt N.L., Barta A.
The human growth hormone gene locus, structure, evolution, allelic variations.
DNA 1987, 6 : 59-64.

Hopp T.P., Woods K.R.
Prediction of protein antigenic determinants from amioacid sequences.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1981, 78 : 3824-3838.

Horstmann B.J.
Purification of anti-paraquot monoclonal antibodies by affinity chromatography on immobilised hapten.
J. Chromatogr. 1990, 516 : 433-441.

Hurley T.W., handwerger S., Fellows R.E.
Isolation and structural characterisation of bovine placental lactogen.
Biochemistry. 1977, 16 : 5598-5604.

Issitt P.D.
The impact of monoclonal antibodies in blood serology.
Transfusion 1989, 29 : 58-64.

Ito Y., Higashi K.
Studies on the prolactine-like substance in human placenta. II.
Endocrinol. Jpn 1961, 8 : 279-287.

Ivanyi J., Davis P.
Monoclonal antibodies against human growth hormones.
Mol. Immunol. 1980, 17 : 287-290.

Jaime S., Francisco S., Olga F., Carmelo B., Gloria M., José C.
Quantitative measurement of human immunoglobulin E using monoclonal antibodies distinct epitopes.
Immunol. Methods 1986, 90 : 71-76.

Jalkanen M., Jalkanen S.
Immunological detection of proteins after isoelectric focusing in thin layer agarose gel : a specific application for the characterisation of immunoglobulin diversity.J. Clin. Lab. Immunol. 1983, 10 : 225-228.

Jeffrey R., James K.H., Derr D., August J.T.
A high-performance liquid chromatographic procedure for the purification of mouse monoclonal antibodies.
Anal. Biochem. 1985, 145 : 451-454.

Josic D.
Purification of monoclonal antibodies by hydroxylapatite HPLC and size exclusion HPLC.
Biol. Chem. Hoppe. Seyler, 1991, 372 : 149-156.

Josimovich J.B., Mac Laren J.A.
Presence in the human placenta and term serum of a highly lactogenic substance immunologicaly reltated to pituitary growth hormone.
Endocrinology. 1962, 71 : 209-220.

Josimovich J.B., Atwood B.L., Goss D.A.
Luteotrophic, immunologic and electrophoretic properties of human placental lactogen.
Endocrinology. 1963, 73 : 410-414.

Josimovich J.B.
The human placental lactogen.
Clin. Endocrinol. 1968, 48 : 1968.

Jost A.
Action du proprionate de testosterone sur la gestation chez la souris.
C. R. Soc. Biol. 1947, 139 : 483-484.

Juronen E.
FPLC purification of mouse monoclonal antibodies from ascitic fluid using blue DEAE and thiolphilic sorbents.
J. Immunol. Methods 1991, 136 : 151-157.

Kalkhoff R.K., Kissebah A.H., Kim H.J.
Carbohydrate and lipid metabolism during normal pregnancy : relationship to gestational hormone action, in Merkatz IR, Adam PAF (Eds).
The diabetic pregnancy : a Perinatal Perspective. 1979, 3-21.

Kaplan S.L., Grumbach M.M.
Immunoassay for human chorionic "growth hormone prolactin" in serum and urine.
Sciences 1965, 147 : 751-753.

Kaplan S.L., Gurpide E., Sciarra J.J., Grumbach M.M.
Metabolitic clearance rate, production rate of chorionic growth hormone-prolactin in late pregnancy.
J. Clin. Endocrinol. Metab 1968, 28 : 1450-1455.

Katada T., Gilman A.G., Watanabe Y., Bauer S., Jakabs K.H.
Protein kinase C phosphorilates the inhibitory guanine- nucleotide-bindine regulatory component and apparently suppresses is function in the hormonal inhibition of adenylate cyclase.
Euro. J. Biochem. 1985, 151, 431-437.

Kelly P.A., Tshushima T., Shiu R.P.C., Friesen H.G.
Lactogenic and growth hormone-like activities in pregnancy determined by radioreceptor assays.
Endocrinology. 1976, 99 : 765-774.

Khvedchenia E.L., Vigdorovich I.P., maravenko M.V., Moroz I.N.
Radioimmunologicheskoc operedelenie plasertrogo laktogena choleveka naborom reaktivovo Rio-PL-1251.
Probl. Endokinol. (Mosk) 1990, 36 : 33-37.

Köhler G., Milstein C.
Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefinited specificity.
Nature 1975, 256 : 495-497.

Köhler G., Shulman M.J.
cellular and molecular restrictions of the lymphocyte fusion.
Curr. Top. Microbiol. Immunol. 1978, 81 : 143-148.

Konisberg W.
reduction of disulfure bonds in proteins with dithiothreitol. In : Methods in Enzymology. XXV enzyme structure.
Part. B. Ed Chw Hirs and S.N. Timasheff. Academic Press New-York and London : 1972, 185-188.

Kovacic C.
Comparaison of human placental lactogen and serum pituitary growth hormone by the mouse luteotrophic assay.
J. Endocrinol. 1966, 35 : 25-32.

Kyte J., Doolittle R.T.
a simple method for displaing the hydropathic character of a protein.
J. Mol. Biol. 1982, 157 : 105-132.

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

Lai W.H., Guida H.J.
Characterisation and regulation of epidermal growth factor receptors in human placental cell cultures.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 1984, 58 : 344-352.

Lane R.D., Crissman R.S., Ginn J.
High efficiency fusion procedure for producing monoclonal antibodies against weak immunogens.
Academic Press London, 1986, 121 : 182-192.

Lasbennes-Pechard A.
Thèse de Docteur en Biochimie. Université de Nancy I, 1977.

Lasbennes A., Pereira A., Gasmi A., Belleville F., Paysant P., Nabet P.
Complete in vitro system for the study of hPL biosynthesis and regulation.
Mise à part 1985/01.

Lasbennes A., Belleville F., Paysant P., Nabet P.Rôle du glucose dans la régulation de la sécrétion de l'hormone lactogène placentaire (hPL).
C.R. Soc. Biol. 1977, 171 : 424-428.

Lassare C., Hardouin S., Daffos F., Forestier F., Frankenne F., Binoux M.
Serum insulin-like growth factors and insulin-like growth factor binding proteins in the human fetus. relationships with growth in normal subjects and in subjects with intrauterine growth retardation.
Pediatr. Res. 1991, 29 : 219-225.

Leake N.J., Burt R.L.
Effect of hPL and pregnancy on glucose uptake in rat adipose tissue.
Am. J. Obstet. Gynecol. 1969, 103 : 39-45.

Leonard S.L.
The relation of the placenta to the growth of the mammary gland of the rat during the last half of pregnancy.
Anat. Rec. 1945, 91 : 65-70.

Letchworth A.T., Chard T.
Placental lactogen levels of human as screening test for fetal distress and neonatal asphyxia.
Lancet 1972, 1 : 704-708.

Levitt J.
J. Mol. Biol. 1976, 104 : 59-107.

Li C.H., Dixon J.S., Chung D.
Primary structure of the human chorionic somatomammotropin (hCS) molecule.
Science 1971, 173 : 56-57.

Li C.H., Grumbach M.M., Kaplan S.L., Josimovich J.B. and coll.
Human chorionic somatomammotropin (hCS) proposed terminology for designation of placental hormone.
Experientia 1968, 24 : 1288-1294.

Lilford R.J., obiekwe B.C., Chard T. Maternal blood levels of human placental lactogen in the prediction of fetal growth retardation : choosing a cut-off point between normal and abnormal.
Br. J. Obstet. Gynecol. 1983, 90 : 511-515.

Linvingston D.M.
Immunoaffinity chromatography of proteins.
Methods enzymol. 1974, 34 : 723-731.

Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.
Protein measurement with the folin phenol reagent.
J. Biol. Chem. 1951, 193 : 265.

Luthman M., Bremme K., Jonsdottir I., Hall K., Roos P., Werner S.
Serum levels and molecular sizes of growth hormone during pregnancy in relation to levels of lactogen, insulin-like growth factor I and insulin-like growth factor bir ding protein-1.
Gynecol. Obsted. Invest. 1991, 31 : 67-73.

MacWilliams D., Callahan R.C., Boime I.
Human placental lactogen mRNA and its structural genes during pregnancy : quantification with a complementary DNA.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1977, 74 : 1027-1037.

Majumder G.C., Turkington R.W.
Hormonal regulation of protein kinases and adenosine 3', 5' monophosphate-binding protein in developing mamary gland.
J. Biol. Chem. 1971, 246 : 5445-5454.

Malm B.
A method suitable for the isolation of monoclonal antibodies from large volumes of serum-containing hybridoma cell culture supernatants.

Mancini G., Vaerman J.P., Carbonara A.O., heremans J.F.
Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion.
Immunochemistry 1965, 2 : 234-240.

Mariani M., Neri P., Cianfriglia M., Armellini D., Barbarulli G., Antoni G.
Characterisation of monoclonal antibodies agains human chorionic somatomammotropin : competitive screening and determination of the affinity constants.
J. Immunol. Methods 1984, 71 : 43-48.

Martal J.A.
L'hormone lactogène placentaire ovine.
Thèse Doctorat ès-Sciences, Université Paris-Orsay, 1980.

Martal J.A., Djiane J.
Purification of a lactogenic hormone in sheep placenta.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 1975, 65 : 770-778.

Martal J.A., Djiane J.
Mammotrophic and growth promoting activities of a placental hormone in sheep.
J. Steroid. Biochem. 1977, 8 : 415-417.

Martal J.A.
L'hormone lactogène placentaire ovine. Purification et propriétés physicochimiques, immunologiques et biologiques. Etudes de son rôle dans les mécanismes de contrôle de la gestation.
Thèse de Doctorat ès-Sciences d'Etat en Biologie, 1982.

