



HAL
open science

Contribution à la purification de facteurs de croissance humains d'origine plaquettaire: le Transforming Growth Factor-Beta 1 (TGF-[bêta]1)

Pascal Colosetti

► **To cite this version:**

Pascal Colosetti. Contribution à la purification de facteurs de croissance humains d'origine plaquettaire: le Transforming Growth Factor-Beta 1 (TGF-[bêta]1). Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 1991. Français. NNT: 1991NAN10436 . tel-01747167

HAL Id: tel-01747167

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01747167v1>

Submitted on 29 Mar 2018

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

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



AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

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

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

THESE



Préparée à l'I.N.S.E.R.M. Unité 284
pour l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE NANCY I EN GENIE BIOLOGIQUE

par

Pascal COLOSETTI

Contribution à la purification de facteurs de croissance humains d'origine
plaquettaire : le Transforming Growth Factor-Beta 1
(TGF- β 1)

*Soutenue publiquement le: 5 février 1991
devant la commission d'examen:*

<i>Président</i>	. Professeur	J.F. STOLTZ
<i>Rapporteurs</i>	: Professeur	F. BELLEVILLE-NABET
	Professeur	G. POTRON
<i>Examineurs</i>	: Docteur	C. RIVAT
	Docteur	M. PARACHE
<i>Invité</i>	. Professeur	C.H. HELDIN

AVANT-PROPOS

Je tiens à remercier tout particulièrement Monsieur le Professeur Jean-François Stoltz, Directeur de l'INSERM U 284, de m'avoir accueilli au sein de son unité et permis de préparer cette thèse ainsi que pour la confiance et le soutien qu'il m'a témoignés tout au long de mes études de troisième cycle.

Que Monsieur Claude Rivat, Directeur de Recherche à l'INSERM U 284, trouve ici l'expression de ma profonde gratitude pour la confiance qu'il m'a témoignée, les conseils judicieux et encouragements prodigués tout au long de la réalisation de ce travail.

I would like to thank Professor Carl-Henrik Heldin, Director Uppsala Branch of the Ludwig Institute for Cancer Research, to received me two times during this thesis and for very profitable and friendly advices.

Que Madame et Messieurs les membres de cette commission d'examen soient remerciés pour l'honneur qu'ils me font de juger ce travail.

Tous mes remerciements vont également à :

Madame le Docteur V. Regnault, Chargé de Recherche à l'INSERM U 284, pour sa grande disponibilité et son amitié

Madame le Docteur N. Martinet et Monsieur le Professeur Y. Martinet pour leur grand soutien amical et leurs conseils judicieux

Je remercie, enfin, sincèrement et chaleureusement toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont apporté leur contribution à la réalisation de ce travail :

Les personnels et stagiaires des unités INSERM U284 et U14 et du Ludwig Institute for Cancer Research Uppsala Branch en Suède (Doctors U. Hellman, K. Miyazono ... and my friends A. Olofsson, T. Kanzaki ...)

Le Centre Regional de Transfusion Sanguine (Mademoiselle C. Geschier, les services Fractionnement, Distribution et Biochimie ... ainsi que Mademoiselle J. Vendeur et Messieurs les Docteurs J. P. Aymar et J. C. Humbert)

Madame M. Willame et Messieurs les Docteurs P. Jullien et D.A. Lawrence de l'Institut Curie à Orsay pour leur aimable accueil et de précieux conseils

Le Centre anti-cancéreux Alexis Vautrin : Mesdames C. Ramacci et le Docteur S. Marchal, Mesdemoiselles M. Barberi et F. Elbouthouri, Messieurs les Docteurs J.L. Merlin et M. Parache pour leur aimable accueil et leur grande disponibilité

Monsieur le Docteur S. Premilat du laboratoire de biophysique moléculaire de la faculté des sciences de l'Université de Nancy I (U.A. CNRS n° 494) et Messieurs les Docteurs G. Fritz et F. Plewniak de l'INSERM U184 de Strasbourg

Mesdames le Professeur F. Belleville-Nabet et le Docteur M.H. Heulin

La Direction des Recherches, Etudes et Techniques du Ministère de la Défense (Madame C. Couesnon et Monsieur le Professeur P. Lallemant)

L'association Bio-Est-Développement

Les lapins Pasteur, Carotte, Socrate, Bunny et Poireau

Toute ma famille et mes amis...

A mes parents et a Anne



TABLE DES MATIERES

	Page
INTRODUCTION	15-45
1 Les facteurs de croissance	15
1.1 Définition	15
1.2 Mécanismes endocrine, paracrine et autocrine	15
1.3 Besoin en facteurs de croissance	16
1.3.1 Bref historique	16
1.3.2 Utilisations des facteurs de croissance	17
2 Les facteurs de croissance plaquettaires	18
3 Le transforming growth factor-beta (TGF- β)	22
3.1 Découverte	22
3.2 Biochimie et biologie moléculaire	23
3.2.1 Essais biologiques	23
3.2.2 Les transforming growth factor-beta (TGF- β)	24
3.2.2.1 Les formes TGF- β 1 et TGF- β 2	24
3.2.2.2 Les autres TGF- β	25
3.2.2.3 Fonctions	26
3.2.2.4 Conservation du TGF- β	26
3.2.3 Le gène	26
3.3 La famille TGF- β	27
3.4 Les récepteurs	28
3.5 Les formes latentes	29
3.6 Activités biologiques du TGF- β	32
3.6.1 Caractère multifonctionnel	32
3.6.1.1 Le mésenchyme : contrôle de la matrice extra-cellulaire	32
3.6.1.2 Le muscle	33
3.6.1.3 Les os	35
3.6.1.4 Les cellules immunitaires	35
3.6.1.5 L'hématopoïèse	36
3.6.1.6 Les cellules stéroïdogènes	37
3.6.1.7 L'endothélium	37
3.6.1.8 Le foie	38
3.6.1.9 Les autres épithéliums	38
3.6.2 Rôle dans l'embryogenèse	39
3.7 Mécanismes d'action biochimiques	40
3.8 Rôles dans les processus physiologiques et pathologiques	42
3.8.1 Les processus de cicatrisation	42
3.8.2 Carcinogénèse et autres pathologies prolifératives	43

3.9	Applications thérapeutiques potentielles du TGF- β	44
3.10	But du travail	45
MATERIELS ET METHODES		46-78
1	Méthodes de dosage du TGF- β 1	46
1.1	Les facteurs de croissance	46
1.2	Culture cellulaire	48
1.3	Induction de la croissance de cellules NRK-49F en agar semi-solide	49
1.4	Fixation compétitive de TGF- β 1 radiomarqué au récepteur cellulaire	51
1.4.1	Radiomarquage du TGF- β 1	51
1.4.2	Préparation des plaques de dosage	52
1.4.3	Dosage	52
1.5	Inhibition de l'incorporation de thymidine tritiée par les cellules CCL64	53
2	Obtention d'anticorps polyclonaux anti-TGF- β	54
2.1	Prédiction d'épitopes continus - Choix de la séquence d'un peptide synthétique	54
2.2	Immunsation - Production des antisérums	55
2.3	Caractérisation des antisérums	56
2.3.1	"Enzyme-linked immunosorbent assay" (ELISA)	56
2.3.2	Immunoblotting	57
2.3.2.1	Electrophorèse en gel de polyacrylamide (gradient 8-25%) en présence de SDS	58
2.3.2.2	Transfert des protéines	58
2.3.2.3	Coloration des protéines	60
2.3.2.4	Détection immunologique	60
2.4	Purification des anticorps	61
2.4.1	Précipitation au sulfate d'ammonium	61
2.4.2	Chromatographie FPLC d'échange d'anions	61
2.4.3	Chromatographie d'affinité sur protéine A-Sepharose	61
2.4.4	Chromatographie d'immuno-affinité	62
2.4.4.1	Préparation de l'immuno-adsorbant	62
2.4.4.2	Immunopurification des anticorps	63
2.5	Inhibition des propriétés du TGF- β 1 <i>in vitro</i> par les antisérums et les anticorps purifiés	63
2.5.1	Induction de la croissance de cellules NRK-49F en agar semi-solide	63
2.5.2	Fixation de TGF- β 1 radiomarqué au récepteur cellulaire	64

2.5.3	Inhibition de l'incorporation de thymidine tritiée par les cellules CCL64	64
2.6	Utilisation des antisérums en immuno-electrodifusion	64
2.7	Utilisation des anticorps immunopurifiés en immunohisto- et -cytochimie	66
3	Purification du TGF- β 1 humain d'origine plaquettaire	68
3.1	La source de TGF- β 1	68
3.2	Purification du TGF- β 1 selon la méthode d'Assoian	69
3.2.1	Lyse-extraction	69
3.2.2	Filtration sur gel 1 (Biogel P-60 coarse)	70
3.2.3	Filtration sur gel 2 (Biogel P-60 fine)	70
3.2.4	Chromatographie en phase inversée (ProRPC HR 5/10)	71
3.3	Purification du TGF- β 1 selon la méthode de Cone	72
3.3.1	Lyse-extraction	72
3.3.2	Chromatographie d'échange de cations (COOH-Spherodex LS)	72
3.3.3	Chromatographie en phase inversée (ProRPC HR 5/10)	73
3.4	Purification du TGF- β 1 selon la méthode neutre	73
3.4.1	Lyse-extraction	73
3.4.2	Chromatographie d'échange de cations (COOH-Spherodex LS)	73
3.4.3	Chromatographie d'échange d'anions (Q Sepharose FF)	74
3.4.4	Précipitation au sulfate d'ammonium et activation	74
3.4.5	Filtration sur gel (Biogel P-60 fine)	74
3.4.6	Chromatographie en phase inversée (ProRPC HR 5/10)	75
3.4.7	Filtration sur gel HPLC LiChrospher Si DIOL	75
3.4.8	Chromatographie HPLC en phase inversée narrow-bore C4	75
3.5	Utilisation des anticorps en immunopurification du TGF- β 1	76
3.5.1	Préparation de l'immuno-adsorbant	76
3.5.2	Immunopurification du TGF- β 1	76
3.5.3	Chromatographie en phase inversée (ProRPC HR 5/10)	77
4	Analyse du TGF- β 1 purifié	77
5	Dosage des protéines totales par la méthode de Lowry	78

RESULTATS

79-130

1	Méthodes de dosage du TGF- β 1	79
1.1	Test d'activité biologique : induction de la croissance de cellules NRK-49F en agar semi-solide	79

1.2	Dosage par fixation compétitive de TGF- β 1 radiomarqué au récepteur cellulaire	79
1.2.1	Radiomarquage du TGF- β 1	79
1.2.2	Dosage par fixation compétitive	79
1.3	Test d'activité biologique : inhibition de l'incorporation de thymidine tritiée par les cellules CCL64	82
2	Obtention d'anticorps polyclonaux anti-TGF- β	82
2.1	Prédiction d'épitopes continus - Choix d'un peptide synthétique	82
2.2	Immunisation - Production des antisérums	85
2.3	Caractérisation des antisérums	85
2.3.1	ELISA	85
2.3.2	Immunoblotting	88
2.4	Purification des anticorps	88
2.4.1	Precipitation au sulfate d'ammonium	88
2.4.2	Chromatographie FPLC d'échange d'anions	88
2.4.3	Chromatographie d'affinité sur protéine A-Sepharose	89
2.4.4	Chromatographie d'immuno-affinité	89
2.4.4.1	Préparation de l'immuno-adsorbant	89
2.4.4.2	Immunopurification des anticorps	89
2.5	Inhibition des activités biologiques du TGF- β 1 <i>in vitro</i> par les antisérums et les anticorps immunopurifiés	89
2.5.1	Test d'induction de la croissance de cellules NRK-49F en agar semi-solide	91
2.5.2	Test de fixation de TGF- β 1 radiomarqué au récepteur cellulaire	91
2.5.3	Test d'inhibition de l'incorporation de thymidine tritiée par les cellules CCL64	91
2.6	Utilisation des antisérums en immuno-electrodifusion	91
2.7	Utilisation des anticorps immunopurifiés en immunohisto- et -cytochimie	96
3	Purification du TGF- β 1 humain d'origine plaquettaire	96
3.1	Les concentrés plaquettaires humains périmés	96
3.2	Purification du TGF- β 1 selon la méthode d'Assolan	99
3.2.1	Lyse-extraction	99
3.2.2	Filtration sur gel 1	99
3.2.3	Filtration sur gel 2	101
3.2.4	Chromatographie en phase inversée	101
3.2.5	Bilan de purification	101
3.2.6	Caractérisation du TGF- β 1 purifié	101
3.3	Purification du TGF- β 1 selon la méthode de Cone	105

3.3.1	Lyse-extraction	105
3.3.2	Chromatographie d'échange de cations	105
3.3.3	Chromatographie en phase inversee	106
3.3.4	Bilan de purification	106
3.3.5	Caractérisation du TGF- β 1 purifié	106
3.4	Purification du TGF- β 1 selon la methode neutre	110
3.4.1	Lyse-extraction	110
3.4.2	Chromatographie d'échange de cations	110
3.4.3	Chromatographie d'échange d'anions	110
3.4.4	Précipitation au sulfate d'ammonium et activation	114
3.4.5	Filtration sur gel	114
3.4.6	Chromatographie en phase inversée	114
3.4.7	Filtration sur gel HPLC Lichrospher SI DIOL	114
3.4.8	Chromatographie en phase inversee narrow-bore C4	119
3.4.9	Bilan de purification	119
3.4.10	Caracterisation du TGF- β 1 purifié	119
3.5	Immunopurification du TGF- β 1	122
3.5.1	Preparation de l'immuno-adsorbant	122
3.5.2	Immunopurification du TGF- β 1	122
3.5.2.1	Extrait neutre active	122
3.5.2.2	Extrait de Cone	122
3.5.2.3	Fractions derivees de la purification du TGF- β 1 selon la methode neutre	126
3.5.3	Caracterisation du TGF- β 1 immunopurifié	126
DISCUSSION		131-156
1	Méthodes de dosage du TGF- β 1	131
1.1	Induction de la croissance de cellules NRK-49F en agar semi-solide	133
1.2	Fixation compétitive de TGF- β 1 radiomarqué au récepteur cellulaire	134
1.3	Inhibition de l'incorporation de thymidine tritiée par les cellules CCL64	134
2	Obtention d'anticorps polyclonaux anti-TGF- β	134
2.1	Prédiction d'épitopes continus - Choix d'un peptide synthétique	135
2.2	Immunisation - Production des antisérums	136
2.3	Caractérisation des antisérums	137
2.3.1	ELISA	137



2.3.2	Immunoblotting	137
2.4	Purification des anticorps	137
2.5	Inhibition des activités biologiques du TGF- β 1 <i>in vitro</i> par les antiserums et les anticorps immunopurifiés	138
2.6	Utilisation des antiserums en immuno-electrodifusion	139
2.7	Utilisation des anticorps immunopurifiés en immunohisto- et -cytochimie	140
3	Purification du TGF- β 1 humain d'origine plaquettaire	145
3.1	La source de TGF- β 1	145
3.2	Purification du TGF- β 1 selon la méthode d'Assoian	147
3.3	Purification du TGF- β 1 selon la méthode de Cone	148
3.4	Purification du TGF- β 1 selon la méthode neutre	149
3.5	Immunopurification du TGF- β 1	151
	Conclusion générale - Perspectives	155
	BIBLIOGRAPHIE	157-180

FIGURES ET TABLEAUX



	Page
Figures :	
1. Structure proposée du complexe latent de haut poids moléculaire du TGF- β 1 humain d'origine plaquettaire (L-TGF- β 1)	29
2. Le TGF- β et la matrice extra-cellulaire	34
3. Notice accompagnant un échantillon de TGF- β 1 humain d'origine plaquettaire du commerce (R & D Systems, Minneapolis, MN, USA)	47
4. Dosage biologique du TGF- β 1 par induction de la croissance de cellules NRK-49F en agar semi-solide	80
5. Dosage du TGF- β 1 par fixation compétitive au récepteur cellulaire	81
6. Dosage biologique du TGF- β 1 par inhibition de l'incorporation de thymidine tritiée par les cellules CCL64	83
7. Prédiction d'épitopes continus - Choix d'un peptide synthétique	84
8. Titrage d'un antisérum par ELISA	86
9. Immunoblotting et tests de blocage	88
10. Immunopurification des anticorps anti-C-91-106	90
11. Effet des anticorps sur les propriétés biologiques du TGF- β 1 : induction de la croissance des cellules NRK-49F en agar semi-solide	92
12. Effet des anticorps sur les propriétés biologiques du TGF- β 1 : fixation de TGF- β 1 radiomarqué au récepteur cellulaire	93
13. Effet des anticorps sur les propriétés biologiques du TGF- β 1 : inhibition de l'incorporation de thymidine tritiée par les cellules CCL64	94
14. Immuno-électrodifusion	95
15. Détection immunohistochimique du TGF- β par les anticorps immunopurifiés	97-98
16. Filtration sur gel 1	100
17. Filtration sur gel 2	102
18. Chromatographie en phase inversée	103
19. Analyse SDS-PAGE (gradient 8-25%) avec coloration argentique du TGF- β 1 purifié selon la méthode d'Assoian	105
20. Chromatographie d'échange de cations	107
21. Chromatographie en phase inversée	108
22. Analyse SDS-PAGE (gradient 8-25%) avec coloration argentique du TGF- β 1 purifié selon la méthode de Cone	106
23. Lyse - extraction neutre des concentrés plaquettaires	111
24. Conditions d'élution du L-TGF- β 1 du support échangeur d'anions : Q Sepharose Fast Flow	112
25. Chromatographie d'échange d'anions	113
26. Conditions d'activation par acidification du L-TGF- β 1 après précipitation au sulfate d'ammonium	115
27. Filtration sur gel	116



28.	Chromatographie en phase inversée	117
29	Filtration FPLC sur gel HPLC Lichrospher Si DIOL	118
30.	Chromatographie HPLC en phase inversee narrow-bore C4	120
31.	Analyse SDS-PAGE (gradient 8-25%) avec coloration argentique du TGF- β 1 purifié selon la méthode neutre	119
32	Immunopurification du TGF- β 1 à partir d'un extrait plaquettaire neutre active	123
33	Chromatographie en phase inversee de TGF- β 1 immunopurifié	127
34	Analyse SDS-PAGE (gradient 8-25%) avec coloration argentique de différentes préparations de TGF- β 1 immunopurifié	130

Tableaux :

I	Utilisations cliniques potentielles de facteurs de croissance selon Bronchud et Dexter (1989, 16)	19
II	Les facteurs de croissance plaquettaires selon Miyazono et Takaku (1989, 127)	20
III	Protocole d'immunisation - titrage des antisérums produits	87
IV	Bilan de purification selon la méthode d'Assoian (vingt cinq concentrés)	104
V	Bilan de purification selon la méthode de Cone (deux cent concentrés)	109
VI	Bilan de purification selon la méthode neutre (deux cent concentrés)	121
VII	Bilan d'immunopurification du TGF- β 1 à partir d'un extrait plaquettaire neutre activé	124
VIII	Bilan d'immunopurification du TGF- β 1 à partir d'un extrait plaquettaire de Cone et adsorptions non spécifiques	125
IX	Bilan d'immunopurification du TGF- β 1 à partir d'une fraction de la méthode neutre : après précipitation au sulfate d'ammonium	128
X	Bilan d'immunopurification du TGF- β 1 à partir d'une fraction de la méthode neutre : après filtration sur Biogel P-60	129



ABBREVIATIONS

ACTH	:	adrenocorticotropic hormone
ADNc	:	acide desoxyribonucleique complémentaire
AEC	:	3-amino-9-éthylcarbazole
AIAC	:	éthanol 60% - acide acétique 0,5 N
ARNm	:	acide ribonucleique messenger
B-DAR	:	anticorps biotinylés d'âne anti-IgG de lapin
BMP	:	bone morphogenetic protein
BSA	:	serum albumine bovine
β-TG	:	béta-thromboglobuline
CIF	:	cartilage inducing factor
CSF	:	colony stimulating factor
cpm	:	coups par minutes
CTAP-III	:	connective tissue activating peptide-III
DHFR	:	dihydrofolate réductase
DMEM	:	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	:	diméthylsulfoxyde
DPP-C	:	decapentaplegic gene complex
DTT	:	dithiotreitol
ED₂	:	eau bidistillée
EGF	:	epidermal growth factor
ELISA	:	enzyme-linked immunosorbent assay
FGF	:	fibroblaste growth factor
FPLC	:	fast protein liquid chromatography
FSH	:	follicle-stimulating factor
GDF-1	:	growth/differentiation factor-1
G-CSF	:	granulocyte colony stimulating factor
GM-CSF	:	granulocyte-macrophage colony stimulating factor
GppNHp	:	guanosine 5'-I β,γ - imido I triphosphate
HEPES	:	(N- [2-hydroxyethyl] piperazine-N'- [2-ethanesulfonic acid])
HGF	:	hepatic growth factor
hGF	:	human growth hormone
HPLC	:	high pressure liquid chromatography
HRP-StAv	:	complexe horseradish peroxidase-streptavidine
ID	:	intradermique
IED	:	immuno-électrodifusion
IEF	:	iso-electrofocalisation
IFN	:	interféron
Ig(G, A, M)	:	immunoglobulines de classes G, A ou M
IGF	:	insuline growth factor
IL	:	interleukine
IM	:	intramusculaire
kDa	:	kiloDalton



KLH	:	keyhole limpet hemocyanine
LAP	:	latency associated peptide
LDL	:	low density lipoprotein
LLC	:	large latent complex
L-TGF-β1	:	human platelet TGF- β 1 latent high molecular weight complex
MEM	:	minimal essential medium
MGSA	:	melanoma growth stimulatory activity
MIS	:	mullerian inhibiting substance
NGF	:	nerve growth factor
OVA	:	ovalbumine
PAI	:	plasminogen activator inhibitor
PBS	:	phosphate buffered saline
PD-ECGF	:	platelet-derived endothelial growth factor
PDGF	:	platelet-derived growth factor
PEG	:	polyéthylène glycol
PF4	:	platelet factor 4
PHA	:	phytohémagglutinine A
pi	:	point isoélectrique
PM	:	poids moléculaire
PMSF	:	phenylmethylsulfofluoride
PRP	:	platelet rich plasma
RIA	:	radio-immuno-assay
RMN	:	résonance magnétique nucléaire
SDS-PAGE	:	sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
SELISA	:	sandwich enzyme-linked immunosorbent assay
SGF	:	sarcoma growth factor
SLC	:	small latent complex
STI	:	soybean trypsin inhibitor
SVF	:	sérum de veau foetal
SVNN	:	sérum de veau nouveau-né
TCA	:	acide trichloro-acétique
TGF-α	:	transforming growth factor-alpha
TGF-β	:	transforming growth factor-beta
TFA	:	acide trifluoro-acétique
TIMP	:	thiol inhibitory metalloprotease
TMB	:	3, 3', 5, 5' tetra-méthylbenzidine
TNF	:	tumor necrosis factor
Tris	:	(tris [hydroxyméthyl] -aminométhane)
UV	:	ultra-violet



INTRODUCTION

1. Les facteurs de croissance

1.1 Définition

Les **facteurs de croissance** peuvent être définis comme des polypeptides qui stimulent la prolifération cellulaire par le biais de leur fixation à des récepteurs membranaires, spécifiques, de haute affinité.

1.2 Mécanismes endocrine, paracrine et autocrine

Ces facteurs de croissance diffèrent des hormones polypeptidiques comme par exemple, l'insuline ou l'ACTH, non seulement par la nature de la réponse induite mais aussi par le mode de délivrance de la cellule sécrétante à la cellule cible. Il ne s'agit généralement pas d'effet endocrine mais probablement d'une diffusion limitée à travers les espaces intercellulaires et d'une action localisée. En effet, dans le modèle **endocrine**, le facteur de croissance exerce son action sur la cellule cible souvent par l'intermédiaire d'une molécule "porteuse", d'un système de transporteur. Le départ étant une cellule ou un organe producteur, la cellule cible se trouve ensuite atteinte par le facteur de croissance grâce à ce transporteur.

Il est souvent fait mention au sujet des facteurs de croissance aux modèles autocrine et/ou paracrine.

Le mode **paracrine** se retrouve dans les phénomènes de sécrétion par des cellules proximales qui vont stimuler, par leurs facteurs de croissance, la prolifération des cellules voisines. C'est le cas des cellules cancéreuses qui pourraient stimuler la prolifération des cellules du stroma tumoral (fibroblastes, cellules vasculaires...), passage obligé pour le développement de tumeurs de grande taille. Alternativement, les cellules du stroma pourraient produire des facteurs de croissance qui stimulent les cellules cancéreuses. Cette situation où les composants tumoraux (cellules néoplasiques et du stroma) interagissent les uns avec les autres par le biais des facteurs de croissance (et autres molécules), pourrait expliquer, dans certains cas, l'impossibilité de cultiver, *in vitro*, des cellules (de certains carcinomes) présumées malignes.

Le mode **autocrine** a été proposé, assez récemment, comme un des mécanismes d'action des facteurs de croissance. Il a pu être démontré, *in vitro*, que des cellules tumorales sécrétaient dans le milieu de culture un certain nombre de substances capables d'induire leur propre multiplication. En fait, ce phénomène est assez général et dépasse le niveau des cellules tumorales. Le modèle autocrine de la sécrétion et de l'**autostimulation** par les facteurs de croissance d'une cellule est un des modèles qui a été proposé pour expliquer la transformation cellulaire. Ainsi, une cellule sécrète des facteurs de croissance. Le(s) mécanisme(s) qui contrôle(nt) et qui régule(nt) cette sécrétion se

trouve(nt) brusquement altéré(s) par un (des) mécanisme(s) inconnu(s) (pouvant être lié(s) à une mutation, à un virus oncogène...). Un ou plusieurs facteurs sécrétés vont pouvoir stimuler la propre prolifération de cette cellule. Il y a donc, ici, une notion de **régulation** dont il est possible d'affecter les facteurs de croissance. Ils sont des **régulateurs de la croissance et de la différenciation cellulaires**, *in vitro*, mais certainement aussi, *in vivo* (Goustin et coll. 1986, 64 ; Barritault 1989, 11)

1.3 Besoin des cellules en facteurs de croissance

Les cellules non transformées, en culture, nécessitent absolument pour proliférer des facteurs de croissance. Dans des conditions standards de culture, *in vitro*, les facteurs de croissance apportés par le **serum de veau foetal** disparaissent plus rapidement que les autres composants du milieu de culture. Il constitue donc un **facteur limitant**. La perte ou la diminution de cette exigence pour des facteurs de croissance est un phénomène courant chez les cellules transformées et néoplasiques, ceci pouvant conduire à une croissance facilitée, caractéristique fondamentale des cellules cancéreuses (Goustin et coll. 1986, 64). Des facteurs de croissance sont donc présents dans le sérum de veau foetal (d'une façon plus générale dans le sérum) ainsi que dans le milieu de certains types cellulaires en culture.

1.3.1 Bref historique des facteurs de croissance

L'historique des facteurs de croissance du sérum est très longue puisqu'elle s'étend depuis les premières notions où le plasma (Carrel et Baker 1926, 24 ; Carrel 1928, 23) ou des facteurs sériques étaient capables de stimuler la croissance de cellules de grenouille (Harrison 1907, 68) ou de poulet, jusqu'à l'identification de polyanions sériques, spécifiques, associés à l'activité mitogénique (Temin 1966, 178). La caractérisation, même grossière, de ces facteurs de croissance sériques était difficile mais déjà, S. Balk (1971, 9) pensait que **les thrombocytes (plaquettes) étaient la source des molécules mitogènes, sériques** jusqu'à ce qu'il fut démontré que les plaquettes contenaient au moins une molécule capable de stimuler la prolifération de cellules musculaires lisses (Ross et coll. 1974, 157) et de fibroblastes (Kohler et Lipton 1974, 98). Plusieurs laboratoires s'attelèrent alors à la difficile tâche d'isoler des quantités suffisantes de ce facteur de croissance dérivé des plaquettes (**platelet-derived growth factor, PDGF**) pour analyser sa séquence en acides aminés. Les projets de purification demandèrent plus de cinq ans (Heldin et coll. 1979, 72 ; Antoniades et coll. 1979, 2). Deux courants de recherche ayant débuté au début du siècle : la transformation virale (Rous et Jones 1916, 158) et la culture cellulaire (Carrel 1913, 22 ; Harrison 1907, 68) se rejoignèrent lorsqu'il fut démontré que le PDGF et le produit de l'oncogène viral *v-src* étaient des molécules similaires (Waterfield et coll. 1983, 197 ; Antoniades et Hunkapiller 1983, 3 ; Doolittle et coll. 1983, 48), (Burgess 1988, 19).

1.3.2 Utilisations des facteurs de croissance

Comme déjà mentionné précédemment, **les cellules ont une exigence en facteurs de croissance pour leur multiplication en culture, *in vitro***

Ceux-ci sont apportés de façon courante par l'addition de sérum de veau aux milieux de culture. Avec l'essor des biotechnologies, des cultures cellulaires de grande envergure sont devenues essentielles. Il y a donc des besoins très importants en sérum de veau foetal. Mais celui-ci est d'un prix de revient important et l'homogénéité des lots est tout à fait relative. Les contraintes économiques font qu'il apparait une nette orientation vers des cultures en **milieux à composition dite définie**. Outre l'aspect économique, les avantages de reproductibilité, de diminution des contraintes sanitaires, de purification post-culture facilitée... sont nombreux.

Or, les facteurs de croissance sont un des éléments clé de ces nouveaux milieux synthétiques ou plus exactement, de composition définie. Gospadorowicz et Moran (1976, 63) ont démontré le rôle des facteurs de croissance dans les cultures cellulaires. Hayashi et Sato (1976, 70) ont tenté de remplacer le sérum par des combinaisons d'hormones et de facteurs de croissance appropriées à différents types cellulaires.

Outre les milieux de culture, les **recherches fondamentales** exigent des **réactifs** hautement purifiés pour mieux appréhender le rôle individuel d'une substance particulière, comme un facteur de croissance, dans des mécanismes normaux ou pathologiques avec des implications futures : préventive, diagnostique, pronostique et bien sûr, thérapeutique.

Réactifs de recherche ou de biologie médicale, ces facteurs de croissance auront certainement donc un bel avenir en **thérapeutique**. Déjà, des préparations biologiques constituées des éléments plaquettaires relargués par dégranulation artificielle, *in vitro*, ou des facteurs de croissance/facteurs angiogéniques placentaires (PGFs) sont utilisées, *in vivo*, en chirurgie et dans l'aide à la cicatrisation (Burgos et coll. 1989, 20). Sans oublier, bien sûr, l'érythropoïétine et les interférons, interleukines déjà utilisés en thérapeutique (hémodialyse et cancers).

Modulation (stimulation ou inhibition) de la croissance, de la différenciation, des défenses de l'organisme, immunothérapie (anticorps monoclonaux anti-facteur de croissance ou anti-récepteur, immunotoxines)... sont autant de nouvelles armes potentielles dans l'arsenal thérapeutique de demain.

De nouvelles voies pharmacologiques s'ouvrent par la **compréhension de la structure/fonction** détaillée de ces molécules. En effet, des molécules modifiées sont envisagées et déjà développées en recherche. Il s'agit d'**antagonistes** ou bien de chimères entre un facteur de croissance (ou une partie seulement, un site de fixation au récepteur) et une molécule

thérapeutique (toxine naturelle ou synthétique) (Chaudary et coll. 1987, 28) : les **crinotoxines**.

Bronchud et Dexter (1989, 16) résument les objectifs majeurs des utilisations cliniques potentielles de facteurs de croissance (tableau I) Il est à noter que le TGF- β pourrait être mentionné dans plusieurs des applications citées.

Toutes ces perspectives dépendent aussi de la mise en évidence, de la purification et de la caractérisation des facteurs de croissance. Une voie royale de production est bien évidemment la biologie moléculaire mais le génie génétique ne produit et ne produira probablement pas, par recombinaison, toutes les protéines de fonctionnalité identique à la forme naturelle, notamment, les complexes (ou combinaisons) de fonctionnalité ou de délivrance optimales.

2 Les facteurs de croissance plaquettaires

Comme l'avait déjà prédit S. Balk en 1971 (9), **les plaquettes sont une source importante de facteurs de croissance et jouent un rôle fondamental dans leur biologie (mobilisation rapide au site de dommage)**. Du PDGF jusqu'au platelet-derived endothelial cell growth factor, PD-ECGF, il a été purifié à partir des plaquettes, six facteurs de croissance présentés dans le tableau II.