Martial J.A., Hallewell R.A., Baster J.D., Goodman H.M.
Human growth hormone : complementary DNA cloning and expression in bacteria.
Science 1979, 205 : 602-607.

Mattera R., Turyn D., Fernandez H.J., Dellacha J.M.
Structural characterisation of iodinated bovine growth hormone.
Int. J. Peptide Protein Res. 1982, 19 : 172-180.

Maugras M., Janot C., Dush M., Pfister M., Streiff F., Stoltz J.F.
Préparation d'anticorps monoclonaux anti-A et anti-B (système ABO).
Clin. Biol. Nancy 1987, 26 : 427-429.

Means A.R., mac Doogall E., Soderling T.R., corbin J.D.
testicular adenosine 3' 5' monophosphate dependent protein kinase. Regulation by follicule stimulating hormone.
J. Biol. Chem. 1974, 249 : 1231-1237.

Miller W.L., Eberhardt N.L.
Structure and evolution of the growth hormone gene family.
Endocrinology 1983, 4 : 97-130

Minna J.D., Bunn P.A., Carney D.N., Cohen M.H., Cuttita F., Fosieck B.E., Gasdar A.F., Inde D.C., Johnson-Earty A., Marthews M.J., Makuch R., Oie H., Rosen S., Lichter A., Glatstein E.
Experience of the National Cancer Institute (USA) in the treatement and biology of small cell long cancer.
Bull. Cancer (Paris) 1982, 69 : 83-93.

Mitchell G., Scott, D.L., Crimmins, David W., Mac Court, J.J., Tarrand M.C.
A simple in situ cyanogen cleavage method to obtain amino acid sequence of proteins electroblotted to polyvinyldifluoride membranes.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 1988, 155 : 1353-1359.

Murad F., Arnold W.P., Mittal C.K., Braughler J.M.
Properties and regulation of guanylate cyclase and some proposed functions of cyclic GMP.
Adv. Cyclic. Nucleotide Res. 1979, 11 : 175-204.

Natalio V., Edgardo P., Clara P., Ana R.
Epitopes in human growth hormone and chorionic somatomammotropin studied with monoclonal antibodies.
Arch. Biochem. Biophys. 1983, 225 : 436-445.

Neoh S.H., Gordon C., Potter A., Zola H.
The purification of mouse monoclonal antibodies from ascitic fluid.
J. Immunol. Methods 1986, 91 : 231-235.

Neri P., Antoni G., Barbarulli G., Casagli C., Mariani M., Nencioni L.
Identification and synthesis of an antegenic determinant common to human chorionic somatomammotropin and human growth hormone.
Mol. Immunol. 1984, 21 : 151-157.

Niall H.D., Hogan M.L., Sayer R., Rosenblun I.Y., Greenwood F.C.
Sequences of pituitary and placental lactogenic and growth hormones : evolution from a primordial peptide by gene reduplication.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1971, 68 : 866-869.

Nickel B.E., Cattini P.A.
Tissu-specific expression and thyroid hormone regulation of endogenous placental growth hormone variant and chorionic somatomammotropin genes in a human choriocarcinoma cell line.
Endocrinology. 1990, 128 : 2353-2359.

Nozaki Y., Tanford C.
The solubility of amino acids and two glycine peptides in aqueous ethanols and dioxane solutions.
J. Biol. chem. 1971, 246 : 2211-2217.

Okuno Y., Isegawa Y., Sasao F., Veda S.
A common neutralising epitope conserved between the hemagglutinins of influenza A virus H_1 and H_2 strains.
J. Virol. 1993. 67, 2552-2558.

Oprandy J.J., Long G.W.
Processing and microfiltration of mosquitoes for malaria antigen detection in a rapid dot immunobinding assay.
J. Clin. Microbiol. 1989, 28 : 1701-1703.

Ozturk S.S., Palsson B.O.
Effect of initial cell density in hybridoma growth, metabolism and monoclonal antibody production.
J. Biotechnol. 1990, 18 : 13-18.

Peery G.A., Jackson J.D., Mac Donald T.L., Crouse D.A., Sharp J.G.
Purification of monoclonal antibodies using high performance liquid chromatography (HPLC).
Prep. Biochem. 1984-85, 14 : 431-447.

Pelmont J., Tournesac C., Mliki A., Barrelle M., Beguin C.
A new bacterial alcohol dehydrogenase active on degraded lignin and several low molecular weigth aromatic compounds.
FEMS. Microbiol. Lett. 1989, 48, 109-113.

Polliotti B., Meuris S., Lebrun P., Robyn C.
Stimulatory effects of extracellular calcium on chorionic gonadotrophin and placental lactogen release by human placental explants.
Placenta 1990, 11 : 181-190.

Pontecorvo G.
Symposium n°19 : Somatic cell genetics.
Genetics. 1975, 79, 339-341.

Rathjen D.A., Cowan K., Furphy L., Aston R.
Antigenic structure of human tumor necrosis factor : recognition of distinct regions of TNF alpha by different tumor cell receptors.
Mol. Immunol. 1991, 28 : 79-86.

Reddy S., Watkins W.B.
Uptake of 125-I labelled human placental lactogen and human placental by the tissues of normal and lactatings rats.
J. Endocrinol. 1975, 65 : 183-194.

Reimann E.M., Walsh D.A., Krebs E.G.
Purification and properties of rabbit skeletal muscle adenosine 3' 5' monophosphate dependent protein kinases.
J. Biol. Chem. 1971, 246 : 1984-1993.

Reinhard W., Oppermann M., Ziez R., Baumgarten H., Götze O.
Determination of epitope specificities of monoclonal antibodies using unprossed supernatants of hybridoma cultures.
J. Immunol. Methods 1990, 126 : 231-237.

Richards R.G., Basavappa S., Rogers D.
Long-term effects apolipoprotein AI on the synthesis and release of placental lactogen from human trophoblast cells.
Presented at the 72nd Annual Meeting of the Endocrine Society, Atlanta, GA, 1990, p 115 (Abstract 363).

Riggi S.J., Bochart C.R., Ball P.H., Ringer I.
Some effects of purified placental protein (human) on lipid and carbohydrate metabolism.
Endocrinology. 1966, 79 : 709-712.

Ritz J., Pesando J.M., Notis M.C., Conarty J., Lazarus H., schlossman S.F.
A monoclonal antibody to human ascite lymphoblastic leukaemia antigen.
Nature 1980, 283 : 583-585.

Robertson M.C., Friesen M.G.
The purification and characterization of rat placental lactogen.
Endocrinology. 1975, 97 : 621-629.

Rogers B.L., Sobosky M.G., Saunders G.F.
Transcriptional enhancer within the human placental lactogen and growth hormone multigen cluster.
Nucleic. Acids Res. 1986, 14 : 7647-7652.

Roskam W.C., Rougeon F.
Molecular cloning and nucleotide sequence of the human growth hormone structural gene.
Nucleic. Acids Res. 1979, 7 : 305-320.

Russel T.R., Terasaki W.L., Appleman M.N.
Separates phosphodiesterases for the hydrolysis of cyclic AMPc and GMP in rat liver.
J. Biol. Chem. 1973, 248 : 1334-1340.

Samaan N., Yen S.C.C., Friesen-Pearson O.H.
Serum placental lactogen levels during pregnancy and in trophoblastic disease.
J. Clin. Endocr. Metab. 1970, 26 : 1303-1308.

Sakbun V., Ali S.M., Jara C.S., Bryant-Greenwood G.D.
Immunocytochemical localization and messenger ribonucleic acid concentrations for human placental lactogen in amnion, chorion, decidua, and placenta.
Am. J. Obstet. Gynecol. 1990, 165 : 1310-1317.

Saxema B.N., Emerson J.K., Selenkow U.A.
Serum placental (hPL) levels as an index of placental function.
New Engl. J. Med. 1969, 281 : 225-231.

Scherwood L.M., Handwerger S., McLaurin W.D., Lanner M.
Amino-acid sequence of human placental lactogen.
Nature (London) 1971, 233 : 59-61.

Sciarra J.J., Kaplan S.L., Grumbach M.M.
Localisation of anti-human growth hormone serum within the human placenta. Evidence for a human chorionic "growth hormone prolactin".
Nature (London) 1968, 199 : 1005-1006.

Sciarra I.I., Sherwood L.M., Varma A.A., Lindberg W.B.
Human placental lactogen and placenta weight.
Am. J. Obst. 1968, 101 : 413-416.

Shine J., Seeburg P.H., Martial J.A., Baxter J.D., Goodman H.M.
Construction and analysis of recombinant DNA for human chorionic somatomammotropin.
Nature (London) 1977, 270 : 494-499.

Schneider A.B., Kowalski K., Sherwood L.M.
"Big" human placental lactogen : disulfide linked peptide chains.
Bioch. Biophys. Res. Commun. 1975, 64 : 717-724.

Seeburg P.H., Shine J., Martial J.A., Ulrich A., Baxter J.D., Goodman H.M.
Nucleotide sequence of part of the gene for human chorionic somatomammotropin : purification of DNA complementary to predominant mRNA species.
Cell. 1977, 12 : 157-163.

Seley H.A., Varma K., Youger D., White P., Emerson Jr K. The effect of hypophysectomy upon pregnancy an lactation.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1933, 30 : 143-148.

Selvanayagam D., Thampi L.R., Durairaj A., Devarajan T.V., Thiruvengadam K.V.
Multiple origins of transcription for the human placental lactogen genes.
J. Biol. Chem. 1984, 259 : 14642-14646.

Shoji S., Ericsson L.H., Walsh K.A., Fischer E.H., Titani., K.
Amino acid sequence of the catalytic of bovine type II adenosine cyclic 3', 5'-phosphate dependent protein kinase.
Biochemistry. 1983, 22, 3702-3709.

Singh R.N.P., Seavey B.K., Lewis L.J., Lewis V.J.
Human growth hormone peptide 1-43, isolation from pituitary glands.
J. Protein. Chem. 1983, 2 : 425-436.

Smal J., Closset J., Hennet G., De Meyts P.
The receptor binding properties of the 20K variant of human growth hormone explain its discreptan insulin-like and growth promoting activities.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 1986, 134 : 159-165.

Smilek D.E., Boyd H.C., Wilson D.B., Zmijewski C.M., McKearn T.J.
Monoclonal rat anti-major histocompatibility complex antibodies display specifity for rat, mouse, and human trajet cells.
J. Exp. Med. 1980, 151 : 1139-1150.

Sokolov B.P., Sher B.M., Kalinin V.N.
Modified method for peptide mapping of collagen chains using cyanogen bromid-cleavage of protein within polyacrylamide gels.
Anal. Biochem. 1989, 176 : 365-367.

Spellacy W.N.
Dynamics of human placental lactogen.
Am. J. Obstet. Gynecol. 1966, 96 : 1164-1173.

Spellacy W.N.
Immunoassay of human placental : physiological studies in normal an abnormal pregnancy. In lactogenic hormones - Ciba symposium foundation - Ed. Churchill, Livingstone 1972, 223-239.

Spellacy W.N.
Human placental lactogen (hPL). The review a protein hormone important to obstetrics and gynecology.
South. Med. J. 1969, 62 : 1054-1057.

Spellacy W.N., Teon E.S., Buhi W.C., Birk S.A., MacCreary S.A.
Control of HCS levels during pregnancy.
Obstet. Gynecol. 1971, 37 : 567-573.

Spellacy W.N., Teoh E.S., Buhi W.C., Birk S.A., McCreary S.A.
Value of human chorionic somatotropin in managing high risk pregnancies.
Am. J. Obstet. Gynecol. 1971, 1097 : 588-598.

Spellacy W.N., buhi W.C., Birk S.A.
hPL levels in multiple pregnancies.
Obstet. Gynecol. 1978, 52 : 210-211.

Tao M.
Dissociation of rabbit red blood all cyclic AMP dependent protein kinase by protamine.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 1972, 46 : 56-61.

Tao M., Salas M.L., Lipmann F.
Mechanism of activation by adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate of a protein phosphokinase from rabbit reticulocytes.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 1970, 67 : 408-414.

Takahashi K., Yoshino T., Hayashi K.
S-100 beta positive humain T lymphocytes : their characteristics anc behavior under normal and pathologic conditions.
Blood. 1987, 70 : 214-220.

Taylor S.S., Bubis J., Tonner-Webb J., Saraswat L.D., First E.A., Buechler J.A., Knighton D.R., Sowadski J.
C AMP=dependent protein kinase: prototype for a family of enzymes.
FASEB. J. 1988, 2, 2677-2685.

Tison J.E., Barnes A.C., Merimee T.J., MacKusick V.A.
Isolated growth hormone deficiency : studies pregnancies.
J. Clin. Endocrinol. 1971, 31 : 147-152.

Topper Y.J.
Multiple hormone interactions in the development of mammary gland in vitro.
Recent. Prog. Horm. Res. 1970, 26 : 287-308.

Tu Y., Yang H.
Preparation of and study monoclonal antibodies against ovine follicle-stimulating hormone.
Baiquien. Yike. Daxue. Xuebao. 1991, 16, 425-428.

Tuniping A.H.
Preparation and study of monoclonal antibodies against ovine follicle-stimulating hormone.
Baiquen. Yike. Daxue. Xuebao 1990, 16 : 425-428.

Turkington R., Topper Y.
Stimulation of casein synthesis and histological development of mammary gland by human placental lactogen in vitro.
Endocrinology. 1966, 79 : 175-181.

Turtle J.R., Kipnis D.M.
Lipolitic action of human placental lactogen on isolated fat cells.
Biochim. Biophys. Acta 1976, 144 : 583-589.

Ulrich K., Lucia W., Christoph W.
Determination of epitope specificities and affinities of monoclonal antibodies in solution phase using biotin-labelled carcinoembryonic antigen and avidin as precipitating agent.
J. Immunol. Methods 1989, 117 : 25-32.

Umeda M.
Monoclonal anti-phospholipid antibody. Structure and function.
Tanpakushitsu. Kahusan. Koso. 1991, 36 : 506-515.

Underwood P.A., Bean P.A.
Hazards of the limiting dilution method of cloning hybridomas.
J. Immunol. Methods 1988, 24 : 119-128.

Vanhell H., Brands J.A.M., Bosch A.M.G., Van Weenen B.K., Schuurs A.M.W.M.
dosage enzymo-immunologique (EIA) de l'hPL et des estrogènes totaux pour la surveillance de grossesse à haut risque.
4ème Colloque "Biologie Perspective". 2-7 octobre 1978, Pont-à-Mousson.

Vanhell H., Brands J.A.M., schuurs A.M.W.M.
Enzyme immuno-assay of human placental lactogen.
Clin. Chim. Acta 1979, 91 : 309.

Van Regenmortel M.H.V.
Synthetic peptides and monoclonal antibodies in immunoassays : protein structure and antigenicity.
Nucl. Med. Biol. 1987, 14 : 227-280.

Vuillemin-Gelot M.A.
Contribution à l'étude du rôle de l'AMPc dans le placenta humain.
Thèse de spécialité, Nancy 1975.

Walker W.H., Fitzpatrick S.L., Barrera-Saldana H.A., Resendes-Perez D., Sauders G.F.
Transcriptional regulation of human placental lactogen genes.
Endocrinol. Rev. 1991, 12 : 00-08.

Wallis M., Cadman H.F.
Receptors for somatotropin (growth hormone) and prolactine.
Biochem. Soc. Trans. 1981, 9 : 33-35.

Walsh D.A., Ashby C.D., Gonzales C., Calkins D., Fischer E.H., Krebs E.G.
Purification and characterization of a protein inhibitor of adenosine 3' 5' monophosphate dependent protein kinase.
J. Biol. Chem. 1971, 246 : 1977-1985.

Walsh D.A., Perkins J.P., Krebs E.G.
An adenosine 3' 5' monophosphate dependent protein kinase from rabbit skeletal muscle.
J. Biol. Chem. 1968, 10 : 3614-3621.

Warren W.C., Keisler D.H., Anthony R.V.
Synthesis and secretion of ovine placental lactogen and its biochemical properties.
Domest. Anim. Endocrinol. 1990, 7 : 331--342.

Wasserman R.L., Capra J.D.
Primary structure of the variable regions of the canine immunoglobulin heavy chains.
Biochemistry. 1977, 16 : 3160-3168.

White J.W., Sobnosky M., Rogers B.L., Walker W.H., Saunders G.F.
Nucleotide sequence of a transcriptional enhancer located 2.2 kb "4 of a human placental lactogen-encoding gene.
Gene Dev. 1989, 84(2) : 521-522.

Willi J., Larry D., Gavin E., Robert L., Richard J.
Internal amino acid sequence of proteins by in situ cyanogen bromide cleavage in polyacrylamide gels.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 1990, 166 : 139-145.

Williams C., Coltart T.M.
Adipose tissue metabolism in pregnancy : the lipolytic effect of human placental lactogen.
Br. J. Obstet. Gynecol. 1978, 85 : 43-46.

UNIVERSITÉ BIBLIOTHÈQUE Section de Médecine

Yen S.C.C.
Endocrine and other evaluations of the foetal environment : the endocrinology of prenancy.
In : Creasy R.K., Resnik R. (eds) Maternal-fetal Medicine : Principal and Practrice. WB Saunders Co, Philadilphia, p 343.

Zhu Z., Yang C., Chen Z.
Preparation of a monoclonal antibody (HI30) mitomycin C conjugate utilising dextran T-40 and its specific cytotoxicity against human leukemia cell line CEM.
Zhonggo. Yixue. Kexueyuan. Xuebao. 1990, 12 : 274-280.

VII ANNEXES

UNIVERSITÉ de NANCY
BIBLIOTHÈQUE
Section de Médecine

HUMAN PLACENTAL LACTOGEN IS A cAMP DEPENDANT PROTEIN KINASE

H. Maazouzi, M.A. Gelot, B. Dousset, K. Hess, F. Belleville*
and P. Nabet

Laboratory of Medical Biochemistry I and I.B.N.
School of Medicine - P.O. Box 184
F. 54505 VANDOEUVRE-CEDEX FRANCE

* To whom correspondence should be sent.

UNIVERSITÉ de NANCY BIBLIOTHÈQUE Section de Médecine

Human placental lactogen (hPL) is a non-glycosylated low molecular mass protein (MM = 21 600) that is synthesized by the placental syncytiotrophoblasts (1-2). It is secreted into the mother's blood stream and its circulating concentration at the end of gestation can reach 6 - 7 µg per milliliter. These values are much higher than those in the cord blood (3). The values reached in the mother blood are not compatible with classical hormonal activity. HANDWERGER (4) recently reviewed the physiology of hPL and concluded that, despite recent progress, its mechanism of action remains unknown.

The present work shows that hPL has cAMP dependant protein kinase activity which could explain at least some of its biological activities.

I - cyclic AMP binding to hPL

hPL (5) was shown to bind cAMP selectively using three assays, altered antigen-antibody affinity, equilibrium dialysis and affinity chromatography.