Le **platelet-derived growth factor (PDGF)** est un dimère chaînes A et/ou B, avec ponts disulfure, synthétisé par les mégakaryocytes de la moelle osseuse, localisé dans les granules alpha des plaquettes humaines (hétérodimère A-B prédominant), relargué après leur agrégation. La moitié de l'activité mitogénique, plaquettaire, humaine, pour les cellules mésenchymateuses est due au PDGF. C'est une protéine très stable, résistante à la chaleur et aux pH extrêmes mais sensible aux agents réducteurs. La chaîne B est transcrite par le gène *c-sis*. La chaîne A possède une homologie de structure primaire de 60% avec la chaîne B, avec conservation des huit résidus cystéines. Il s'agit d'un stimulateur .

- de la croissance de cellules d'origine mésenchymateuse
 mais aussi des cellules épithéliales, endothéliales ou des lymphocytes
- du chimiotactisme des fibroblastes, des cellules musculaires lisses vasculaires et des neutrophiles sanguins

(PDGF-AA est moins mitogène et chimiotactique que PDGF-BB et PDGF-AB).

Il existe deux types de récepteurs : types A et B. Seul, le type B possède une activité tyrosine kinase et joue un rôle majeur dans la médiation des effets mitogéniques du PDGF.

Ce facteur de croissance joue certainement un rôle central dans divers processus physiologiques et pathologiques comme l'embryogénèse, la

Tableau I : Utilisations cliniques potentielles de facteurs de croissance (Bronchud et Dexter 1989, 16).

I Régénération des tissus normaux

1. Anémie des pathologies chroniques : érythropoïétine
2. Neutropénie induite par chimiothérapie, facteurs de croissance myéloïdes (CSF)
3. Régénération épithéliale : epidermal growth factor (EGF)
4. Autres : - fractures osseuses (facteurs de croissance et de différenciation osseux)
- neuropathies périphériques (nerve growth factors, NGF)

II. Immunothérapie du cancer

1. Interférons (IFN)
2. Interleukine-2 (IL-2)
3. Tumor necrosis factor (TNF)
4. Facteurs de croissance myéloïdes (CSF)

III Aide à la cicatrisation

1. Platelet-derived growth factor (PDGF)
2. Fibroblast growth factors (FGF)

IV. Correction des déficiences en facteurs de croissance : thérapie de remplacement

1. Anémie des déficiences rénales chroniques : érythropoïétine
2. Nanisme : hormone de croissance humaine (hGF) et somatomédines
3. Neutropénies cycliques : facteurs de croissance myéloïdes (CSF)

V. Contrôle de la prolifération anormale : anti-facteurs de croissance

1. Inhibiteurs de la synthèse des facteurs de croissance (cyclosporine A)
2. Facteurs de croissance "négatifs" (transforming growth factor-beta, TGF- β)
3. Anticorps monoclonaux (anti-facteurs de croissance ou anti-récepteurs de facteurs de croissance)
4. Antagonistes synthétiques
5. Crinotoxines (conjugués entre facteurs de croissance et puissantes toxines cellulaires)

Tableau II : Les facteurs de croissance des plaquettes (Miyazono et Takaku 1989,127).

Nom	PM (kDa)	pl	activité sur la croissance cellulaire
PDGF	30	10	stimulation : fibroblastes, cellules musculaires lisses, cellules gliales
PD-ECGF	45	4,8	stimulation : cellules endothéliales
TGF-β	25	basique	stimulation : quelques fibroblastes inhibition : cellules épithéliales, cellules endothéliales
HGF	82	basique	stimulation : hépatocytes
EGF-like protein	6 (EGF) 33	3,8-4,5	stimulation : cellules épithéliales, cellules mésenchymateuses
CTAP-III	9,3	8,5	stimulation : cellules synoviales, fibroblastes

PDGF, platelet-derived growth factor ; **PD-ECGF**, platelet-derived-endothelial cell growth factor ; **TGF- β** , transforming growth factor beta ; **HGF**, hepatocyte growth factor ; **EGF**, epidermal growth factor ; **CTAP-III**, connective tissue activating peptide-III.

cicatrisation, l'athérosclérose, les désordres fibrotiques et la croissance tumorale.

Le **platelet-derived endothelial cell growth factor (PD-ECGF)** mis en évidence et purifié plus récemment, semble jouer un rôle important dans la croissance et le métabolisme des cellules endothéliales vasculaires.

Il s'agit d'une protéine monomérique, non sécrétoire (absente des granules alpha des plaquettes), labile par chauffage (65°C) ou exposition à pH extrêmes mais résistante aux agents réducteurs. Bien que son action soit renforcée par l'héparine exogène, elle n'a pas d'affinité pour celle-ci.

Mitogène des cellules endothéliales vasculaires (aortes porcine et bovine, capillaires pulmonaires murins et veine ombilicale humaine) mais pas des fibroblastes, c'est une substance chimiotactique spécifique des cellules endothéliales.

Son activité angiogénique laisse supposer un rôle dans les processus d'embryogénèse, de cicatrisation, de régénération tissulaire et de croissance tumorale mais aussi dans les pathologies angiogéniques, non néoplasiques, comme la rétinopathie diabétique, l'arthrite rhumatoïde, le psoriasis et l'hémangiome.

L'**hepatocyte growth factor (HGF)** purifié à partir des plaquettes de rat est un hétérodimère (sous unités 69 et 34 kDa) avec ponts disulfure, acido- et thermolabile. C'est un mitogène relativement spécifique des hépatocytes et pourrait jouer un rôle central dans la régénération hépatique après hépatectomie ou lésion du foie.

L'**epidermal growth factor (EGF)** est un peptide purifié à l'origine, à partir des glandes sous-maxillaires de souris, stimulant la croissance des cellules épithéliales et mésenchymateuses, *in vitro* L'EGF humain a été purifié à partir des urines et du plasma. Ensuite, il fut démontré que l'"EGF-like protein" était sécrétée par les plaquettes. Les structures des protéines urinaire et plaquettaire apparaissent différentes. Le transforming growth factor- α (TGF- α) de structure apparentée à l'EGF, stimule la croissance des cellules endothéliales, *in vitro* et l'angiogénèse, *in vivo* La structure et l'activité, *in vivo*, de la "platelet-derived EGF-like protein" restent à définir.

Le **connective tissue activating peptide-III (CTAP-III)**, le platelet factor-4 (PF-4) et la β -thromboglobuline (β -TG) sont des protéines présentes dans les granules alpha des plaquettes, dérivées d'un même peptide précurseur.

Le CTPA-III stimule la croissance des cellules synoviales et des fibroblastes. Le PF-4 augmente le chimiotactisme des monocytes, des neutrophiles et des fibroblastes et inhibe la mégakaryocytopoïèse. Cependant, les concentrations de CTPA-III nécessaires à une activité mitogénique et celles de PF-4 pour une inhibition de la mégakaryocytopoïèse sont élevées comparées à celles effectives pour d'autres facteurs de croissance.

Ces molécules possèdent une surprenante homologie de structure primaire avec les produits de petits gènes comme JE et KC, rapidement induits après l'addition de PDGF. KC est le gène murin correspondant à la melanoma growth stimulatory activity (MGSA) stimulant la croissance, *in vitro*, de cellules de melanome.

Ces observations indiquent que le CTPA-III et d'autres substances apparentées des granules alpha plaquettaires sont relarguées après activation plaquettaire et promeuvent la cicatrisation des tissus lésés de concert avec le PDGF et d'autres facteurs de croissance (Miyazono et Takaku 1989, 127).

3 Le transforming growth factor-beta (TGF- β)

3.1 Découverte

En 1978, De Larco et Todaro (1978, 42) rapportaient que des cellules 3T3 de souris, transformées par le virus du sarcome de Moloney produisaient des facteurs de croissance polypeptidiques appelés **sarcoma growth factors (SGF)**, sécrétés dans le milieu de culture et possédant la propriété particulière d'**induire un phénotype "transformé"** chez des cellules test non néoplasiques comme les fibroblastes de rein de rat NRK-49F. Ce phénotype se caractérisait par la perte de la croissance densité-dépendante en culture monocouche (avec augmentation de celle-ci) et, le plus important, l'acquisition de la possibilité de cultiver sans le substrat habituellement indispensable : l'**"anchorage independence"**.

Cette dernière propriété se traduit par la formation de colonies cellulaires ou clones en milieu agar semi-solide fortement corrélée avec la tumorigénicité des fibroblastes, *in vivo*, (Kahn et Shin 1979, 89 ; Cifone et Fidler 1980, 33).

Cette **activité transformante** des SGF sur les cellules NRK était uniquement **phénotypique et réversible**. Les cellules NRK recouvraient leur morphologie et leur propriété de croissance normales après que le SGF fut retiré du milieu de culture.

Par la suite, Todaro et coll. (1980, 182) observaient une activité transformante similaire dans le milieu conditionné de plusieurs cellules cancéreuses humaines et d'une variété de cellules de rat et de souris transformées par le virus du sarcome de Kirsten. Toutes ces activités transformantes possédaient la propriété de compétition avec l'epidermal growth factor (EGF) pour sa fixation au récepteur cellulaire de surface.

A la même période, Roberts et coll. (1980, 144) introduisaient l'utilisation d'éthanol acide pour extraire les peptides transformants des cellules tumorales. Le terme **transforming growth factor (TGF)** faisait alors son apparition car ces peptides à activité similaire pouvaient être extraits d'une grande variété de cellules tumorales. Cette activité TGF pouvait aussi être extraite de tous les tissus normaux de la souris, particulièrement si de l'EGF était ajouté dans le milieu du test de transformation, bien que celui-ci ne puisse pas induire de transformation par lui même (Roberts et coll. 1981,

145). Il fut alors suggéré que ces peptides extraits de tissus non néoplasiques et nécessitant de l'EGF pour induire la croissance des cellules NRK-49F en agar semi-solide représentaient une nouvelle classe de TGF.

Peu de temps après, des peptides aux propriétés similaires furent mis en évidence dans du sérum normal et les plaquettes sanguines (Childs et coll. 1982, 32).

Il était nécessaire de définir d'un point de vue biochimique et fonctionnel ce terme TGF. La HPLC clarifia rapidement toutes les ambiguïtés. Deux types majeurs de TGF furent isolés et définis en utilisant comme cellules-test la lignée de fibroblastes NRK-49F (Anzano et coll. 1982, 4 ; Roberts et coll. 1983, 147) :

- les peptides entrant en **compétition avec l'EGF** pour sa fixation au récepteur mais ne nécessitant **pas l'addition d'EGF** dans le test d'induction de croissance en agar semi-solide : **TGF- α**
- les peptides **non compétiteurs de l'EGF** mais **exigeant une addition d'EGF** (ou de TGF- α) dans ce test : **TGF- β**

De plus, il fut démontré que dans ce test, ni l'EGF, ni le TGF- α n'induisaient la formation de colonies cellulaires en agar semi-solide mais qu'il y avait une totale dépendance à la présence de TGF- β (Anzano et coll. 1982, 4). Donc, l'activité transformante originale SGF résultait de la **présence concomitante de TGF- α et de TGF- β** dans le milieu conditionné des cellules transformées par le virus du sarcome de Moloney. Les peptides séparés, l'activité dans le test NRK était perdue. Réassociés, l'activité était restaurée (Anzano et coll. 1983, 4).

Grâce à ces nouveaux éléments, il fut possible de purifier et caractériser le TGF- β presque simultanément dans trois sources : les plaquettes humaines (Assoian et coll. 1983, 6), le placenta humain (Frolik et coll. 1983, 58) et le rein de boeuf (Roberts et coll. 1983, 146). Un **peptide homodimérique de 25 kDa** (après réduction, 2 sous unités ou monomères de 12,5 kDa) possédant une séquence N terminale identique fut identifié dans les trois sources (Roberts et Sporn 1988, 152).

3.2 Biochimie et Biologie moléculaire

NB : La partie de l'introduction, ci-dessous, est largement inspirée de l'excellente revue de Roberts et Sporn (1990, 153).

3.2.1 Essais biologiques

Durant toutes les étapes de l'identification du SGF, il a été utilisé le seul système facteur de croissance/récepteur disponible à cette époque (système EGF). L'autre élément important était la perte de l'"anchorage dépendance",

induction de la formation de colonies cellulaires en agar semi-solide. Il est donc clair que l'**activité biologique** et le **test associé** ont joué un **rôle fondamental dans la découverte, la purification et la caractérisation de ces facteurs de croissance** et plus particulièrement du TGF- β .

Cette observation s'est à nouveau confirmée plus tard lorsque de nouveaux peptides, facteurs de croissance, furent purifiés en utilisant d'autres essais biologiques. Mais en fait, il ne s'agissait que de re-purification de TGF- β : selon le type cellulaire et le schéma de purification, le TGF- β 1 ou son homologue le TGF- β 2.

Par exemple, le TGF- β 1 (cartilage inducing factor-A, CIF-A) a été également purifié à partir d'os de boeuf par évaluation de l'état de différenciation de cellules primitives originaires du mésenchyme, exprimant un phénotype du tissu cartilagineux (Seyedin et coll. 1985, 166 ; 1986, 167). Le TGF- β 2 (cartilage inducing factor-B, CIF-B) fut isolé à partir d'os de boeuf en utilisant le même type d'essai (Seyedin et coll. 1985, 166 ; 1987, 168) mais aussi par inhibition de la croissance de cellules épithéliales pulmonaires de vison (Mv1Lu ou CCL64), (Ikeda et coll. 1987, 82) ou inhibition de la mitose de thymocytes de souris C3H/HeJ (glioblastoma-derived T cell suppressor factor, Wrann et coll. 1987, 201). L'identification TGF- β était apportée par le séquençage en acides aminés.

Ces activités biologiques si différentes et variées laissent sous entendre la **multifonctionnalité du TGF- β** et soulignent l'importance de la quantification aussi spécifique que possible de l'activité TGF- β .

3.2.2 Les transforming growth factor-beta

3.2.2.1 TGF- β 1 et TGF- β 2

Comme mentionné précédemment, le TGF- β 1 a été purifié, à l'origine, à partir de **plaquettes humaines** qui contiennent **exclusivement la forme TGF- β 1**. Elles en représentent la **source naturelle la plus concentrée** (20 mg/Kg, Van Den Eijnden-Van Raaij et coll. 1988, 186).

Le tissu osseux représente la source de TGF- β la plus riche (en quantité absolue) de l'organisme : 0,3 mg/Kg (Seyedin et coll. 1985, 166 ; 1986, 167 ; 1987, 168). Pour comparaison, les tissus "mous" comme les reins ou le placenta, en contiennent 3-5 μ g/Kg (Frolik et coll. 1983, 58 ; Roberts et coll. 1983, 146).

La seconde forme TGF- β 2 fut isolée des plaquettes porcines (Chelifetz et coll. 1987, 29), d'os bovins (Seyedin et coll. 1985, 166 ; 1987, 168), de cellules de glioblastome humain (Wrann et coll. 1987, 201) et de cellules BSC-1 de singe (Hanks et coll. 1988, 66).

Le clonage de ces peptides démontra que le TGF- β 1 se trouve sous la forme d'un **précurseur de trois cent quatre vingt dix acides aminés**

aminés (Derynck et coll. 1985, 45) alors que pour la forme TGF- β 2, il s'agit d'un précurseur de quatre cent douze acides aminés (De Martin et coll. 1987, 43 ; Madisen et coll. 1988, 117). Tous deux possèdent un **peptide signal** de vingt à vingt trois résidus en région N terminale.

Les **monomères de cent douze acides aminés** possèdent une homologie de 72%, incluant la conservation des **neuf résidus cystéine**

Les propriétés biologiques des deux formes sont souvent communes.

Le rapport TGF- β 1/TGF- β 2 peut être très différent comme, par exemple, 4/1 dans les plaquettes porcines ou l'os bovin et 9/10 ou 10/9 dans les formes sécrétées par les lignées cellulaires. Une faible proportion de la forme hétérodimérique TGF- β 1.2 est présente dans les plaquettes porcines ou sécrétée par certaines cellules en culture.

3.2.2.2 Autres TGF- β

Trois nouvelles formes ont été identifiées par utilisation de librairies ADNc. Ces peptides n'ont pas été purifiés à partir de sources naturelles mais les ARNm correspondants ont été caractérisés par Northern blotting.