Altered antigen-activity affinity

A monoclonal anti-hPL antibody produced in our laboratory (6) was used in an ELISA (Fig. 1A) or RIA (Fig. 1B). Addition of 20 pmoles/well of cAMP to the hPL-monoclonal anti-hPL antibody mixture inscreased the apparent affinity of antibody for hPL from 1.74×10^{12} l/M to 2.27×10^{12} l/M.

We checked by ELISA that neither ATP, GTP, nor cGMP had an action in the hPL-anti-hPL system. We also checked that cAMP had no effect on the antigen-antibody reaction of the hGH-anti-hGH or hPRL-anti-hPRL system (data not shown).

Equilibrium dialysis

Figure 2 shows the difference between the cAMP concentration in compartment A (which contained hPL + cAMP) and compartment B (cAMP alone at the same concentration as in A). The experiment was done with two different concentrations of cAMP and four concentrations of hPL. hPL, clearly bound cAMP.

Affinity chromatography

A solution of hPL or hGH (1 mg in 1 ml distilled water) was placed on an Agarose-cAMP column (SIGMA, réf. A7396). The column was washed with Tris HCl, pH = 7.5 and hPL or hGH was eluted with Tris-HCl, pH = 7.5, 0.15 M NaCL, followed by the same buffer + 1 % SDS. Figure 3A shows absorbances at 280 nm of the eluted fractions. Figure 3B shows the result of the same experiment with hGH. hPL was retained by the Agarose-cAMP column.

II - cAMP-dependant kinase activity of hPL

hPL was found to have cAMP-dependant kinase activity using either soluble casein or a human lymphocyte lysate as substrate. The activity of hPL was compared to that of the purified beef heart cAMP-dependant kinase (PK II). The hPL kinase activity on lymphocyte lysate was also found to be completely inhibited by a monoclonal antibody to hPL .

Kinase activities on casein

Table I shows the binding of ^{32}P (in cpm) to casein. hPL had less kinase activity for casein than did PK II (about 5 %). However, the activity was reproducible and increased with the hPL concentration.

Kinase activity of hPL on human lymphocyte lysate

As it was possible that casein was not a good substrate for hPL, a human lymphocyte lysate was also tested (Table II). hPL was found to have kinase activity, which increases with incubation time, until it was finally greater than that of PK II on this substrate. Neither PK II, nor hPL had any activity in absence of cAMP.

Table III shows that increasing concentrations of a monoclonal anti-hPL antibody inhibited the kinase activity of hPL.

The phosphorylated lymphocyte lysate proteins were separated by SDS-PAGE. The gels were dried, and autoradiographed (Fig. 4). The protein substrates phosphorylated by hPL and PK II were not the same.

The concentration of hPL in maternal blood during pregnancy is high while fetal concentrations are much lower. This concentration of hPL is enough to induce the secretion of IGFs in the fetus and this could be the main function of hPL (7). It may even be able to replace a fetal GH deficiency. But the high concentrations of hPL in the mother are not very compatible with a simple hormonal activity. If, as is generally assumed, all the metabolism of the mother is directed towards the preservation of the fetus, as then the needs of the fetus may be satisfied by hPL. hPL could play a role with other factors, in this processes by reversibly binding cellular cAMP, and so buffering its effects on the main metabolic pathways , or on lymphocyte immune reactions. Its kinase activity for specific substrates yet to be identified, could also be important.

The phosphorylation of the lymphocyte lysate indicates that hPL has a more specific substrate spectrum than the beef heart PK II kinase. But the choice of a lymphocyte lysate as substrate was essentially arbitrary. The presence of high extracellular concentrations of hPL also points to an extracellular substrate. KOISTINEN

et al. (10) recently showed that the degree of phosphorylation of IGF-binding protein I in the decidua and in amniotic fluid, increased during pregnancy, giving rise to molecular forms with high affinities for IGF-I. This accentuated the ability of these proteins to inhibit endometrial IGF-I receptor recognition by IGF-I. hPL, which also increases throughout pregnancy, may have a kinase activity toward these proteins.

On an other hand, there is a true relation between hPL secretion and intracellular cAMP concentration. In 1987, HANDWERGER et al. (11) showed that some apolipoproteins could increase hPL synthesis and secretion by human trophoblast in vitro. This was confirmed in 1989 (12) and in 19901 (4). This stimulation involved cAMP and induced the phosphorylation of an acidic 80 KDa protein, and the increase in cAMP preceded the stimulation of hPL secretion.

We have not compared the primary structure of hPL with those of other cAMP-dependant eucaryotic kinases. However, HUNTER (13) suggests that the numbers of protein kinase families will increase each day. It is therefore likely that other groups will be added to the present classification.

REFERENCES AND NOTES

1 - L.M. SHERWOOD, S. HANDWERGER, W.D. Mc LAURIN, M. LANNER.
Nature, **233**, 59 (1971)

2 - M.M. GRUMBACH, S.L. KAPLAN.
Trans. N.Y. Acad. Sci., **27**, 167 (1964)

3 - M.M. GRUMBACH, S.L. KAPLAN, J.J. SCIARRA, I.M. BURR.
Ann. N.Y. Acad. Sci., **148**, 501 (1968)

4 - S. HANDWERGER.
Endocr. Rev., **12**, 329 (1991)

5 - A commercial purified hPL (UCB bioproducts i020 hPL. Iodination grade, UCB, Nanterre, France was used dissolved in distilled water (mg/ml).

6 - Second generation balb C/C57 hybrid mice were immunized with two subcutaneous injections at four weeks intervals in Freund's complete antigen (Pel Freez, Biologicals Rogers, USA). Each 70 µl injection contained 35 µg hPL in 35 µl distilled water + 35 µl complete Freund's antigen. These were followed by two intraperitoneal injections, also at four week intervals, in Freund's incomplete antigen (same conditions). Three days before fusions, the mice were given an intravenous injection of 250 µg hPL in 250 µl 0.15 M NaCl. Spleen lymphocytes were fused with murine myeloma cells PAIO (a gift from Prof. H. BAZIN, Brussels, Belgium) using the PEG technique (MERCK, PEG 4000). Hybrid cells were cultured on HAT selective medium. Clone n° 11441 was selected for mass production in bioreactors, and the secreted IgG 1 was purified by gel filtration on Sephacryl S 200 (PHARMACIA) followed by 5P 5PW column FPLC (LKB Ultropec). The monoclonal antibody (MAb) was directed toward the determinant AA125-AA169 of hPL and has an affinity of 1.74×10^{12} l/M for native hPL in the absence of cAMP and of 2.27×10^{12} 1/M in the presence of cAMP. This MAb was used at a concentration of 6.5 mg/ml in PBS.

7 - C. LASSARRE, S. HARDOUIN, F. DAFFOS, F. FORESTIER, F. FRANKENNE, M. BINOUX.
Pediatr. Res. , **29**, 219 (1991).

8 - AMP 3'5' cyclic phosphoric acid 2'0 succinyl 3 ^{125}I iodotyrosine methyl ester (MM = 719) AMERSHAM, réf. IM 106, 74 TBq/mmol.

9- Human blood was collected over EDTA and diluted V/V with PBS. 10 ml of MSL 2000 (EUROBIO, France) were added to 20 ml diluted blood and the mixture was gently mixed. The mixture was centrifuged at 580 g for 30 min. and the supernatant was discarded. The cell pellet was washed three times with PBS, resuspended in 0.5 ml PBS and sonicated for three min. The membranes were removed by centrifugation and the lysate was used without dilution. The protein content was 1.25 - 3 mg/ml, depending on the specific experiment.

10 - R. KOISTINEN, M. ANGERVO, P. LEINONEN, T. HAKALA, M. SEPPALA.
Clin. Chim. Acta, **215**, 189 (1993).

11 - S. HANDWERGER, S. QUARFORDT, J. BARRETT, I. HARMAN.
J. Clin. Invest., **79**, 625 (1987).

12 - A. GRANDIS, V. JORGENSEN, L. KODACK, S. HANDWERGER.
J. Endocrinol., **120**, 424 (1989).

13 - T. HUNTER.
Methods Enzymol., **200**, 3 (1991)

	Blank	PK II	hPL (pmoles/assay)				
		110 pmoles/assay	92	231	462	693	964
Measured activity cpm/assay	342	41,549	852	1,277	1,604	2,086	3,101
	460	71,000	1,240	2,058	3,823	4,182	

Table I : cAMP-dependant kinase activities of beef heart PK II and hPL on soluble casein. Each value is the mean of three assays. The techniques of TAO (Biochem. Biophysic. Res. Commun. 46, 56, 1972) and VUILLEMIN-GELOT (Contribution à l'étude du rôle de l'AMPc dans le placenta humain. Thèse de spécialité, Nancy, 1975) were used 10 µl of a solution of γ ^{32}P ATP (AMERSHAM 74 MBq/mmole, 37 GBq/ml, 5 x 10^2 mmoles/ml), were placed in a series of tubes , plus 20 µl cAMP (1 pmole/µl), 10 µl casein (casein SIGMA, réf. C4765, 59 mg/ml). Finally 20 µl (110 pmoles) of PK II (SIGMA, réf. P5511) or 20 µl hPL (92, 231, 462, 693 or 964 pmoles) and 200 µl 200 mM Tris-HCl, pH 8.5 buffer, were added. The mixture was incubated at 37°C for 10 min. (or 1 h 30) before adding 20 µl BSA (30 mg/ml in PBS) and 2 ml 10 % TCA to stop the reaction. The precipitate was collected on a membrane washed five times with 10 % TCA, and the radioactivity counted. Each experiment included a blank in which PK II or hPL was replaced by 20 µl distilled water.

Measured activity cpm/assay	Blank	PK II 110 pmoles	hPL (pmoles) 92	231	462
Incubation 20 min. (a)	400	7,202	1,640	2,644	4,185
	288	5,547	1,084		
Incubation 1 h 30 (b)	16,137	35,738			125,645

Table II : kinase activity of PK II and hPL measured on human lymphocyte lysate as substrate. Each result is the mean of three assays.

a) Experiment using ^{32}P cAMP b) Experiment using ^{33}P cAMP

Measured activity as cpm/assay	Blank	hPL alone 92 pmoles	hPL 92 pmoles + 1.25 µl MAb	hPL 92 pmoles + 2.5 µl MAb	hPL 92 pmoles + 5 µl MAb	hPL 92 pmoles + 10 µl MAb	hPL 92 pmoles + 20 µl MAb	hPL 92 pmoles + 30 µl MAb
	---	---	---	---	---	---	---	---
	288	288	1,084	897	774	536	339	292

Table III : Effect of a specific monoclonal anti-hPL antibody (MAb 6.5 mg/IgG/ml) on the kinase activity of hPL

Fig. 1 : Influence of cAMP on the reaction hPL with monoclonal anti-hPL antibody without cAMP, with cAMP (20 pmoles/well).

A) **ELISA** : Each point is the mean of four assays. 100 µl aliquots of hPL (2mg/ml in 50 mM Na_2CO_3, pH 9.6) were placed in each well of 96-well plates (COSTAR, USA) and left overnight at 4°C. They were removed and the free binding sites were saturated under the same conditions with 100 µl of 2 % BSA in PBS. The wells were washed with PBS and 100 µl MAb (6.5 mg/ml) placed in each for 2 hours at 37° C. The plates were again washed and the quantity of IgG 1 bound to hPL in each well was determined with a second anti-mouse IgG 1 antibody labeled with peroxidase (TAGO, USA), using tetramethylbenzidine as substrate. The same experiment was done with 20 pmoles cAMP in each well during the hPL-MAb step.

B) **RIA** : hPL was labeled with ^{125}I by the HUNTER and GREENWOOD method (Nature, 1962, **194**, 495). A fixed quantity of ^{125}I hPL (4 ng = 2.22 MBq) was placed in each tube followed by the monoclonal antibody (100 µl, 6.5 mg/ml) and increasing quantities of no labeled hPL (100 µl of solutions containing 6.5, 12.5, 25, 50 and 100 ng/ml). The tubes were incubated for 12 hours at 4°C and the bound radioactivity was separated from the free by a second anti-mouse IgG antibody (TAGO, USA). The radioactivity was counted. The experiment was repeated with 20 pmoles of cAMP in each tube.

Fig. 2 : Equilibrium dialysis, binding of cAMP to hPL : the cpm shown reflect the difference in the cAMP concentration compartment A (containing 2 ml Phosphate Buffered Saline, 50 pmoles/ml I^{125} cAMP and 12.5 pmoles/ml ●——● or 50 pmoles/ml ■——■ no labeled cAMP) and compartment B (same composition of A + hPL 12.5, 25 and 50 pmoles/ml). Each point is the mean of three assays.

Neither hGH, nor hPRL gave the same results (data not given).

Fig. 3 : Affinity chromatography of hPL (A) and hGH (B) on Agarose-cAMP : column (2 x 5 cm). 1 mg hPL or hGH in 1 ml distilled water was placed on the column and washed with Tris-HCl, pH = 7.5. Retained proteins were eluted with 1 = Tris-HCl, pH 7.5 + 0.15 M NaCl and 2 = Tris-HCl, pH 7.5 + 0.15 M NaCl + 1 % SDS.

Fig. 4 : Electrophoreis of phosphorylatied proteins : Samples were dried off under N_2 and dissolved in 20 µl o,125 Tris-HCl buffer (pH 6.8) containing 1 % SDS, 20 % glycerol, 50 mM DTT and bromophenol blue and boiled 3 min. After centrifugation 10 000 g 5 min., supernatants were loaded on a SDS-polyacrylmide gel (4 % stacking and 12,5 % running) for electrophoresis according to the method of LAEMLI (Nature, 1970, **227**, 680).

Lanes E1 and E2 kinase activity of hPL on human lymphocyte lysate.

Lane E3 kinase activity of PK II on human lymphocyte lysate.

Numbers on the left refer to molecular weight markers.

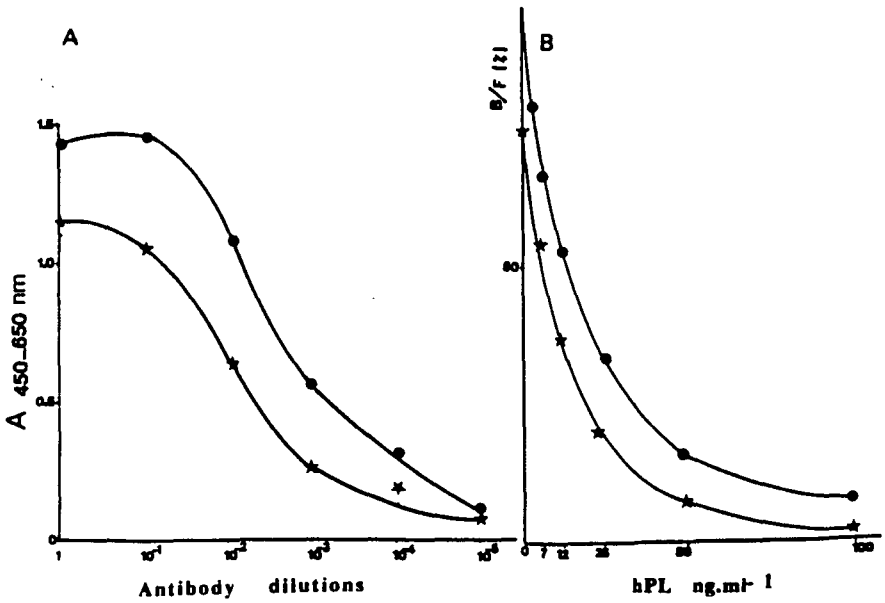


Figure 1

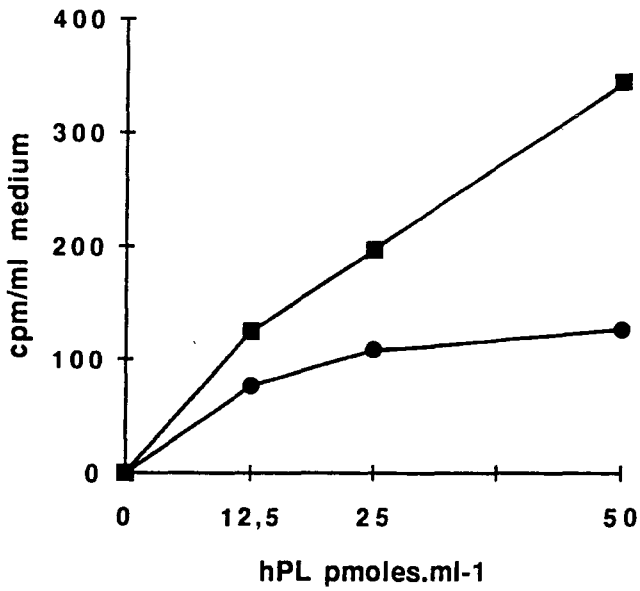


Figure 2

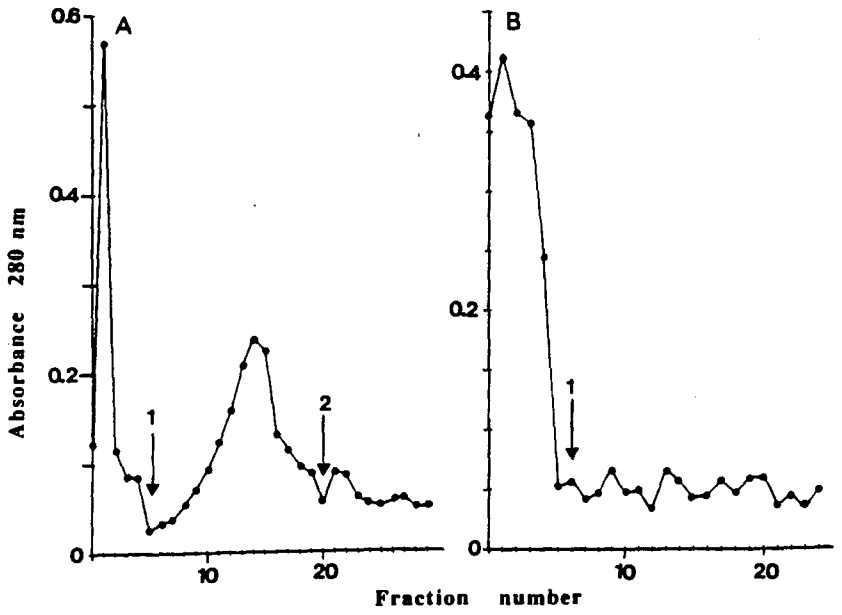


Figure 3

UNIVERSITÉ de NANCY
BIBLIOTHÈQUE
de Médecine

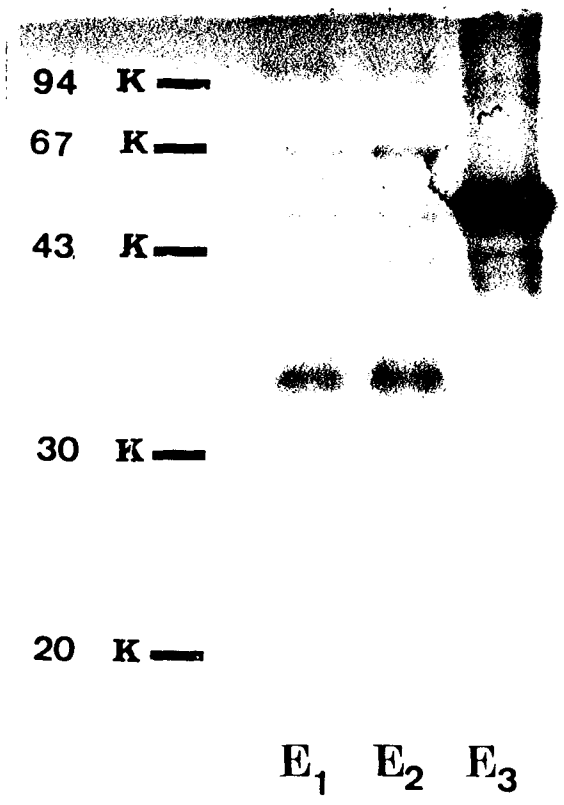


Figure 4

UNIVERSITÉ BIBLIOTHÈQUE Section de Médecine

Tableau 1 :
Composition de milieu de base RPMI 1640.