Il s'agit du TGF- β 3 trouvé chez des cellules normales ou cancéreuses, humaines, porcines ou de rongeur. Ou encore, dans les chondrocytes d'embryons de poulet dans lesquels il représente le plus abondant ARNm exprimé (Ten Dijke et coll. 1988, 179 ; Derynck et coll. 1988, 47 ; Jakowlew et coll. 1988, 84)

Les TGF- β 4 et 5 ont été clonés respectivement pour des chondrocytes de poulet et des oocytes de grenouille. (Jakowlew et coll. 1988, 85 ; Kondaiah et coll. 1990, 100).

Des **caractères structuraux communs** sont observés parmi ces TGF- β :

- tous sont dérivés d'un précurseur où existe une forte homologie dans la partie N terminale avec conservation des trois résidus cystéine de la portion du précurseur éliminée durant la maturation
- les sites de N glycosylation du précurseur
- le site de reconnaissance cellulaire (Ruoslahti et Pierschbacher 1986, 159) pour la fibronectine/vitronectine (ARG-GLY-ASP, RGD) présent pour toutes les formes sauf TGF- β 2
- un site de maturation de quatre ou cinq acides aminés (site de clivage entre le LAP et le monomère)
- le monomère mature de cent douze résidus sauf pour la forme TGF- β 4 (cent quatorze)
- conservation des neuf résidus cystéine et de la séquence C terminale (CYS-LYS-CYS-SER-COOH, sauf LYS- \rightarrow ASN pour la forme TGF- β 5)

Au total, il existe une homologie de séquence primaire de 60% à 80% entre les divers monomères matures.

3.2.2.3 Fonctions

Pour ce qui concerne la (les) activité(s) biologique(s) de ces nouvelles formes, il semblerait qu'il y ait similitude avec les formes TGF- β 1 et TGF- β 2. Le fait que la forme TGF- β 4 ait un précurseur de seulement trois cent quatre résidus et un des trois ou quatre site de N glycosylation potentielle, suggère une activité biologique, unique, intracellulaire.

L'évolution de ces différentes formes possédant des activités biologiques, similaires pourrait être le résultat d'une régulation différencielle, sous le contrôle d'un promoteur unique.

Les TGF- β 1, 2 et 3 humains sont localisés sur des chromosomes différents (19q13, 1q41 et 14q24) et différentes formes sont exprimées chez des cellules variées. Cela laisse supposer une synthèse alternée des différentes formes, régulée par des mécanismes distincts.

Le contrôle de la **maturation par protéolyse** et l'**activation biologique**, pourraient représenter d'autres points de contrôle.

Il faut souligner que le **TGF- β mature reste biologiquement inactif** ou **latent**. Jusqu'à présent, toutes les formes ont pu être **activées, *in vitro*, par acidification**. Cependant, les mécanismes d'activation physiologiques de ces formes différentes pourraient être spécifiques.

3.2.2.4 Conservation du TGF- β

Il existe une haute **homologie** entre les gènes humain et murin, bovin, porc, simien et du poulet. Les TGF- β 1 actifs, correspondants sont identiques à l'exception d'une substitution en position 75 (ALA- \rightarrow SER) entre les espèces humaine et murine. La même homologie est observée pour les autres formes. Une conservation de plus de 85% est à noter dans la comparaison de la région du précurseur éliminée lors de la maturation. Cette observation laisse supposer une importante fonction du précurseur dans la latence.

Une des conséquences probables de cette grande homologie pour les formes (et les membres de la famille) TGF- β est la difficulté à produire des anticorps bloquant les activités biologiques du TGF- β . Les bases de cette difficulté ne sont pas comprises. Des procédures d'immunisation particulières (co-injection avec d'autres protéines, utilisation de peptides synthétiques...) ont permis de contourner ce problème. Les résultats de l'utilisation de ces anticorps laissent supposer que la région C terminale (la plus conservée parmi tous les membres de la famille) est très importante pour la fixation au récepteur.

3.2.3 Le gène

Le précurseur du TGF- β 1 humain est codé par **sept exons** (Derynck et coll. 1987, 46). Les séquences d'épissage sont conservées pour les gènes bovin et porc. Les positions des séquences de jonction intron/exon du TGF- β 1 sont

conservées pour les formes $\beta 2$ et $\beta 3$, à l'exception de la première qui diffère par trois nucléotides pour la forme $\beta 2$, suggérant que les diverses formes sont originaires d'une duplication d'un gène ancestral commun.

Bien que les **ARNm TGF- β** contiennent environ **mille deux cent nucléotides de séquence codante**, il existe des variants de mille sept cent à six mille cinq cent nucléotides (avec extension des deux extrémités 3' et 5').

Il est à noter un épissage alterné du TGF- $\beta 1$ porcin avec délétion des exons 4 et 5, une séquence C terminale du TGF- β différente en résultant. L'importance de cette particularité dans le contrôle de la transcription et de la traduction du TGF- β n'est pas encore déterminée.

Il existe **deux sites de début de transcription** pour les ARNm TGF- $\beta 1$ distants de deux cent soixante et onze nucléotides. Deux régions promoteur ont été caractérisées : une s'étendant à mille quatre cent paires de bases en amont du premier site de début de transcription et la seconde, localisée entre les deux sites de début de transcription. Dans le promoteur amont, deux régions distinctes de contrôle négatif, une région "enhancer-like" et une région de contrôle positif ont été identifiées.

Le gène du TGF- β a été **cloné** et transfecté dans le **système d'expression cellules CHO**. L'amplification du gène par la voie dihydrofolate reductase (DHFR) permet la production de 6 mg de TGF- $\beta 1$ (Gentry et coll. 1987, 61). Il s'agit du **précurseur glycosylé et phosphorylé**. L'activité biologique du TGF- $\beta 1$ recombinant, sécrété est **latente**, similaire à celle du peptide naturel. Les cellules CHO amènent à maturation de façon tout à fait appropriée, le TGF- β en clivant le peptide signal entre les résidus GLY-29 et LEU-30 tandis que le précurseur est clivé de la forme mature au site basique précédent le résidu ALA-279.

Des constructions plus au moins délétées ont permis de démontrer que la synthèse de TGF- $\beta 1$ biologiquement actif ne peut se dérouler seulement qu'à partir du premier codon ATG (MET) du précurseur, l'impliquant dans la mise en place correcte des ponts disulfure du peptide mature.

Jusqu'à présent, il n'a pas été possible de produire du TGF- $\beta 1$ recombinant, biologiquement actif dans un système d'expression levure ou bactérie.

3.3 La famille TGF- β

Il existe une véritable **famille TGF- β** (Massague et coll. 1987, 121) dont les membres présentent une **homologie structurale primaire** et particulièrement la **conservation de sept des neuf résidus cystéine** présents dans le monomère :

- les formes **TGF- $\beta 1$ à TGF- $\beta 5$**
- les **inhibines** (Mason et coll. 1985, 118 ; Forage et coll. 1986, 57) et **activines** des mammifères (Vale et coll. 1986, 185 ; Ling et coll. 1986,

110)

- la "**Mullerian inhibitory substance**" (**MIS**) (Cate et coll. 1986, 26)
- le produit du "**decapentaplegic gene complex**" (**DPP-C**) (Padgett et coll. 1987, 136)
- le produit d'un gène amphibien (*Xenopus*) exprimé dans des oocytes de grenouille (**Vg1**) (Weeks et coll. 1987, 198)
- la protéine **Vgr1** de souris (Lyons et coll. 1989, 114)
- les trois "**bone morphogenetic proteins**" (**BMP**) (Wozney et coll. 1988, 200 ; Wang et coll. 1988, 196)
- le "**growth/differentiation factor-1**" (**GDF-1**) d'embryon de souris (Lee 1990, 107)

NB : les BMP-2A et 2B sont homologues à 75% avec le produit du DPP-C et pourraient représenter les protéines équivalentes chez les mammifères

Toutes ces substances possèdent la caractéristique particulière de **régulation des processus de développement**. Par exemple, la MIS induit la régression des premières ébauches du système reproducteur femelle dans le système reproducteur mâle en développement. Les inhibines et activines régulent les activités de la gonadotropine et de la FSH.

3.4 Les récepteurs

L'action du TGF- β est liée à sa fixation à des récepteurs cellulaires de surface, spécifiques. Mises à part quelques rares exceptions, cent cinquante types cellulaires différents possèdent des récepteurs TGF- β dont l'affinité s'exprime en concentrations picomolaires (Frolik et coll. 1984, 59 ; Tucker et coll. 1984, 184 ; Massague et coll. 1985, 119 ; Wakefield et coll. 1987, 192). Ceci suppose un **spectre d'action potentiel très étendu**.

L'iodination du TGF- β ne pose aucun problème d'altération de l'activité biologique. Les méthodes de choix sont respectivement pour les formes $\beta 1$ et $\beta 2$, la technique à la chloramine T (Frolik et coll. 1984, 59) et à la lactoperoxydase (Danielpour et coll. 1989, 38).

Le marquage d'affinité du TGF- β (disuccinimidyl subérate) à ses récepteurs cellulaires a révélé **trois classes distinctes** de composés membranaires possédant une haute affinité :

- **classe I** : 65 kDa pour toutes les espèces testées
- **classe II** : 85 (rongeurs), 95 (homme et singes) et 110 kDa (poulet)
Il s'agit de glycoprotéines N glycosylées (les glucides représentant 5 et 15-20 kDa du poids moléculaire (Cheifetz et coll. 1988, 30, 31)
- **classe III** : 250-350 kDa, dimérique, composée de sous-unités glycoprotéiques constituées principalement d'heparan sulfate glycosaminoglycan avec une faible quantité de chondroïtine ou dermatan sulfate liés à une "core" protéine de 100-140 kDa. Le site de fixation

TGF- β étant situé dans cette "core" protéine (Cheifetz et coll. 1988, 31 ; Segarini et Seyedin 1988, 164)

La classe III pourrait se fixer aux composés de la matrice cellulaire jouant ainsi un rôle de modulation dans l'organisation du cytosquelette, deux fonctions corrélées à l'activité du TGF- β sur beaucoup de cellules originaires du mésenchyme.

L'**absence très rare de ces supposés récepteurs** observée chez certaines cellules néoplasiques (phéochromocytome de rat PC12, rétinoblastomes humains, certaines lignées leucémiques) est corrélée avec la **résistance de ces cellules aux effets inhibiteurs du TGF- β** (Kimki et coll. 1988, 96 ; Keller et coll. 1988, 94). Il pourrait s'agir d'un mécanisme par lequel des cellules pré-néoplasiques deviendraient tumorales en échappant à ce contrôle négatif (Sporn et Roberts 1985, 172).

1.3.5 Les formes latentes

Le TGF- β 1 est relargué des plaquettes après dégranulation et sécrété de presque toutes les cellules sous une **forme biologiquement inactive ne pouvant se fixer aux récepteurs cellulaires et non reconnue par les anticorps anti TGF- β** (Pircher et coll. 1986, 141 ; Miyazono et coll. 1988, 125 ; Wakefield et coll. 1988, 193).

L'**activation, *in vitro***, peut être réalisée par **acification, alcalinisation**, action d'**agents chaotropes** ou par **chauffage** (Lawrence et coll. 1985, 105 ; Lyons et coll. 1988, 113 ; Brown et coll. 1990, 18 ; Piao et coll. 1990, 139).

Il est à noter que le TGF- β purifié à partir des plaquettes ou d'os a été exposé à des conditions telles, qu'il se trouve sous forme active de façon permanente. Après purification, la structure du **complexe latent, de haut poids moléculaire plaquettaire, humain du TGF- β 1 (L-TGF- β 1, 210 kDa, figure 1)** a été proposée par Miyazono et coll. (1988, 125) et Wakefield et coll. (1988, 193).

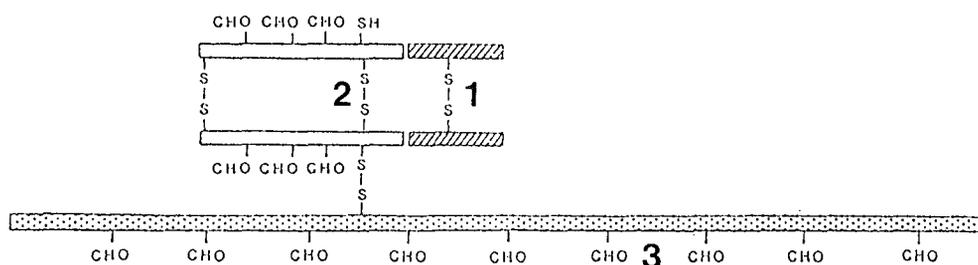


Figure 1 : Structure proposée du complexe latent de haut poids moléculaire du TGF- β 1 humain, d'origine plaquettaire (L-TGF- β 1).

La position exacte des ponts disulfure (-S-S-) n'est pas connue ainsi que la quantité et la localisation des glucides (CHO) de la TGF- β 1-BP.

Le **TGF- β 1** (1) dimérique (ou forme active) de deux fois cent douze acides aminés (25 kDa) est lié, de façon non covalente, à la partie N terminale restante (le **précurseur** proprement dit de trois cent quatre vingt dix résidus clivé par protéolyse et délété de la séquence signal N terminale de vingt neuf résidus) de son précurseur dimérique (deux fois 40 kDa) liée de façon covalente, appelée "**latency associated peptide**" (**LAP**, 2). Celui-ci étant lié de façon covalente à une protéine porteuse ou modulatrice ou de liaison : la "**TGF- β 1 binding protein**" (**TGF- β 1-BP**, 3, 125-160 kDa).

L'association TGF- β 1 dimérique-LAP dimérique est aussi appelée "**small latent complex**" (**SLL**) alors que le complexe latent de haut poids moléculaire est appelé "**large latent complex**" (**LLC**).

L'élément LAP est une glycoprotéine possédant trois sites de N glycosylation et la présence de la séquence intégrine ARG-GLY-ASP (RGD) suggère que le complexe latent ou la LAP peuvent se fixer, de façon spécifique, à la surface cellulaire. Le TGF- β 1 latent s'adsorbe à l'héparine-Sepharose, suggérant la présence d'un site de fixation spécifique de l'héparine sur le précurseur mature.

Le rôle de la "binding protein" n'est pas encore déterminé mais la présence de motifs "**EGF-like repeats**" trouvés également dans des **protéases à serine** du système de la coagulation, certains récepteurs cellulaires de surface et une famille de facteurs de croissance laisse entrevoir la possibilité d'une activité protéase (Miyazono et coll. 1989, 126).

Le clonage et l'expression du gène de cette protéine (ADNc de fibroblastes humains) a fourni des éléments structuraux importants. Celle-ci est tout d'abord de **taille supérieure** (170-190 kDa) à la protéine d'origine plaquettaire (125-160 kDa) et possède **sept sites de N glycosylation potentielle**. Tous les peptides dérivés de cette dernière ont été retrouvés dans 60% de la partie C terminale de la protéine d'origine fibroblastique. Ceci suggérant une protéolyse cellulaire spécifique ou un épissage alterné du gène. La "binding protein" ne fixe, ni n'inactive le TGF- β 1. La présence de seize motifs "EGF-like repeats" dont quinze contiennent une séquence consensus pour l'**hydroxylation** des résidus **asparagine/acide aspartique** observés pour la protéine C et d'autres protéines à motifs "EGF-like repeats" comme des facteurs de coagulation vitamine K dépendants, le facteur C1r du système complément, le récepteur LDL et la thrombomoduline. Ces acides aminés particuliers ont un rôle dans la **fixation des ions calcium**. **Aucune activité protéasique n'a été observée**. Un autre rôle possible serait l'**acheminement spécifique à des cellules cibles**. En effet, cette protéine possède la séquence ARG-GLY-ASP (RGD) et huit résidus identiques à la séquence du domaine de fixation cellulaire de la chaîne B2 de la laminine (Kanzaki et coll. 1989, 90).

Le(s) mécanisme(s) d'activation physiologique(s) du TGF- β n'est pas (ne sont pas) encore connu(s). Des **protéases** comme la plasmine ou la cathepsine D l'**activent partiellement** (Lyons et coll. 1988, 113).