Tableau 2 :
Composition de milieu de base DMEM et MEM.

Tableau 3 :
Composition des tampons et gradient utilisés pour la chromatographie d'échange d'ions sur colonne 5P5PW (LKB Ultropec).

Tableau 4 :
Tampon et pH recommandés pour l'étude des différentes sous-classes d'IgG.

Tableau 5 :
Mode opératoire de la détermination de l'action de l'AMPc sur la réaction antigène-anticorps de l'hPL.

Tableau 6 :
Mode opératoire pour déterminer l'activité kinasique d'après TAO (1970).

Tableau 7 :
Résumé des différentes étapes de la création des hybridomes anti-hPL.

Tableau 8 :
Suivi des D.O. au cours des différents tests ELISA lors de la création d'anticorps monoclonaux anti-hPL après immunisation "in vivo".

Tableau 9 :
Concentration en anticorps monoclonaux spécifiques anti-hPL, sécrétés par les hybridomes sélectionnés. Les résultats sont la moyenne des densités optiques (D.O.) de trois essais obtenus par test ELISA.
La longueur d'onde de lecteur est comprise entre 450-650 nm.

Tableau 10 :
Production d'anticorps monoclonaux anti-hPL dans l'ascite.

Tableau 11 :
Isotypage des anticorps monoclonaux anti-hPL sélectionnés.

Figure 11 :
Chromatographie sur Séphacryl S 200 d'un surnageant d'hybridome 1.1.4.4.1 :
Colonne 1,5 x 80 cm, débit de 15 $ml.h^{-1}$, tampon Tris/HCl 0,5 M, pH 8,5.
3 g d'échantillon lyophilisé, repris dans le même tampon, filtré et alourdi par sucrose ont été déposés.

Figure 12 :
Profil d'élution du pic 1 provenant de la chromatographie gel filtration sur Séphacryl S 200.
Echantillon : 500 ug de protéines
Injection : 500 ul (après filtration)
Débit : 1 ml/min.
Colonne L.K.B. Ultrapac TSK DEAE 5PW 7,5/75 mm.
Phase mobile : solvant primaire -A- : Tris/HCl 10 mM, pH8
solvant secondaire -B- : Tris/HCl 10 mM, pH 8, NaCL 0,5 M.
Détecteur UV : 280 nm.

Figure 13 :
Profil d'élution du pic 1 provenant de gel filtration sur Séphacryl S200.
Echantillon : 500 ug de protéines.
Injection : 500 ul (après filtration).
Débit : 1 ml/min.
Colonne L.K.B. Ultrapac TSK DEAE 5 PW 7,5/75 mm.
Phase mobile : solvant primaire -A- : Tris/HCl 10 mM, pH 7
solvant secondaire -B- : Tris/HCl 10 mM, pH 8, NaCl 0,5 M.
Détecteur UV : 280 nm.

Figure 14 :
Profil d'HPLC analytique d'une préparation enrichie d'anticorps monoclonaux provenant du pic 1 de gel filtration réalisée par palier en NaCl.
Injection de 500 ul sur une colonne L.K.B. 21,5 x 150 mm.
Phase mobile : solution A : Tris/HCl 10 mM, pH 7
solution B : NaCl 0,5 M, Tris/HCl 10 mM.
Gradient par palier : 0 de NaCl en 10 min, 1,4 nM de NaCl en 15 min, 3 nM de NaCl en 20 min et 100 nM de nM NaCl en 8 min.
Détecteur U.V. : 280 n.

Figure 15 :
Profil d'HPLC préparative d'une préparation enrichie d'anticorps monoclonaux provenant du pic 1 de gel filtration.
Injection de 500 ul d'une solution à 10 mg/ml de protéine sur une colonne L.K.B. 21,5 x 150 mm.
Phase mobile : solution A : Tris/HCl 10 mM, pH 7
solution B : NaCl 0,5 M, Tris/HCl 10 min.
Gradient par palier : 0 de NaCl en 53 min, 1,4 nM de NaCl en 15 min, 3 nM de NaCl en 20 min et 100 nM de NaCl en 8 min.
Détecteur U.V. : 280 n.

Figure 16 :
Profil d'élution d'un liquide d'ascite de souris contenant un anticorps monoclonal de classe IgG1, obtenu après chromatographie d'affinité sur protéine A-Sépharose CL-4B. Le pic contient les anticorps monoclonaux.
Le tampon initial est à pH 8,1.

Figure 17 :
Electrophorèse en PAGE-SDS (15% d'acrylamide) des différents pics obtenus par différentes méthodes de purification.

Puits 1-2 : marqueurs de poids moléculaires
Puits 3-4 : milieu RPMI 1640 + 10% de SVF
Puits 5-6 : pic 1 chromatographie d'affinité
Puits 7-8 : pic 3 HPLC préparative
Puits 9-10 : surnageant du milieu de culture avant purification
Puits 11-12 : pic 1 de gel filtration.

Figure 18 :
Chromatographie sur G50 de 20 ug d'hPL.
Tampon phosphate de sodium 0,5 M pH 7,5 et 10 ul d'iodure de sodium marqué : activité spécifique = 629.10^3 Bq/ug, concentration = $3,6.10^9$ Bq/ml.

Figure 19 :
Courbe de compétition entre hPL chaud et froid pour l'anticorps du clone 1.1.4.4.4.

Figure 20 :
Courbe de compétition entre hPL chaud et froid pour l'anticorps du clone 1.1.4.4.1.

Figure 21 :
Représentation selon Scatchard de la fixation de l'antigène sur l'anticoprs monoclonal provenant du clone 1.1.4.4.1. (*) et 1.1.4.4.4. (.).

Figure 22 :
Test ELISA avec hPL native et hPL sans ponts disulfures en utilisant l'anticorps provenant du clone 1.1.4.4.1.

Figure 23 :
Coupure théorique de l'hPL par bromure de cyanogène ( ) qui coupe au niveau des extrémités carboxyle des résidus méthionine.

Figure 24 :
Séparations par HPLC phase reverse des peptides obtenus par coupure avec le bromure de cyanogène.
Tampon d'élution : 0,1 % de TFA, 95 % de CH_3CN.
Colonne B4 butyl Aquapor (Merck), 4,6 x 250 mm.
Détection : 220 nm.

Figure 25 :
Test ELISA avec hPl native et les différents fragments obtenus par digestion chimique au bromure de cyanogène contenus dans le pic 4 et le pic 5.

Figure 26 :
Séparation des peptides contenus dans le pic 4 par HPLC reverse.
Tampon d'élution : 0,1 % de TFA, 95 % de CH_3CN
Colonne B4 butyl Aquapor (Merck), 4,6 x 250 mm.
Détection : 220 nm.

Figure 27 :
Séparation des peptides contenus dans le pic 5 par HPLC reverse
Tampon d'élution : 0,1 % de TFA, 95 % de CH_3CN
Colonne B4 butyl Aquapor (Merck), 4,6 x 250 mm.
Détection : 220 nm.

Figure 28 :
Région d'hPL contenant l'épitope qui a réagit avec l'anticorps monoclonal purifié.

Figure 29 :
Courbe de compétition réalisé par RIA entre hPL marqué par l'iode 125 et hPL froid (non marqué) vis-à-vis de leur anticorps polyclonal, en présence --- ou non de 20 pmoles d'AMPc ----.

Figure 30 :
Courbe de compétition réalisée par RIA entre hPL marqué par l'iode 125 et hPl froid (non marqué) vis-à-vis de leur anticorps monoclonal, en présence --- ou non de 20 pmoles d'AMPc ---.

Figure 31 :
Test ELISA de l'hPL vis-à-vis des dilutions décroissantes de son anticorps monoclonal, en présence --- ou en absence --- de 20 pmoles d'AMPc.

Figure 32 :
Test ELISA de l'hPL vis-à-vis des dilutions décroissantes de son anticorps monclonal, en présence --- ou en absence --- de 20 pmoles GTP.

Figure 33 :
Test ELISA de l'hPL vis-à-vis des dilutions décroissantes de son anticorps monoclonal, en présence --- et en absence --- de 20 pmoles l'ATP.

Figure 34 :
Test ELISA de l'hPL vis-à-vis des dilutions décroissantes et son anticorps monoclonal, en présence --- et en absence --- de 20 pmoles GTPc.

Figure 35 :
Courbe de non compétition de la prolactine par RIA en présence --- ou et en absence --- de 20 pmoles de l'AMPc.

Figure 36 :
Courbe de compétition réalisée par RIA entre la LH marquée à l'iode 125 et LH froide, vis-à-vis de son anticorps monoclonal en présence --- ou et en absence de l'AMPc ---.

Figure 37 :
Courbe de non compétition de la hGH par RIA en présence --- et en absence de 20 pmoles de l'AMPc.