Les sites de **N glycosylation de la LAP** semblent très importants dans la latence du TGF- β . Un traitement à l'endoglycosidase F ou à la sialidase,

l'addition d'acide sialique ou de mannose-6-phosphate induisent une activation dose-dépendante (Miyazono et Heldin 1989, 126). Par contre, **la BP ne semble pas nécessaire à la latence** du fait de son absence du TGF- β 1 latent, recombinant, sans modification de cette latence (Gentry et coll. 1987, 61 ; Wakefield et coll. 1988, 193)

L'**hypothèse du micro-environnement acide** pourrait contribuer à l'activation comme dans le cas des macrophages activés du tissu cicatriciel, sécrétant une sialidase et des protéases. Le pH pouvant être abaissé à une valeur de 4 (Silver et coll. 1988, 169).

Il est à noter qu'à forte concentration l'activation, *in vitro*, par acidification de TGF- β latent recombinant est réversible. Ceci démontrant qu'il n'y a pas altération mais certainement modification des interactions de stabilisation.

Le **contrôle physiologique de l'activation** est d'une grande importance dans les actions paracrine (relargage des plaquettes à un site d'agression) ou autocrine

La lignée de carcinome pulmonaire, humain **A549** sécrète une relativement grande quantité de TGF- β latent. Pourtant, le TGF- β actif est inhibiteur pour ces cellules, suggérant que leur **croissance incontrôlée pourrait résulter de leur incapacité à activer le TGF- β sécrété**. A l'inverse, une lignée d'une maladie de Hodgkin à sclérose nodulaire (**L-428**) sécrète un **complexe TGF- β de haut poids moléculaire actif** à pH physiologique et inactivé par acidification. Cette forme particulière de TGF- β actif mais de haut poids moléculaire pourrait être un modulateur de la fibrose caractéristique du type sclérose nodulaire (Newcom et coll. 1988, 132).

La **forme latente sérique** se trouve être un **complexe avec l' α 2-macroglobuline** servant à **localiser** l'action du TGF- β actif et fort probablement, une forme de **clearance** (O'Connor-McCourt et Wakefield 1987, 134 ; Huang et coll. 1988, 79). Danielpour et Sporn (1990, 40) suggèrent que l' α 2-macroglobuline est un **important régulateur différentiel** des activités biologiques des TGF- β 1 et 2, *in vivo* tandis que Lizonova et coll. (1990, 111) pensent que la co-expression de "**tumor-associated α 2-macroglobulin**" et facteurs de croissance pourrait avoir un rôle dans la **modulation** de la croissance des cellules de mélanome cultivées *in vitro*.

Il est à noter qu'une publication récente (Mackay et coll. 1990, 116) fait état de deux classes distinctes de "TGF- β -binding proteins" du glomérule de rat. Les glomérules contiennent des quantités non négligeables de TGF- β 1 et d'ARNm correspondant, suggérant que le glomérule pourrait être un important site d'action du TGF- β . La première classe est constituée d'un groupe de protéines fixant le TGF- β 1 mais pas le TGF- β 2. La seconde est un groupe de protéines fixant les TGF- β 1 et 2 et démontrant quelques propriétés du récepteur de classe III. Ces "TGF- β -binding proteins" glomérulaires pourraient servir à stocker le TGF- β ou capter un excès présent dans le glomérule. Une autre possibilité serait qu'elles constituent un élément des récepteurs cellulaires TGF- β .

3.6 Activités biologiques du TGF- β

3.6.1 Caractère multifonctionnel

Le TGF- β a été qualifié de **prototype du facteur de croissance multifonctionnel** (Sporn et Roberts 1988, 175). En effet, la nature de son action sur une cellule cible dépend de nombreux paramètres comme le type cellulaire, son état de différenciation, les conditions de culture et la présence d'autres facteurs de croissance (Sporn et coll. 1987, 174).

Quelques exemples pour illustrer cette importante remarque .

- il **stimule** la croissance de cellules NRK en agar semi-solide et en présence d'EGF mais il est **antagoniste** de l'action de l'EGF si la culture est monocouche (Roberts et coll. 1985, 149)
- il **stimule ou inhibe** la croissance, en agar semi-solide, de cellules 3T3 de rat Fischer, transfectées avec le gène *myc*, ceci dépendant de la présence respective d'EGF ou de PDGF (Roberts et coll. 1985, 149)
- il **stimule** la croissance de fibroblastes provenant de foetus humains "jeunes" mais l'**inhibe** si les foetus sont plus "agés" (Hill et coll. 1986, 74)
- il **stimule** la différenciation de cellules épithéliales, bronchiques et de pré-chondrocytes mais **inhibe** celle d'adipocytes ou de myoblastes (Seyedin et coll. 1985, 166, Ignatz et Massague 1985, 81 ; Masui et coll. 1986, 122 ; Massague et coll. 1986, 120 ; Olson et coll. 1986, 135 ; Florini et coll. 1986, 56)
- les formes $\beta 1$ et $\beta 2$ **stimulent** la différenciation de cellules mésenchymateuses, primitives, avec expression d'un phénotype du tissu cartilagineux mais le traitement de chondrocytes par le TGF- β , conduit à la suppression des marqueurs du tissu cartilagineux comme la synthèse de collagène de type II (Rosen et coll. 1988, 156).

La diversité des effets du TGF- β et son spectre d'action potentiel très étendu placent ce facteur de croissance à une position privilégiée au regard de la régulation de la physiologie normale ou pathologique.

Quelques exemples :

3.6.1.1 Le mésenchyme : contrôle de la matrice extra-cellulaire

Des études immunohistochimiques sur les tissus embryonnaires et adultes ont démontré la présence marquée de TGF- β dans le **mésenchyme** (Ellingsworth et coll. 1986, 51 , Heine et coll. 1987, 71 , Flanders et coll. 1989, 55 ; Thompson et coll. 1989, 181). D'autres résultats suggèrent que beaucoup des activités du TGF- β sur les cellules mésenchymateuses ne sont en fait que

différents aspects d'un schéma complexe par lequel le TGF- β sert à l'accumulation et constitue une réponse des cellules à la matrice extracellulaire.

La figure 2 montre que le TGF- β (formes $\beta 1$ et $\beta 2$):

- **active** la transcription des gènes et augmente la synthèse et la sécrétion des protéines de la matrice extracellulaire (collagène types III, IV et V, thrombospondine, osteopontine, tenascine, élastine, ostéonectine/SPARC, protéoglycan chondroïtine/dermatan sulfate) Les mécanismes de cette **augmentation de synthèse** se situent à des niveaux très différents comme l'augmentation des taux d'ARNm (collagène I, II, V et fibronectine) avec **stabilisation** de ces ARNm, **stimulation directe des promoteurs** (collagène $\alpha 2$ (I) de souris, fibronectine), augmentation de la synthèse des protéines matricielles des ARNm
- **diminue** la synthèse d'enzymes protéolytiques (thiol et sérine protéases, métalloprotéinases, collagénase, élastase, transine/stromélysine) dégradant ces protéines et **augmente** la synthèse d'inhibiteurs de protéases (inhibiteur du plasminogène activateur, PAI) qui bloquent l'activité de ces enzymes
- **augmente** la transcription, la traduction et la maturation des récepteurs cellulaires (les intégrines) pour les protéines de la matrice, notamment la fibronectine. Il a été démontré que le TGF- β augmente la capacité d'adhésion de divers types cellulaires à des substrats de fibronectine et collagène.

Les **multiples niveaux d'action** où le TGF- β agit suggèrent que le contrôle des interactions de la matrice et des cellules représentent un des principaux mécanismes par lesquels le TGF- β contrôle la croissance, la différenciation et les fonctions des cellules du mésenchyme (pour revue, Rizzino 1988, 143). Ces effets spécifiques du TGF- β sur l'augmentation de la synthèse des protéines ont été démontrés *in vitro* et *in vivo*.

3.6.1.2 Le muscle

Le TGF- β est un **régulateur potentiel de la myogénèse**. À l'exception des cellules satellites dont la croissance est inhibée, le TGF- β est plutôt un inhibiteur de la différenciation des cellules de ce tissu. Bien que la signification physiologique de ce phénomène ne soit pas connue, il a été proposé que le TGF- β puisse jouer un rôle dans la régénération musculaire, prévenant la fusion précoce des myoblastes embryonnaires et celle des cellules satellites dans le même corps de muscle, au moment de la myogénèse initiale.

Des études immunohistochimiques ont démontré un fort marquage intracellulaire des myocytes cardiaques. Ce marquage disparaissant rapidement

**Stimulation de la synthèse des récepteurs
des protéines de la matrice**

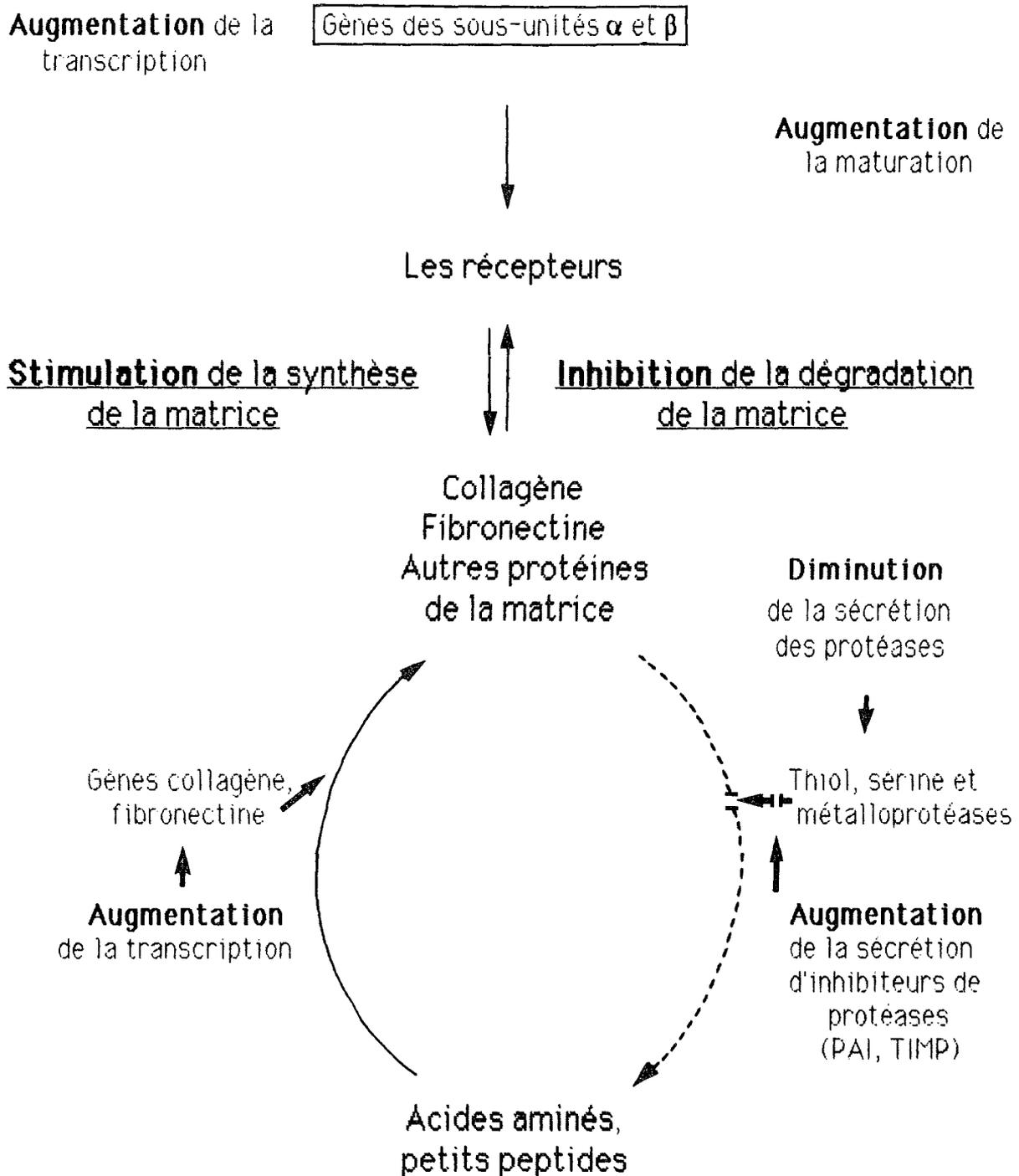


Figure 2 : Le TGF- β et la matrice extracellulaire (Roberts et Sporn 1990, 153).

PAI, plasminogen activator inhibitor ; **TIMP**, thiol inhibitor metalloproteinases.

après un infarctus expérimental mais se trouve intensifié dans les zones périphériques aux tissus lésés (Thompson et coll. 1988, 180). Ces données impliquent un rôle du TGF- β dans les mécanismes de maintenance de ces cellules. Lefer et coll. (1990, 108) ont démontré le rôle préventif (cardio-protecteur) du TGF- β dans les lésions cardiaques graves, peut être, par diminution des dommages causés par élévation du taux de TNF circulant.

3.6.1.3 Les os

Plusieurs observations ont conduit à l'hypothèse que les mécanismes d'action du TGF- β dans le tissu osseux sont similaires dans sa formation embryonnaire et dans la croissance, le remodelage et la cicatrisation de ce même tissu adulte.

- le TGF- β est présent dans la matrice osseuse, adulte (Seyedin et coll. 1985, 166 ; 1986, 167) et apparaît au moment de l'ossification endochondrale pour un modèle de formation de l'os, *in vivo* (Carrington et coll. 1988, 25)
- des ostéoblastes bovins, foetaux, en culture et des cellules d'ostéosarcome de rat possèdent un fort taux d'ARNm TGF- β et sécrètent de relativement grandes quantités de ce facteur de croissance (Robey et coll. 1987, 154)
- les taux d'ARNm TGF- β 1 sont élevés dans les os fracturés, en phase de cicatrisation, au moment de la minéralisation

Le TGF- β est **mitogène** pour les ostéoblastes en culture, observation très significative car le TGF- β est généralement **inhibiteur** pour la majorité des cellules en culture. De plus, il inhibe la formation d'ostéoclastes dans des cultures de moelle osseuse de boeuf, suggérant un rôle de régulation locale du remodelage osseux. Ces effets sur le système ostéoblastes/ostéoclastes font penser à son implication dans les processus couplés de formation/résorption du remodelage de l'os adulte (Centrella et coll. 1988, 27). D'ailleurs, il a été proposé un modèle d'activation du TGF- β latent (associé à la matrice) par l'environnement acide et protéolytique créé par l'activité ostéoclastique. Ce TGF- β activé inhiberait la formation de nouveaux ostéoclastes et augmenterait la population locale d'ostéoblastes, induisant un dépôt de matrice servant de centre de minéralisation.

3.6.1.4 Les cellules immunitaires

Les TGF- β 1 et 2 sont de **puissants agents immunorégulateurs stimulant** les fonctions monocytaires mais **diminuant** la prolifération et les fonctions lymphocytaires. Leur capacité à **inhiber** la prolifération des lymphocytes B et T, à des concentrations femtomolaires (Kehrl et coll. 1986, 92 , 1989, 93), fait qu'ils sont significativement plus actifs que la cyclosporine A,

immunosuppresseur spécifique des cellules T (Kronke et coll. 1984, 101). Le TGF- β inhibe également la prolifération des thymocytes et supprime l'activité des cellules NK.

Il **antagonise** les effets des interleukines (IL-1, 2 et 3) mais il n'est pas considéré comme un simple anti-interleukines

Il **inhibe** la sécrétion des IgG et des IgM par les cellules B activées et coopère avec les IL-2 et 5 dans la régulation de la sécrétion des IgA par les lymphocytes spléniques (isotype IgA passant de 0,1 à plus de 10%). Par contre, il **supprime** la sécrétion des IgA par traitement des cellules B activées-IgA sécrétantes (Kehrl et coll. 1986, 92 ; Coffman et coll. 1989, 35).

L'activation des cellules T par la phytohémagglutinine A (PHA) augmente l'expression des récepteurs TGF- β ainsi que le taux des ARNm TGF- β et la sécrétion de celui-ci, suggérant qu'il puisse conclure cette activation.

Le TGF- β a aussi un **rôle immunosuppresseur** des fonctions des cellules immunitaires *in vivo*. En effet, la corrélation glioblastomes-dépression de l'immunité cellulaire est établie avec un rôle très important attribué au TGF- β (Wrann et coll. 1987, 201).

Par contre, celui-ci **active** plusieurs fonctions des monocytes/macrophages. C'est un **puissant agent chimiotactique** pour les monocytes (0,04-0,4 pM) et il stimule l'expression d'ARNm pour d'autres peptides régulateurs de la croissance comme TNF- α , PDGF, TGF- α , FGF, IL-1 et même le TGF- β (Wahl et coll. 1987, 190). Un autre effet très sélectif sur les macrophages est la désactivation ou la suppression du relargage de peroxyde d'hydrogène. Cette inhibition de l'explosion oxydative ou "jet respiratoire" des macrophages activés pourrait être un nouveau reflet d'une réponse coordonnée du TGF- β dans la cicatrisation.

Combinés, les effets du TGF- β sur les lymphocytes et les monocytes indiquent qu'il supprime les aspects destructeurs de la réponse inflammatoire facilitant les effets anaboliques des facteurs de croissance dérivés des macrophages sur la reconstruction cellulaire.

3.6.1.5 L'hématopoïèse

Le rôle du TGF- β dans le **contrôle de l'hématopoïèse** a été démontré dans des systèmes de culture de moelle osseuse. Il supprime la croissance des populations de cellules hématopoïétiques peu différenciées mais n'affecte pas celle de cellules plus différenciées. L'inhibition réversible par le TGF- β (1 et 2) de la prolifération induite par l'IL-3 des progéniteurs murins et par l'IL-3 et le GM-CSF des cellules médullaires humaines a été observée. Par contre, il n'y a pas inhibition s'il y a induction par le GM-CSF pour les cellules bovines et par le G-CSF pour les cellules humaines.

Il est à noter que les **mégakaryocytopoïèses** bovine et humaine sont **inhibées** suggérant une **possible régulation négative, autocrine, impliquant les plaquettes** (Ishibashi et coll. 1987, 83 ; Mitjavila et coll. 1988, 123) (pour revue, Hampson et coll. 1989, 65).

3.6.1.6 Les cellules stéroïdogènes

Les effets du TGF- β sur les cellules stéroïdogènes sont dépendants du type cellulaire et ont été décrits pour :

- les cellules adrenocorticales (inhibition) (Hotta et Baird 1986, 77 ; Feige et coll. 1987, 53)
- les cellules de la granulosa (augmentation de l'effet de la FSH sur l'activité aromatasase) (Ying et coll. 1986, 203 , Hutchinson et coll. 1988, 80) et de la thèque des ovaires
- les cellules de Leydig (inhibition) (Avallet et coll. 1987, 8 ; Lin et coll. 1987, 109 ; Morera et coll. 1988, 128) et de Sertoli testiculaires

Ces effets sont **indépendants de la prolifération** puisqu'il n'y a pas d'effet sur la croissance. Le TGF- β agit d'une façon endogène, comme un **médiateur autocrine et paracrine** des fonctions cellulaires.

3.6.1.7 L'endothélium

Beaucoup de processus comme l'embryogénèse, l'inflammation, la reconstruction tissulaire ou la carcinogénèse, où le TGF- β semble jouer un rôle primordial, sont dépendants de la vascularisation ou angiogénèse.

Il apparaît comme **angiogénique** dans des systèmes test, *in vivo*, comme par exemple, une réponse localisée au site d'injection (Roberts et coll. 1985, 149) Mais du fait qu'un grand nombre de cellules différentes sont en jeu, il est difficile de savoir si la formation de nouveaux vaisseaux sanguins est un effet direct du facteur de croissance sur les cellules endothéliales ou bien le résultat d'une stimulation indirecte des cellules endothéliales par d'autres substances produites par des cellules cibles du TGF- β comme les macrophages.

in vitro, le TGF- β 1 **s'oppose** à l'action d'un des mitogènes majeurs des cellules endothéliales, le FGF et **inhibe** leur prolifération en culture monocouche. Il est à noter que la forme β 2 est cent fois moins active que la forme β 1 (Jennings et coll. 1988, 86)

Observations intéressantes :

- le TGF- β 1 **stimule** la croissance des cellules endothéliales, en culture, dont le passage est réalisé de façon **mécanique** et non par trypsination, suggérant que l'effet inhibiteur pourrait s'exprimer après endommagement de la surface cellulaire (Blake et Falanga 1988, 124)
- la **co-culture** de cellules endothéliales avec des cellules musculaires lisses ou des péricytes entraîne l'**activation de TGF- β latent sécrété par les cellules**, suggérant que l'activation particulière du TGF- β , *in vivo*, le long des vaisseaux en formation, pourrait être un

important point de contrôle de ces effets sur l'angiogénèse

3.6.1.8 Le foie

Les hépatocytes, comme l'endothélium, sont normalement dans un état de **quiescence** chez l'adulte.

L'effet **inhibiteur** du TGF- β sur la croissance, *in vitro*, des hépatocytes suggère qu'il pourrait jouer un rôle dans le maintien de la quiescence, *in vivo* (Nakamura et coll. 1985, 131, Carr et coll. 1986, 21, MacMahon et coll. 1986, 115). Bien que la majorité des hépatocytes ne se réplique pas durant la vie adulte, ces cellules gardent en mémoire cette capacité et s'en servent lors d'une perte de tissu hépatique (comme c'est le cas dans une hépatectomie expérimentale chez l'animal). Il est évident que le TGF- β intervient durant la **régénération hépatique** par inhibition paracrine pour prévenir, peut être, une croissance incontrôlée de ce tissu.

La perte de ce contrôle négatif pourrait conduire à une transformation maligne. Russel et coll (1988, 160) ont démontré que du TGF- β 1 ou 2, injecté par voie intraveineuse, dont il a été estimé que 60% sont captés par le foie au premier passage (Coffey et coll. 1987, 34), réduit de façon considérable la fraction d'hépatocytes en voie de synthèse d'ADN chez un animal ayant subi une hépatectomie partielle.

3.6.1.9 Les autres épithéliums

Les effets du TGF- β sur les hépatocytes sont un exemple de ces effets inhibiteurs sur les cellules épithéliales. Mais de nombreux tissus épithéliaux se trouvent dans un état dynamique, ou de puissants mécanismes de régulation contrôlent la prolifération et la différenciation cellulaires

Le TGF- β **inhibe** la croissance d'une grande partie des cellules épithéliales, en culture, comme les kératinocytes, les cellules du tube proximal rénal, les cellules épithéliales : bronchiques, intestinales, de la trachée, de la prostate de rat. Mais des exceptions existent, telle la **stimulation** de la croissance des cellules mésothéliales humaines et de la prostate humaine.

Il apparaît que les contrôles de la croissance et de la différenciation sont très étroitement liés pour ces cellules épithéliales ; une inhibition de la prolifération étant souvent liée à la différenciation terminale de ces cellules.

Dans le cas des kératinocytes, le TGF- β stimule l'expression des caractères spécifiques d'une maturation régénérative malgré cette différenciation terminale, appuyant son rôle physiologique dans le contrôle de la balance entre division cellulaire, migration et maturation durant la cicatrisation épithéliale

Des résultats de travaux, *in vivo*, renforcent le rôle supposé du TGF- β dans le contrôle de la différenciation des épithéliums comme :

- une corrélation inversée entre la mitose et l'expression d'ARNm TGF- β pour des entérocytes isolés

- une forte inhibition locale (implants) de la croissance et de la morphogénèse du tissu mammaire
- un marquage immunohistochimique plus intense au niveau des épithéliums mammaires ramifiés et des fourches de l'épithélium bronchique où il n'y a pas prolifération mais concentration du dépôt de protéines matricielles.

3.6.2 Rôle dans l'embryogénèse

Les mécanismes actifs dans les processus de cicatrisation et de carcinogenèse ont longtemps été soupçonnés être la recapitulation des mécanismes actifs durant le développement embryonnaire.

Le **rôle central du TGF- β dans la cicatrisation et la carcinogénèse**, la distribution quasi universelle des récepteurs TGF- β et ses puissants effets sur la migration, la croissance et la différenciation cellulaires, la fonction et la régulation de la matrice extra-cellulaire impliquent fortement ce facteur de croissance dans le développement embryonnaire.

Mis à part le TGF- β 2 pour lequel il n'y a pas d'observations disponibles, tous les autres gènes TGF- β sont fortement exprimés durant l'embryogénèse. Les ARNm TGF- β 1 sont exprimés en premier lieu après la fertilisation et leur taux reste élevé durant le reste du développement de l'embryon de souris ainsi que durant la vie neonatale et adulte. L'expression de l'ARNm TGF- β 3 est élevée dans le cordon ombilical humain tandis que les formes TGF- β 3 et 4 sont détectées dans les chondrocytes et les fibroblastes embryonnaires de poulet. Il est à noter un intense marquage immunohistochimique TGF- β 3 et précurseur dans les neurones (pas pour le TGF- β 1) et les myocytes de l'embryon de souris.

Enfin, le TGF- β 5 cloné à partir d'une librairie ADNc d'oocytes de grenouille est le plus fortement exprimé à partir du stade neurula avancé.

Les cellules des tissus embryonnaires de plusieurs espèces, plus ou moins différenciées, sont sensibles aux TGF- β 1 et 2, reflet de l'expression de récepteurs spécifiques.

Des cellules embryonnaires de carcinome ont été utilisées comme modèle expérimental d'embryogénèse précoce. Bien que les cellules souche expriment très peu de récepteurs TGF- β et n'apparaissent pas répondre au TGF- β , les cellules fille différenciées expriment seize à quarante fois plus de récepteurs et sont inhibées par le TGF- β . Ces **changements de nombre de récepteurs** pourraient être la base des observations selon lesquelles **les fibroblastes embryonnaires, précoces, humains sont stimulés par le TGF- β 1 tandis que les fibroblastes murins ou humains, à un stade plus avancé, sont inhibés.**

Beaucoup de cellules embryonnaires, sensibles au TGF- β , sécrètent des TGF- β , impliquant peut-être ces peptides dans un mécanisme de régulation autocrine de la croissance et de la différenciation des tissus embryonnaires.

Dans de nombreuses cellules embryonnaires, précoces (ostéocytes perichondraux-ostéocytes impliqués dans l'ossification intramembranaire, région submuqueuse de l'intestin en développement), les **ARNm TGF- β 1 et la protéine sont co-localisés**, renforçant l'hypothèse d'action **autocrine**. Dans le cas de tissus plus différenciés avec composants épithélial et mésenchymateux (germe des dents ou follicules pileux du museau en développement), les ARNm TGF- β 1 sont exprimés dans le composant épithélial alors que la protéine est localisée dans les éléments mésenchymateux sous-jacents. Une interprétation simpliste est que le TGF- β 1 est synthétisé par les cellules épithéliales de ces tissus, sécrété et localisé dans le mésenchyme. Si le TGF- β 1 est synthétisé sous forme latente, il est possible que le TGF- β 1 latent puisse se fixer aux cellules mésenchymateuses via un site de fixation héparine ou via la séquence intégrine de reconnaissance cellulaire ARG-GLY-ASP (RGD) présente sur la LAP et la TGF- β 1-BP.

Les résultats de l'étude de Heine et coll. (1987, 71) sur l'embryon de souris en développement, démontrent clairement que le TGF- β 1 est **localisé** non seulement de façon **spatiale** mais aussi **temporelle**, en corrélation avec les événements morphogénétiques et histogénétiques, spécifiques.

3.7 Mécanismes d'action biochimiques

Des effets communs à d'autres facteurs de croissance comme la **stimulation** de la consommation de glucose, le transport **augmenté** des acides aminés et la **stimulation** de la synthèse des prostaglandines et de l'actine cytoplasmique ne sont donc pas spécifiques du TGF- β . La **modulation** de l'expression de récepteurs pour d'autres facteurs de croissance et hormones semble spécifique de la cellule examinée et en relation avec son mode d'action sur cette cellule.

Le TGF- β **interfère** avec différents mitogènes incluant **PDGF, EGF, FGF et IGF** suggérant que l'interférence se situe au niveau du message de ces récepteurs. En effet, ces récepteurs sont des **tyrosine kinases** dont l'activité est stimulée par la fixation du ligand spécifique. Or, une telle activité n'a pu être démontrée pour les récepteurs TGF- β .

L'étude des effets du TGF- β sur d'autres signaux intra-cellulaires le distingue des autres facteurs de croissance liés à une activité tyrosine kinase. Pour les fibroblastes d'embryon de souris AKR-2B, le TGF- β entraîne un délai dans la mitose, supposée être sous la médiation de l'induction d'ARNm *c-sis* et sécrétion de protéines PDGF-like. Les gènes *c-myc* et *c-fos* régulés par le PDGF sont aussi induits avec des cinétiques retardées par le TGF- β .

Pour ce qui concerne les cellules AKR-2B, plusieurs points impliquent, à l'évidence, une "GTP-binding protein" dans la réponse mitogénique induite par le TGF- β (Murthy et coll. 1988, 129):

- il y a inhibition de cette action mitogénique par la toxine pertussique connue pour bloquer le signal de transduction à médiation récepteur par ADP-ribosylation de la sous unité alpha de certaines protéines G
- le TGF- β stimule l'activité GTPase membranaire
- il y a réduction de l'affinité du TGF- β dans sa fixation aux récepteurs par la GppNHp connue pour dissocier les protéines G

Cette dernière observation démontre l'évidence d'une **association fonctionnelle entre une protéine G et le récepteur TGF- β** mais plaide contre un effet indirect de la toxine pertussique sur les peptides PDGF-like. D'ailleurs, Howe et coll. 1990 (78) pensent que l'association entre la fixation au de TGF- β récepteur et l'activation d'une protéine G est nécessaire à l'inhibition de la croissance des cellules épithéliales CCL64.

Le résultat final de l'action du TGF- β sur les cellules cible est la modification du profil de sa transcription. La transcription de nombreux gènes est **augmentée ou diminuée** (selon le gène examiné) avec augmentation et/ou stabilisation du taux d'ARNm, effet sur promoteur: facteurs de croissance (**auto-induction du TGF- β 1**) et récepteurs, proto-oncogènes nucléaires, enzymes impliquées dans la synthèse de l'ADN, implication du système matrice extra-cellulaire (gènes du collagène alpha 2 (I), fibronectine, collagénase et TIMP).

Il est à noter que le TGF- β pourrait être un **médiateur potentiel de l'action des rétinoïdes et des stéroïdes**. En effet, des résultats préliminaires indiquent que l'action de molécules de petit poids moléculaire comme les rétinoïdes, les esters de phorbol et les hormones (comme les oestrogènes et la dexaméthasone) pourrait être sous la médiation, au moins partielle, du TGF- β :

- les esters de phorbol induisent l'expression d'ARNm (TGF- β 1) chez les cellules de l'épiderme de souris et (TGF- β 2) chez les kératinocytes en culture
- le tamoxifène induit la sécrétion de TGF- β 2 chez les cellules de carcinome prostatique, humain PC-3 (Ikeda et coll. 1987, 82)
- les oestrogènes induisent l'expression d'ARNm TGF- β 1 chez les cellules d'ostéosarcome humain HOS TE85 (Komm et coll. 1988, 99)
- le tamoxifène et le TGF- β 1 inhibent la croissance de cellules de cancer du sein (MC-F7, par exemple) (Knabbe et coll. 1987, 97)
- les oestrogènes et le TGF- β 1 induisent la synthèse de collagène chez les cellules osseuses (Komm et coll. 1988, 99)
- l'acide rétinoïque et le TGF- β inhibent la prolifération de diverses cellules épithéliales (Roberts et Sporn 1984, 148)

3.8 Rôles dans les processus physiologiques et pathologiques

Les actions concertées du TGF- β sur de nombreux types cellulaires impliqués dans l'état inflammatoire et la réparation tissulaire ainsi que dans des processus pathologiques comme la carcinogenèse démontrent bien la multifonctionnalité de ce facteur de croissance (Roberts et coll 1988, 1061). En effet, il **régule beaucoup de processus communs à la réparation tissulaire et à l'état pathologique** comme l'angiogénèse, le chimiotactisme, la prolifération fibroblastiques et le contrôle de la synthèse et la dégradation des protéines de la matrice. De plus, ces types cellulaires peuvent synthétiser du TGF- β .