Figure 38 :
Schéma représentant la dialyse à l'équilibre. Le compartiment A qui contenant l'hPL ( ) et l'AMPc ( ), est séparé du compartiment B contenant que de l'AMPc ( ) par une membrane semi-sélective à seuil de coupure 1000 Daltons.

Figure 39 :
Variation de cpm de l'AMPc marqué à l'iode 125 entre le compartiment A (contenant l'hPL + l'AMPc) et B (contenant que l'AMPc) en fonction de la concentration de l'hPL.

Figure 40 :
Variation de cpm de l'AMPc marqué à l'iode 125 entre le compartiment A (contenant l'hPL + l'AMPc) et B (contenant que l'AMPc) en fonction de la concentration de l'AMPc.

Figure 41 :
Profil d'élution de l'hPL par chromatographie d'affinité sur Agarose-AMPc.
Le tampon initial est tris/HC1 pH 7,5 ; NaC1 150 mM ; Chaps 2 %.

Figure 42 :
Courbe réalisée par test ELISA de l'hPL native ---, du pic 1 --- et du pic 2 --- obtenu par chromatographie d'affinité sur Agarose-AMPc.

Figure 43 :
Inhibition de l'activité kinasique de l'hPL par ajout des concentrations croissantes d'anticorps monoclonaux anti-hPL.

Figure 44 :
Electrophorèse en PAGE native de la solution contenant de l'hPL.
Tampon de gel : 0,112 M d'acétate ; 0,112 M Tris ; pH 6,8
Tampon d'électrode : 0,88 M L-alanine ; 0,25 M Tris ; pH 8,8
Echantillon : 50 ng d'hPL
Courant continu : 25 mA ; 1 watt ; 20 volt.
Puits A et D : marqueurs de poids moléculaires
Puits B et C : solution d'hPL.
Coloration argentique.

Figure 45 :
Electrophorèse en PAGE SDS de la solution contenant de l'hPL.
Tampon de gel : 0,112 M d'acétate ; 0,112 M Tris ;pH 6,8
Tampon d'électrode : 0,2 M M-Tricine ; 0,2 M Tris ; pH 8,1
Echantillon : 50 ng d'hPL
Courant continu : 25 mA ; 1 watt ; 20 volt.
Puits A et D : marqueurs de poids moléculaires
Puits B et C : solution d'hPL.
Coloration argentique.

Figure 46 :
Immunotransfert et l'hPL natif sur une membrane nitrocellulose.
Les sécrétions sont révélées par un anticorps monoclonal anti-hPL sur lequel est fixé un deuxième anticorps anti-souris marqué à la phosphatase alkaline.

Figure 47 :
Le contrôle du métabolisme des glucides et des lipides chez la mère par les réactions de phosphorylation.

RAPPORT SUR LE MEMOIRE DE THESE "HORMONE LACTOGENE PLACENTAIRE (hPL)"

- FABRICATION D'ANTICORPS ANTI-hPL ET RECHERCHE DES EPITOPES

- hPL EST-ELLE UNE KINASE ?

PRESENTE PAR MONSIEUR H. MAAZOUZI POUR L'OBTENTION DU GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE NANCY I

*****

Dans une première partie, Monsieur **MAAZOUZI** présente l'ensemble des expériences réalisées pour l'obtention d'anticorps monoclonaux anti-hPL. Ceci lui a permis de se familiariser avec des techniques couramment utilisées dans les laboratoires de recherche et dans l'industrie : culture cellulaire, préparation d'hybridomes, clônage, mesure de la secrétion d'anticorps par Test Elisa, techniques de purification des anticorps.

Parmi les clônes obtenus, Monsieur **MAAZOUZI** en a sélectionné deux, stables, bien secrétants, et il a pû identifier l'épitope contre lequel les hybridomes étaient dirigés. Par des techniques de coupure par le bromure de cyanogène d'hPL pour séparer les peptides obtenus et séquençage, il a pû montrer que l'épitope était contenu dans la séquence 125-169 de l'hPL.

Cette première partie du travail, qui fait appel aux biotechnologies, est suivie d'une partie qui est plus de la biochimie fondamentale.

En effet, Monsieur **MAAZOUZI** a observé que la liaison hPL à son anticorps était diminuée par la présence d'AMPc. Cette inhibition est spécifique de l'AMPc (elle n'a pas lieu avec ATP, GTP, ou GMPc) et de l'hPL (elle ne se produit pas avec l'hormone de croissance, la prolactine ou la LH).

La liaison de l'AMPc à l'hPL a été vérifiée par dialyse à l'équilibre et par chromatographie d'affinité sur agarose-AMPc.

Les protéines liant l'AMPc sont des protéines qui, habituellement, ont une activité kinasique. Monsieur **MAAZOUZI** a donc mesuré l'activité kinasique de l'hPL sur deux substrats : la caséine et un lysat lymphocytaire. Il met en évidence une activité kinasique de l'hPL qui est faible mais nette et qui est bien liée à l'hPL puisque cette activité disparaît complètement en présence d'une quantité suffisante d'anticorps anti-hPL. La mise en évidence d'une activité kinasique de l'hPL ouvre de nouvelles perspectives dans la compréhension du rôle métabolique de l'hPL.

Pendant ce travail expérimental, Monsieur **MAAZOUZI** a abordé de très nombreuses techniques. Les résultats originaux obtenus doivent lui permettre de présenter son mémoire devant un Jury.

Nancy, le 26 octobre 1993

Pol Nebet

RAPPORT SUR LE MEMOIRE DE THESE
PRESENTE PAR MONSIEUR MAAZOUZI Hafid

Monsieur **Hafid MAAZOUZI** présente un travail expérimental intitulé : ***HORMONE LACTOGENE PLACENTAIRE (hPL) - FABRICATION D'ANTICORPS ANTI-hPL ET RECHERCHE DES EPITOPES - hPL EST-ELLE UNE KINASE ?*** pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université de NANCY.

La première partie de ce travail comporte une introduction d'une trentaine de pages concernant l'hormone placentaire lactogène (hPL). Dans cette introduction l'auteur rappelle les propriétés biologiques et physiologiques de l'hPL, son métabolisme et la régulation de sa sécrétion, puis suit un rappel de notions d'immunochimie centré sur les anticorps monoclonaux et leurs applications pour la détection de différents antigènes en insistant sur l'intérêt des anticorps anti-hPL.

L'objet premier de ce travail a porté sur la production d'anticorps monoclonaux (AcM) anti-hormone placentaire lactogène par immunisation de souris dont les lymphocytes ont été fusionnés pour obtenir des hybridomes suivie d'une mise en culture in vitro et in vivo afin de faire l'étude d'épitopes. Par la suite a été mise en évidence une protéine placentaire liant l'AMPc qui s'est révélée être l'hPL elle-même, ce qui a conduit l'auteur a étudier le rôle kinasique éventuel de l'hPL.

Le chapitre consacré à l'exposé des Matériels et des Méthodes, exposé de façon claire et précise, rapporte le mode de préparation des AcM en détaillant les protocoles d'immunisation, de fusion et de culture cellulaire ainsi que la méthode de clonage. Sont également décrits, de façon détaillée, les procédures de sélection et de caractérisation des anticorps secrétés par les clones, ainsi que la purification des anticorps murins mettant en jeu différentes techniques de chromatographie. Sont exposées ensuite les techniques permettant de déterminer les caractéristiques des anticorps anti-hPL avant que soient décrites les méthodes permettant l'étude de la relation hPL-AMPc.

La présentation des résultats comporte 7 chapitres spécifiques. Le premier concerne la fabrication d'hybridomes anti-hPL. La démarche de sélection procède notamment par le suivi des DO au cours des différents tests ELISA lors de la création d'AcM après immunisation in vivo. Tous les AcM obtenus par clonages successifs se sont révélés hautement spécifiques de l'hPL et appartenant à la sous classe IgG 1. Le quatrième chapitre est consacré à la purification des AcM contenus dans le milieu de culture ou d'ascites. Cette purification est conduite par des techniques chromatographiques habituelles notamment de gel-filtration et d'affinité. La séparation des fractions provenant des différentes étapes de purification est conduite par électrophorèse en gel d'acrylamide. Le sixième chapitre est consacré à la localisation des épitopes de l'hPL, reconnus par les AcM anti-hPL. Les différentes techniques utilisées ont conduit à l'isolement du fragment qui contient le déterminant antigénique réagissant avec l'anticorps purifié. Le dernier chapitre a trait à l'étude de la relation hPL-AMPc. L'utilisation des AcM anti-hPL obtenus au laboratoire confirme que la présence d'AMPc modifie la réaction hPl-anti-hPL, alors que la présence d'autres nucléotides ne modifie pas les propriétés immunologiques de l'hPL vis à vis de son anticorps. L'effet de l'AMPc est spécifique pour l'hPL puisque le même test effectué avec d'autres hormones (LH, prolactine et hGH) est négatif. La fixation d'AMPc sur l'hPL a été mise en évidence par la technique de dialyse à l'équilibre. Enfin, en utilisant la même méthode de mesure que pour la protéine-Kinase AMPc dépendante extraite du coeur de boeuf, l'auteur a pu démontrer que l'hPL a une activité kinasique non négligeable qui n'est pas due à une contamination. Cette activité kinasique serait au moins partiellement responsable des modifications métaboliques observées au cours de la grossesse avec une modification de la tolérance au glucose.

Ce travail expérimental, conduit avec rigueur, étayé par une bibliographie importante comportant près de 250 références, est extrêmement dense et débouche sur des apports expérimentaux très

intéressants et novateurs. En particulier, la découverte de l'activité kinasique de l'hPL apporte un éclairage nouveau sur le rôle de cette hormone.