3.8.1 Les processus de cicatrisation

La présence de quantités relativement élevées de TGF- β dans les plaquettes et le tissu osseux implique cette protéine dans la **réparation des tissus mous** (chimiotactisme, activation des monocytes/macrophages, suppression de l'immunité cellulaire) aussi bien que dans le **remodelage et la réparation des tissus durs** (processus cités pour les tissus mous avec des effets plus spécifiques comme la suppression de la différenciation des ostéoclastes et stimulation de la prolifération des ostéoblastes et de leurs fonctions). Les actions du TGF- β , prises de façon individuelle, sont classées **stimulatrices ou inhibitrices** mais il est certain qu'il existe une **balance des effets** et une **synergie** de ces effets pour accroître l'efficacité de la combinaison cicatrisation et remodelage tissulaire. D'ailleurs, de nombreux mécanismes se sont développés pour **étendre les actions du TGF- β** dans ces processus. Après le relargage des granules alpha plaquettales, d'autres types cellulaires impliqués comme les macrophages activés, les lymphocytes, les fibroblastes, les cellules musculaires lisses et les ostéoblastes peuvent sécréter du TGF- β . De plus, le TGF- β possède la propriété d'auto-induire sa propre synthèse chez les macrophages, les lymphocytes et les fibroblastes. Ceci pourrait servir à soutenir ses actions (Pierce et coll 1989, 140). Il est aussi possible d'évoquer les mécanismes d'activation/désactivation du TGF- β au site de dommage : le micro-environnement acide/protéolytique à proximité des macrophages activés pourrait favoriser l'activation du TGF- β , alors que l'excès serait capté par l' α_2 -macroglobuline. Il est à noter que l'injection locale, *in vivo*, de TGF- β peut **initier la cascade des événements caractéristiques de la cicatrisation et ceci de façon réversible**.

Contrairement à l'adulte où les fibres de collagène sont le support de la cicatrisation, le foetus cicatrise sans cicatrice (pas d'état inflammatoire aigu, faible participation des fibroblastes et matrice de type protéoglycan plutôt que collagène) (De Palma et coll. 1987, 44). Ceci suggère que la cicatrisation foetale implique d'autres mécanismes indépendants de la participation du TGF- β ou que d'autres formes de TGF- β y sont impliquées.

Pour ce qui concerne la réparation osseuse, le TGF- β joue certainement aussi, un rôle important puisque les caractéristiques tissulaires mimant les étapes initiales de la cicatrisation sont observées. Puis, intervient le processus de minéralisation mimant la formation embryonnaire du tissu osseux.

3.8.2 Carcinogénèse et autres pathologies prolifératives

Théoriquement, la carcinogénèse pourrait résulter de la perte de la sensibilité des cellules aux facteurs de croissance inhibiteurs qui normalement contrôlent leur croissance et diminuent leur sensibilité aux mitogènes autocrines (Sporn et Roberts 1985, 172).

Il n'est pas évident que le TGF- β contrôle la croissance de cellules épithéliales ou lymphoïdes. Pourtant, de nombreuses cellules transformées comme des kératinocytes, des hépatocytes, des cellules de carcinome bronchique, des cellules de carcinome squameux, des cellules leucémiques et de rétinoblastome ne sont plus inhibées par le TGF- β .

Dans un seul exemple, la perte de la sensibilité au TGF- β est basée sur la perte des mécanismes d'activation du TGF- β latent. Il s'agit du carcinome pulmonaire humain A549 pour lequel, les cellules sont prolifératives malgré une sécrétion substantielle de TGF- β latent. Si le TGF- β du milieu conditionné de ces cellules est activé (par acidification, par exemple), il y a inhibition de croissance.

Dans d'autres cas comme les cellules de phéochromocytome de rat PC12, de rétinoblastome humain et de plusieurs leucémies, il y a corrélation entre cette perte de sensibilité au TGF- β et l'absence de récepteur TGF- β .

Bien que plusieurs cellules tumorales sécrètent du TGF- β mais aient perdu la capacité de réponse à cette protéine, **il a été postulé que le TGF- β pourrait stimuler la croissance tumorale via des effets paracrines sur les éléments du stroma tumoral**. Comme dans le tissu granuleux cicatriciel, ce stroma tumoral est caractérisé par un influx de cellules inflammatoires, une néovascularisation et synthèse de tissu conjonctif (Dvorak 1986, 49). Sécrétant continuellement du TGF- β , la tumeur pourrait utiliser les mécanismes réparateurs, naturels de l'hôte pour promouvoir sa propre croissance et affaiblir la surveillance immunologique (état immunodépressif des patients atteints de gliomes). Torre-Amione et coll. (1990, 183) ont démontré que la transfection d'un ADNc TGF- β 1 à des cellules tumorales fortement immunogènes leur a permis d'échapper à la surveillance immunologique des souris contaminées.

L'implication du TGF- β dans l'**élaboration de tissu conjonctif** (par le contrôle de la synthèse des protéines de la matrice et de la protéolyse) permet de prédire que l'expression aberrante de ce facteur de croissance pourrait être associée à de nombreuses **pathologies du tissu conjonctif** comme les chéloïdes, la cirrhose, l'athérosclérose, la fibrose pulmonaire, la sclérose du derme et l'arthrite rhumatoïde (Sporn et Roberts 1986, 173).

Des résultats préliminaires ont montré un taux de TGF- β élevé dans le liquide synovial de patients atteints d'arthrite rhumatoïde. Bien que le TGF- β ne soit pas mitogène pour les synoviocytes, il pourrait jouer un rôle dans les aspects réparateurs de la maladie incluant la fibrose et la formation de cicatrices (Allen et coll. 1990, 1).

Dans la vitrorétinopathie proliférative (PVR), une pathologie fibrotique de l'oeil, il existe une forte corrélation entre le taux de TGF- β 2 du liquide vitreux et la sévérité de la maladie.

Un modèle expérimental de glomerulonéphrite proliférative, mesangiale, aiguë a permis de démontrer que cette pathologie (inflammation du rein avec accumulation de matrice extracellulaire dans les glomérules endommagés) est associée à une production et une activité de TGF- β 1 augmentées et que l'administration d'anticorps anti-TGF- β 1 (au moment de l'induction de la maladie) supprime l'augmentation de production de matrice extracellulaire et diminue fortement les manifestations histologiques de la pathologie. Il s'agit donc d'un exemple d'implication probable du TGF- β dans les pathologies glomérulaires humaines et peut-être, dans d'autres pathologies où la fibrose est décrite (Border et coll. 1990, 14).

3.9 Applications thérapeutiques potentielles du TGF- β

Deux domaines d'applications thérapeutiques majeures sont envisagés :

- **la réparation des tissus mous et durs**
- **la thérapie immunodépressive**

Des applications locales de TGF- β , *in vivo*, chez l'animal de laboratoire, ont démontré leur efficacité dans les processus de **cicatrisation** (Sporn et coll. 1983, 171 ; Lawrence et coll. 1985, 106 ; Mustoe et coll. 1987, 130 ; Brown et coll. 1988, 17 ; Smiddy et coll. 1989, 170) et ces résultats laissent présager une réelle application thérapeutique après la mise au point d'un système de délivrance approprié.

Pour ce qui concerne la réparation du tissu osseux et du cartilage, il est encore trop tôt pour s'avancer quant à l'application thérapeutique. Le rôle du TGF- β dans la réparation, *in vivo*, de cartilage ou de tissu osseux n'est pas encore éclairci et pourrait dépendre de l'utilisation simultanée d'autres facteurs de croissance (notamment les BMP, membres, elles aussi, de la famille TGF- β)

La **suppression ou plutôt la diminution de l'intensité de la réponse immunitaire** constitue l'autre application thérapeutique potentielle du TGF- β , notamment dans la **prévention des phénomènes de rejet** lors de transplantation. Le TGF- β 1 est cent mille fois plus efficace que la cyclosporine A (sur une base de comparaison moléculaire).

Enfin, dans le futur, la **régénération des tissus musculaire** (infarctus du myocarde) **et nerveux** (accélération de la régénération des nerfs périphériques) pourrait être explorée..

3.10 But du travail

Notre travail avait pour but la **mise au point d'une technique de purification du transforming growth factor-beta 1 (TGF- β 1)** dans l'optique d'un schéma de purification plus global des facteurs de croissance humains, d'origine plaquettaire. Les "impératifs" de la méthode de purification se situaient dans la simplicité (au sens propre et dans l'optique de sophistication restreinte mais efficace), la rapidité et la transférabilité à plus grande échelle.

La méthode de purification décrite par Assoian et coll (1983, 6) fut une base de travail dans cette recherche.

En France, les centres de transfusion sanguine sont seuls habilités à préparer les **concentrés plaquettaires humains**. Leur **validité** d'utilisation est d'une durée de cinq jours. Passé ce laps de temps, ils sont détruits. Or, les plaquettes sont une **source naturelle privilégiée de facteurs de croissance**, très intéressante pour leur purification potentielle. Les relations privilégiées existant entre le C.R.T.S. Nancy-brabois et l'unité INSERM 284 "Instrumentation avancée et réactifs" ont conduit à envisager cette purification dans un but de "valorisation" des concentrés périmés, inutilisés pour la production de **réactifs** (protéine-réactif, anticorps poly- ou monoclonaux correspondants et mise au point de milieux de culture cellulaire de composition définie).

MATERIELS ET METHODES

Tous les produits chimiques, d'usage courant, proviennent principalement de trois fournisseurs sauf exceptions mentionnées :

- Prolabo (Paris, France)
- Merck (Darmstadt, Deutschland)
- Sigma (Saint Louis, MO, USA)

1 Méthodes de dosage du TGF- β 1

1.1 Les facteurs de croissance

Le TGF- β 1 humain d'origine plaquettaire dont la pureté > 97% (séquence N terminale et SDS-PAGE avec coloration argentique) provient de R & D Systems (Minneapolis, MN, USA). La reconstitution du produit lyophilisé (échantillon de 1 μ g, conservé à -20°C) est réalisée par addition de 0,1 ml d'acétonitrile (ou propanol) 25% - TFA 0,1% dans le flacon de conditionnement prévu à cet effet. Après une demi heure à température ambiante, 0,9 ml d'HCl 4 mM - BSA 1 mg/ml stériles sont ajoutés (une demi heure à température ambiante). La préparation 1000 ng TGF- β 1/ml (40000 pM) stable environ un mois, si conservée à 4°C, est de préférence échantillonnée en récipients plastique (polypropylène de préférence) et congelée à -20°C. Il est préférable de ne pas congeler/décongeler le TGF- β . Cette préparation de TGF- β 1 humain d'origine plaquettaire est utilisée comme étalon dans les différents dosages utilisés (la figure 3 représente la notice accompagnant ce type d'échantillon).

L'EGF (100 μ g) purifié à partir de glandes sous-maxillaires de souris (Sigma, tissue culture grade) est reconstitué par addition de 10 ml de tampon PBS stérile (formule de Dulbecco : KCl 2,7 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM, NaCl 136,9 mM, Na₂HPO₄ 8,1 mM, pH 7,4). La préparation 10 μ g EGF/ml est échantillonnée et conservée à -20°C pendant plusieurs mois en évitant de la congeler/décongeler.

Activation du TGF- β 1 latent

Dans le cas de fractions obtenues et conservées à pH neutre, il est nécessaire d'activer, *in vitro*, le TGF- β 1 latent avant de procéder à sa quantification.

Un volume de 100 μ l d'échantillon est acidifié par addition de 25 μ l d'HCl 0,6 N en présence de 50 μ l de BSA 4 mg/ml pendant 30 min à température ambiante. Après neutralisation par addition de 25 μ l de NaOH 0,6 N, l'échantillon contient NaCl 0,15 M et BSA 1 mg/ml exogènes.

TRANSFORMING GROWTH FACTOR-BETA
(from human platelets)

Highly purified TGF- β is an extremely hydrophobic protein that adheres strongly to surfaces, even siliconized glass and plastic. To ensure recovery, TGF- β is ordinarily lyophilized aseptically in the presence of high-grade bovine serum albumin (50 μ gs BSA/ μ g TGF- β) (Cat. No. 100-B). Upon special request, TGF- β can be supplied free of carrier protein (Cat. No. 100-B/CF). When supplied without carrier protein, quantitative recovery is difficult. For iodination, we recommend that the reaction be carried out in the vials in which TGF- β is shipped. Essentially quantitative recoveries can be obtained by extracting the vial with solutions containing solvents (e.g., 25% acetonitrile - 0.1% TFA or 25% propanol - 0.1% TFA) or detergents (e.g., 0.01% Triton X-100). Extraction with 4 mM HCL will extract most of the TGF- β but recovery will not be quantitative.

Lyophilized samples of TGF- β are stable for extended periods when stored at -20°C . Preparations containing carrier BSA should be reconstituted in small volumes of 4 mM HCL containing 1 mg/ml BSA (0.5 - 1.0 ml/ μ g of TGF- β) before being diluted to the final desired concentrations with medium or buffer. After reconstitution, samples should be stored at 4°C . TGF- β is stable under a wide variety of conditions, but is inactivated by reduction. Purified preparations of TGF- β have an approximate ED_{50} of 1 ng/ml for the stimulation of colony formation of AKR-2B (clone 84A) cells in soft agar. For NRK cells (clone 49F), the ED_{50} for stimulation of colony formation in soft agar is in the range of 0.1 - 0.2 ng/ml. These values should only be taken as guidelines for initial experiments since responses to this growth factor will vary depending on conditions and the type of cell being studied.

This product is to be used for research purposes only.

Figure 3 : Notice accompagnant un échantillon de TGF- β 1 humain d'origine plaquettaire (R & D Systems, Minneapolis, MN, USA).

1.2.Culture cellulaire

Milieux de culture - serum de veau - additifs - trypsine

Le milieu de culture de base est le milieu d'Earle modifié par Dulbecco (DMEM) préparé à partir de poudre (Seromed-Intermed, Noisy le Grand, France) reconstituée avec de l'eau bidistillée avec addition de bicarbonate de sodium (Sigma, tissue culture grade) 3,7 g/l, L-glutamine 584 mg/l (Sigma, tissue culture grade), pénicilline G 10^5 UI/l - streptomycine 0,1 g/l (Diamant, Puteaux, France). Après acidification par un jet de CO₂ et filtration stérilisante sur membrane 0,22 µm (Millipack Millipore, Bedford, MA, USA), le milieu est conservé à l'obscurité et à 4°C. La L-glutamine est ajoutée aux milieux de culture utilisés tous les 15 jours.

Tout le matériel plastique de culture cellulaire, stérile provient de Costar (Cambridge, MA, USA) sauf exceptions mentionnées. Les manipulations stériles sont réalisées sous hotte à flux laminaire (classe 100, Sercoflux, Le Vaudoué, France).

Le sérum de veau foetal (SVF, Seromed-Intermed, lot S 0113) ou sérum de veau nouveau né (SVNN, Gibco BRL, Paisley, Scotland) sont inactivés par chauffage à 56°C pendant 30 min, puis filtrés sur membrane 0,22 µm (Costar) et conservés à 4°C.

La trypsine est une solution à 2,5% en PBS sans calcium et magnésium (Boehringer, Mannheim, Deutschland).

Le decollage des cellules adhérentes par la trypsine est réalisé généralement au stade subconfluent pour effectuer un passage de la culture. Un "rinçage" (1 ml/flacon 25 cm² ou 3 ml/ flacon 75 cm²) du tapis cellulaire et l'incubation du flacon de culture à 37°C pendant quelques minutes (dépendant du type cellulaire) suffisent à effectuer cette opération. L'action de l'enzyme est stoppée par addition de milieu complet froid et il est possible de faire un lavage facultatif de la suspension cellulaire (centrifugation en tube conique, 800 g, 10 min, 20°C). Un passage de la culture est alors réalisé (1/10 ou 1/20) une à trois fois par semaine, ceci dépendant du type cellulaire.

L'incubation est réalisée dans une étuve 5% CO₂ - atmosphère humide - 37°C (ASSAB, Flobio, Courbevoie, France)

Conservation des lignées cellulaires

- Congélation

Une solution froide de DMSO (Sigma) à 10% en sérum de veau, préparée extemporanément, est ajoutée, goutte à goutte, à une suspension cellulaire à environ 10^7 cellules/ml en sérum de veau, sur un bain de glace pilée. La

préparation est répartie en échantillons (1,8 ml) en cryotubes Nalgen 2 ml (Nalge, Rochester, NY, USA). Les tubes sont alors congelés le plus lentement possible (boîte de polystyrène) à -70°C , puis conservés en azote liquide.

- Décongélation

Un cryotube est rapidement décongelé au bain marie à 37°C . Son contenu est transféré dans un tube 50 ml conique contenant environ 30 ml de milieu additionné de 10% de serum de veau. Complété à un volume de 50 ml, le tube est centrifugé à 800 g pendant 10 min à 20°C . Le culot lavé est délicatement remis en suspension avec du milieu complet (numération en cellule de Thoma, avec test de viabilité au bleu trypan facultatif pour vérifier la qualité des cellules congelées) et les cellules sont mises en culture.