En raison de la qualité du travail expérimental, le mémoire de thèse de **Monsieur MAAZOUZI** peut être présenté devant un Jury pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université de NANCY.

Fait à Besançon, le 12 novembre 1993

Professeur J.C. HENRY

INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE

UNITE DE RECHERCHES
EN IMAGERIE QUANTITATIVE APPLIQUEE AUX REGULATIONS
NEUROENDOCRINIENNES
U 339

(CNRS - SDI 6275 I)

Directeur : Dr. W. ROSTENE

Bâtiment INSERM - Hôpital Saint-Antoine
184, rue du Faubourg Saint-Antoine
75571 PARIS CEDEX 12
Tél. : (1) 49.28.46.00 / (1) 43.40.82.70
Fax : (1) 43.43.32.34

Docteur Rose-Marie SCHIMPFF

RAPPORT

Monsieur Hafid Maazouzi présente, pour l'obtention du titre de Docteur de l'Université de Nancy I (Spécialité Biochimie), un mémoire intitulé:

"Hormone lactogène placentaire (hPL)
Fabrication d'anticorps anti- hPL et recherche des épitopes
hPL est-elle une kinase?"

Il s'agit d'un mémoire de 185 pages incluant 245 références bibliographiques ce qui est tout à fait correct. Les références sont bien choisies.

Dans **l'introduction** de 33 pages, l'auteur aborde 3 sujets

-1) les données essentielles concernant l'hPL, ses propriétés biologiques, physiologiques, son rôle sur le métabolisme énergétique, la régulation de sa sécrétion , enfin les données récentes sur les gènes régulant son expression.

-2) des notions d'immunochimie, les applications des anticorps monoclonaux et l'intérêt des anticorps anti-hPL

-3) la phosphorilation des enzymes

Cette introduction est peut-être un peu longue , présentée comme un cours mais cependant très intérressante à lire.

La présentation du travail constitue la 4 ème partie de l'introduction, sur une seule page, les liens existant entre les deux parties du travail qui va être présenté sont peu explicites et cela est dommage.

Le matériel et les méthodes , nombreuses et faisant appel à des techniques de pointe, sont rapportés sur 37 pages, de façon très détaillée et très claire.

Sont abordés tour à tour la production et la préparation des anticorps monoclonaux, la sélection des anticorps, la détermination des caractéristiques des anticorps anti- hPL, enfin les techniques mises en place pour étudier la relation hPL-AMPc.
La démarche scientifique est claire et rigoureusement conduite.

Les résultats sont donnés sur 55 pages (21 tableaux et 45 figures).
Un anticorps monoclonal de bonne affinité a été obtenu (1.5×10^{12}). La comparaison avec les anticorps déjà existant n'est pas donnée.
La recherche des épitopes a été réalisée et a permis de montrer la présence d'un épitope dont la séquence est de type linéaire.
Les acides aminés qui composent cette séquence ont été déterminés et il est montré que la leucine en position 139 de l' hPL est responsable de la spécificité de cette séquence.
Enfin il est montré que l' hPL a une activité kinasique faible mais certaine puisqu'elle est mise en évidence sur plusieurs substrats (caséine et substrat lymphocytaire et qu'il est démontré, grâce à l'anticorps monoclonal, que cette activité est bien le fait de l'hPL et non à une contamination par une autre protéine.
Le substrat spécifique reste cependant à déterminer.

La discussion du travail est faite sur 10 pages.
Une analyse des résultats est faite en fonction des données de la littérature.
Une hypothèse très intéressante est avancée, celle du rôle de l' hPL dans le métabolisme glucidique chez la femme enceinte. Celui-ci n'est pas démontré.

Au total, même si les conclusions ne sont pas définitives et s'il existe quelques maladresses de présentation, **ce travail ouvre la voie à des recherches nouvelles et c'est aussi ce que l'on peut attendre d'un travail scientifique bien fait.**

Aussi, compte tenu du travail expérimental réalisé, de la rigueur scientifique évidente qui en émane, des conclusions et des hypothèses de travail qui en découlent ce mémoire nous parait très valable pour

l'obtention du titre de Docteur de l'Université, voire avec mention, **tout en regrettant vivement que ce travail n'est pas donné lieu à publication.**

Fait à Paris le 25 Novembre 1993

UNIVERSITÉ NANCY
BIBLIOTHÈQUE

UNIVERSITE DE NANCY I

FACULTE DE MEDECINE

UNIVERS BIBLIOTHEQUE Section de Médecine

Je soussigné, Professeur F. STREIFF, Doyen de la Faculté de Médecine de l'Université de NANCY 1, certifie que :

M onsieur MAAZOUZI Hafid

né(e) le **08 FEVRIER 1956** à **AIN-LEUH (MEKNES)**

département de (ou pays) **MAROC**

a obtenu le **17 DECEMBRE 1993**

le **DIPLOME DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE NANCY 1, discipline GENIE BIOLOGIQUE ET MEDICAL.**

Le présent certificat est délivré à titre provisoire en attendant l'établissement du diplôme définitif.

Pour copie conforme
VANDŒUVRE, le 31 JAN. 1994
Le Maire

Vandœuvre, le 18 JANVIER 1994

Professeur F. STREIFF

AVIS TRES IMPORTANT :
Il n'est délivré qu'un seul certificat provisoire.
L'intéressé devra restituer le présent certificat pour entrer en possession de son diplôme définitif.
Pour justifier de son grade, il devra faire, sur papier libre, des copies de ce certificat et les faire certifier conforme à l'original à la Mairie ou au Commissariat de Police du lieu de son domicile.

UNIVERSITE DE NANCY 1

FACULTE DE MEDECINE DE NANCY

9, avenue de la Forêt de Haye
B.P. 184
54505 VANDŒUVRE-LES-NANCY CEDEX
Téléphone : 83.59.25.00 - Télécopie : 83.59.25.03

UNIVERSITE de NANCY BIBLIOTHEQUE Faculté de Médecine

Vandœuvre, le 27 JAN. 94-000310

REF/SCOL/NR

Le Doyen de la Faculté de Médecine

à

Monsieur MAAZOUZI Hafid
17, rue du Portugal
Appt 61
54500 VANDŒUVRE

Monsieur,

J'ai l'honneur de vous transmettre, sous ce pli :

- votre certificat provisoire du **Diplôme de DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE NANCY 1, discipline GENIE BIOLOGIQUE ET MEDICAL** que vous avez obtenu le **17 DECEMBRE 1993** devant la Faculté de Médecine de NANCY.

Veuillez agréer, Monsieur, l'expression de ma considération distinguée.

L'Attaché chargé des fonctions de
Secrétaire Général,

D. RICHARD

✂----------

A COMPLETER ET A RETOURNER DANS LES MEILLEURS DELAIS au Service des Spécialités Médicales à l'adresse indiquée ci-dessus.

Je soussigné(e)
né(e) le à
certifie avoir reçu mon certificat provisoire du

obtenu le devant la Faculté de Médecine de NANCY.

A le

Signature

UNIVERSITE DE NANCY I
FACULTE DE MEDECINE

BIBLIOTHEQUE

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE NANCY I

de **Monsieur MAAZOUZI Hafid**

Mention : GENIE BIOLOGIQUE ET MEDICAL

AUTORISE A IMPRIMER LA THESE

Nancy, le 21 JAN. 1994

LE PRESIDENT DE L'UNIVERSITE DE NANCY I

UNIVERSITE NANCY II
LE PRESIDENT

Professeur M. BOULANGÉ

Résumé

L'objectif de ce travail a été dans un premier temps l'obtention d'anticorps monoclonaux anti-hormone lactogène placentaire. Pour remplir ce premier objectif, nous avons fabriqué des hybridomes souris-souris. Les anticorps produits ont été clonés, purifiés et la détermination de l'épitope spécifique des anticorps a été réalisée après coupure de l'hPL par le bromure de cyanogène, séparation des peptides obtenus par HPLC et séquençage des peptides purifiés.

Dans un deuxième temps, nous avons montré que la réaction hPL-anti hPL était partiellement inhibée en présence d'AMPc (aucun effet de l'ATP GTP ou GMPc) et de l'hPL (aucun effet dans la réaction anticorps-hGH ou prolactine ou LH). Par dialyse à l'équilibre et chromatographie d'affinité, nous montrons qu'il y a bien une liaison AMPc-hPL. les protéines liant l'AMPc ont habituellement une activité kinasique. En effet, en utilisant comme substrat soit la caséine, soit un lysat lymphocytaire, nous démontrons que l'hPL a une nette activité kinasique bien que cette activité soit faible, ce qui ouvre de nouvelles voies pour la compréhension du rôle de l'hPL dans le métabolisme de la femme enceinte.

Summary

The aim of this work was :

- In a first step, to procedure an hPL monoclonal antibody by the technique of mice-mice hybridoma. The obtained antibody was cloned and purified by gel filtration and HPLC. Peptides from hPL were prepared by cyanogen bromide and the peptide containing the epitope isolated, purified and sequenced.

- In a second step, tc study the relation hPL-c-AMP :

* the antigen-antibody reaction (hPL-anti hPL) was inhibited by c-AMP while ATP, GTP or c-GMP had no effects. This inhibition was specific for hPL since neither hGH-anti hGH, prolactine-anti prolactine, or LH-anti LH reactions were modified by c-AMP.

* We confirmed the binding of c-AMP by hPL using equilibrium dialysis technique, and affinity chromatography of hPL on an Agarose c-AMP column.

* As generally the c-AMP binding proteins have kinase activities, we check the kinase activity of hPL. Indeed, using casein and human lymphocyte lysate as substrates, we demonstrated that hPL in presence of c-AMP had a kinase activity quite measurable even if weak.

We discussed the possible role of this activity on the explanation of the biological activities of hPL in pregnant women.