1.3 Induction de la croissance de cellules NRK-49F en agar semi-solide

La lignée de fibroblastes normaux de rein de rat, clone 49F (NRK-49F) nous a été généreusement donnée par Messieurs les Docteurs P. Jullien et D.A. Lawrence de l'Institut Curie d'Orsay.

Ces cellules NRK-49F sont cultivées, de façon courante, en DMEM 10% de SVFN. Elles ne doivent jamais arriver au stade de la confluence sous peine de compromettre la validité du test et dix à quinze passages sont généralement effectués.

Réactifs :

- solution autoclavée d'agar Noble (Difco, Detroit, MI, USA) 1,8% en eau bidistillée
- milieu DMEM 2 X préparé à partir de milieu liquide concentré 10 X avec L-glutamine (Gibco BRL) et additionné de bicarbonate de sodium 2 X 3,7 g/l et antibiotiques (2 X 10^5 UI/l de pénicilline G et 2 X 0,1 g/l de streptomycine, pH ajusté avec NaOH 1 N
- SVF Seromed-Intermed (lot S 0113)
- milieu complet DMEM 10% SVF
- solution d'EGF 5 ng/ml en milieu complet
- solution de fixation : glutardialdéhyde 250 mM - diméthylarsinate de sodium 70mM

Ce test est basé sur l'induction par le TGF- β , en présence d'EGF, de la croissance "anchorage indépendant" (formation de colonies cellulaires) de cellules normales en milieu agar semi-solide. La technique utilisée est inspirée de Lawrence et coll. (1984, 104).

Un volume de 2,5 ml d'une préparation nutritive (réalisée extemporanément et maintenue au bain marie à 43°C) composée de milieu DMEM 1 X, SVF 10%, agar 0,5% est rapidement coulé au fond d'une boîte de Pétri 35 mm de diamètre (Corning, Corning, NY, USA). Les boîtes fermées sont laissées pour solidification 15 min à 4°C et 15 min à température ambiante. Pendant ce

temps, les cellules non confluentes sont décollées par la trypsine, après élimination du milieu et de l'excédent de solution trypsique, pendant environ 5 min à 37°C. Cinq ml de milieu complet sont ajoutés et la suspension est passée à deux reprises au travers d'une aiguille à injection hypodermique 26 G X 1/2" (0,45 X 12 mm ; 12 - 4,5), à l'aide d'une seringue de 10 ml. Une numération avec test de viabilité au bleu trypan est réalisée en cellule de Thoma. Les cellules sont ajoutées, au dernier moment, à une préparation nutritive (43°C) de milieu DMEM 1 X, SVF 10%, agar 0,3%. Un volume de 1 ml de ce mélange contenant 7500 cellules est rapidement déposé au centre de la boîte, sur la couche nourricière. La solidification est réalisée à température ambiante (boîtes fermées). Six à huit boîtes sont disposées dans une grande boîte de Pétri carrée (120 mm) contenant en son centre, une boîte 35 mm ouverte, remplie d'eau distillée (chambre humide). Les échantillons TGF- β (gamme d'étalonnage et essais) à tester peuvent alors être déposés à la surface du milieu semi-solide. Le volume usuel est de 1 ml (0,5 ml de la dilution de l'échantillon en milieu complet et 0,5 ml d'une solution d'EGF 5 ng/ml également en milieu complet). Les grandes boîtes sont alors placées en incubation 37°C, 5% CO₂. Au quatrième jour, une boîte témoin positif peut être observée. L'incubation totale dure quatorze jours.

A ce stade, les boîtes sont placées environ 1 h à 4°C puis 1 ml d'une solution de fixation est déposé à la surface du milieu semi-solide. Après environ 1 h (à plusieurs jours), les colonies cellulaires de diamètre supérieur à 60 μ m sont comptées sur une surface définie, au microscope avec grille micrométrique, oculaire, quadrillée ou mieux, à l'aide d'un compteur-analyseur d'image. Les comptages ont été réalisés sur un prototype du Centre anti-cancéreux Alexis Vautrin de Nancy-Brabois (Monsieur le Docteur C. Marchal), développé en collaboration avec le laboratoire d'informatique et d'électronique de Nancy (L.I.E.N., Messieurs les Professeurs A. Tosser et G. Prieur). L'appareil piloté par ordinateur (PCAT compatible, Compaq 386 S), effectue douze scrutations (analyse d'image digitalisée par module Matrox PIP 1024) par boîte soit environ 60% de la surface totale puis, par extrapolation, calcule le nombre total d'éléments (seuil de comptage défini) pour la surface totale (9,6 cm²).

Une gamme de TGF- β 1 (R & D Systems) 0,05 à 5 ng/ml (2 à 200 pM) est réalisée ainsi que des témoins négatifs sans TGF- β 1 et sans EGF. Une courbe d'étalonnage est alors tracée. Nombre de colonies cellulaires comptées (9,6 cm²) en fonction de la concentration en TGF- β 1.

Le nombre de boîtes par essai dépend de l'objectif de la quantification de l'activité biologique (une boîte par essai pour un titrage de six dilutions et deux ou trois boîtes par essai pour une quantification).

Il est possible de réaliser ce test en plaque vingt quatre puits Linbro (Flow Laboratories, Irvine Ayrshire, Scotland) en adaptant les paramètres à la surface des puits (2 cm²). Cette méthode est très utile pour tester, par exemple, de nombreuses fractions chromatographiques. Le comptage est alors effectué "manuellement" sous microscope.

1.4 Fixation compétitive de TGF- β 1 radiomarqué au récepteur cellulaire

Cette méthode de dosage du TGF- β 1 est basée sur la compétition entre le ligand radiomarqué (concentration fixe de ^{125}I -TGF- β 1) et le ligand froid (concentration variable de TGF- β 1) pour leur fixation à des récepteurs cellulaires spécifiques.

1.4.1 Radiomarquage du TGF- β 1

Réactifs :

- solution d'acétonitrile 25% - TFA 0,1%
- tampon phosphate de sodium 1,5 M, pH 7,5
- iodure de sodium radioactif (Na^{125}I ; 3,7 GBq ou 100 mCi ^{125}I /ml, Amersham, Buckinghamshire, England)
- solution de chloramine T 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en tampon phosphate de sodium
- solution de N-acétyltyrosine 50 mM
- solution d'iodure de potassium 60 mM
- solution d'urée 20 M en acide acétique 1 M
- solution d'HCl 4 mM, NaCl 75 mM, BSA 1 mg/ml
- solution de TCA 20%

La méthode de choix pour le radiomarquage du TGF- β 1 par l'iode 125 est la méthode à la chloramine T décrite par Frolik et coll. (1984, 59).

Un échantillon de 1 μg de TGF- β 1 humain d'origine plaquettaire (R & D Systems) sans BSA est reconstitué avec 10 μl d'acétonitrile 25% - TFA 0,1%. Dix μl de tampon phosphate de sodium sont ajoutés (dans le flacon de conditionnement) ainsi que 4 μl d'iodure de sodium radioactif. Pour initier la réaction (température ambiante), 5 μl d'une solution de chloramine T sont ajoutés sous bonne agitation (à l'aide d'un micro-barreau prévu à cet effet). Après 2 min, 5 μl sont encore additionnés ainsi qu'après 1,5 min. Enfin, après 1 min, 20 μl d'une solution de N-acétyltyrosine, 200 μl d'iodure de potassium et 200 μl d'urée stoppent la réaction de marquage. Après 2 à 5 min, l'échantillon est déposé sur une colonne, prête à l'emploi, de filtration sur gel PD-10 (Sephadex G-25 M, 1,5 X 5 cm, Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Sweden) équilibrée en solution HCl 4 mM, NaCl 75 mM, BSA 1 mg/ml. L'élution est réalisée par gravité avec la même solution. Des fractions d'environ 0,5 ml sont collectées en tubes plastique (polypropylène). Un échantillon de 1 μl de chaque tube est compté avec un compteur γ (Kontron MR 252, Zurich, Switzerland). La préparation est conservée à 4°C (ou congelée à -20°C) avec une activité de 2200 à 2960 kBq/ml (60 à 80 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$). La précipitation au TCA 15% est également vérifiée : 0,2 ml de TGF- β 1 radiomarqué, dilué sont additionnés de 0,6 ml de TCA

20% froid. Après incubation pendant 20 min sur un bain de glace, le tube eppendorf est centrifugé à 2500 g pendant 5 min et un volume de 0,5 ml du surnageant est compté.

1.4.2 Préparation des plaques de dosage

Réactifs :

- solution de gélatine (Sigma, USA) 0,1% en acide acétique 1 M
- milieu DMEM, BSA 1 mg/ml

Les cellules utilisées dans ce test sont les lignées NRK-49F et A549 (carcinome de poumon humain, American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA). Elles sont cultivées de façon courante en milieu DMEM 10% de SVF.

Une plaque vingt quatre puits (Costar) est revêtue de gélatine (0,5 ml) pendant 3 h à température ambiante (facultatif pour la lignée A549). Après deux lavages avec du tampon PBS et un lavage avec du milieu DMEM, environ 10^5 cellules/0,5 ml sont mises en culture dans du milieu DMEM 10% SVF pendant 24 h, presque jusqu'à confluence.

Pour ce qui concerne les cellules NRK-49F, une incubation additionnelle avec du milieu DMEM - BSA durant une nuit est réalisée alors que pour les cellules A549, il s'agit d'un lavage d'une heure à température ambiante sous agitation douce avec le tampon de fixation

1.4.3 Dosage

Réactifs :

- tampon de fixation NRK: PBS, CaCl_2 1,2 mM, MgCl_2 1,2 mM, HEPES 25 mM, BSA 1 mg/ml, pH 7,4
- tampon de fixation A549 : milieu DMEM sans bicarbonate, HEPES 25 mM, BSA 1 mg/ml, pH 7,4
- tampon de solubilisation : Triton X-100 1%, glycérol 10%, BSA 0,1 mg/ml, HEPES 20 mM, pH 7,4

Un volume de 0,2 ml de tampon de fixation contenant 0,625 ng/ml (25 pM) de TGF- β 1 radiomarqué et les dilutions de TGF- β 1 froid à doser est incubé sous agitation douce :

- 3 h à 4°C pour les cellules NRK-49F
- 2 h à température ambiante pour les cellules A549

Une gamme d'étalonnage de TGF- β 1 froid (R & D Systems) 1,25 à 20 ng/ml (50 à 800 pM) est réalisée ainsi qu'un témoin TGF- β 1 froid 200 ng/ml (8000 pM) permettant de déterminer la fixation non spécifique

Après trois lavages avec le tampon de fixation, la solubilisation (0,5 ml) est réalisée sous agitation pendant 20 min :

- à 4°C pour les cellules NRK-49F
- à température ambiante pour les cellules A549

La mesure de la radioactivité est effectuée sur la totalité des 0,5 ml de solubilisant et une courbe d'étalonnage : Radioactivité (cpm) en fonction de la concentration de TGF- β 1 froid est alors tracée.

1.5 Inhibition de l'incorporation de thymidine tritiée par les cellules CCL64

Le TGF- β (formes β 1 et β 2 équivalentes) possède la propriété d'inhiber la synthèse d'ADN chez les cellules épithéliales pulmonaires de vison (CCL64 ou Mv1Lu) en culture. Cette méthode est inspirée de Cone et coll. (1988, 36) et Miyazono et coll. (1987, 124).

Réactifs .

- [méthyl - ^3H]-thymidine (Amersham, 37 MBq/ml, 1 mCi/ml)
- solution de TCA 5%
- solution de solubilisation : NaOH 1 N, SDS 0,1%
- HCl 1 N
- liquide de scintillation : Ready Safe (Beckman, San Ramon, CA, USA)

La lignée CCL64 (Mv1Lu) nous a généreusement été donnée par le Docteur K. Miyazono (LICR, Uppsala, Suède). Les cellules sont cultivées de façon courante en milieu essentiel minimum (MEM avec sels d'Earle, Gibco BRL) 10% SVF.

Environ 10^5 cellules/0,5 ml de MEM 1% SVF sont incubées (plaque vingt quatre puits) pendant 24 h. Le milieu est changé pour du milieu DMEM 1% SVF contenant l'échantillon à tester (TGF- β 1 de la gamme d'étalonnage ou de l'essai). Après 20 h , 7,4 kBq/ml (0,2 $\mu\text{Ci/ml}$) de thymidine tritiée sont ajoutés et l'incubation est poursuivie pendant 4 h. Après un rinçage avec du tampon PBS froid, 0,5 ml de TCA froid sont laissés pendant 20 min. Après deux lavages avec le TCA et un lavage avec de l'eau distillée froide, une solubilisation par addition de 0,25 ml de NaOH 1 N - SDS 0,1% est effectuée pendant 20 min. Après addition de 0,25 ml d'une solution d'HCl 0,1 N, l'échantillon est transféré dans les flacons de comptage (Poly Q 18 ml, Beckman) et 4,5 ml de liquide scintillant (Ready Safe, Beckman) sont ajoutés. La radioactivité est mesurée sur compteur β (LS 1800 Beckman, Centre anti-cancéreux Alexis Vautrin) pendant 1 min.

Une gamme de TGF- β 1 (R & D Systems, 0,05 à 1 ng/ml ou 2 à 40 pM) permet le titrage et la quantification des échantillons (courbe d'étalonnage

semi-logarithmique : % d'inhibition en fonction du logarithme de la concentration en TGF- β 1)

Il est à noter qu'une adaptation de cette technique est possible pour un essai en plaque quatre vingt seize puits, très utile pour tester de nombreuses fractions chromatographiques

Les conditions du test sont identiques avec respect du changement d'échelle de surface (vingt quatre puits, 2 cm² ; quatre vingt seize puits, 0,32 cm²). Après incubation avec la thymidine tritiée, le surnageant est aspiré et le tapis cellulaire lavé à trois reprises avec du serum physiologique. Les cellules sont décollées par la trypsine (100 μ l/puits, 5 min à 37°C) et aspirées soigneusement à l'aide d'un appareil semi-automatique Harvester Mash II (Microbiological Associates, Bethesda, CA, USA) sur un filtre en fibres de verre calibré (Mash II, = 23-985, grade 934 AH, Whittaker, Walkersville, MD, USA). Le filtre est lavé une dizaine de fois avec du serum physiologique, séché à 37°C et les disques correspondants aux puits sont découpés et transférés en flacons de comptage (Sampules 7 ml, Wheaton, Millville, NJ, USA). Après incubation une nuit à 37°C avec 0,5 ml de liquide de solubilisation (Soluène 100, Packard, Downers Grove, IL, USA), 4,5 ml de liquide scintillant (Insta-Fluor, Packard) sont ajoutés et la radioactivité mesurée.

2 Obtention d'anticorps polyclonaux anti-TGF- β

Après étude antigénique du monomère de TGF- β 1 humain, la séquence d'un peptide synthétique a été choisie et la production d'anticorps polyclonaux réalisée chez le lapin.

2.1 Prédiction d'épitopes continus – Choix de la séquence d'un peptide synthétique

Van Regenmortel et de Marcillac (1988, 189) ont réalisé une évaluation de huit méthodes de prédiction d'épitopes continus des protéines par étude de leur structure primaire :

- hydrophilicités de Hopp et Woods (1981, 75)
et Parker et coll. (1986, 137)
- hydrophobicités inversées de Kyte et Doolittle (1982, 102)
et Eisenberg et coll. (1984, 50)
- feuillet β inversé de Garnier et coll. (1978, 60)
- acrophilicité de Hopp (1985, 76)
- mobilité de segment de Karplus et Schulz (1985, 91)
- antigénicité de Welling et coll. (1985, 199)

Ces huit méthodes ont été appliquées à l'étude du TGF- β 1. La séquence primaire étudiée est celle décrite par Derynck et coll. (1985, 45). Les échelles

ont été normalisées à l'échelle d'hydrophilicité de Hopp et Woods, mises à part celles de Karplus et Schulz qui incluent l'étude des acides aminés proches voisins (les résidus $N_{(n-3)}$ et $C_{(n-3)}$ terminaux conduisent à une valeur calculée nulle).

Pour celles-ci, sans altérer la procédure de lissage originale, un programme informatique en langage FORTRAN a été adapté par Monsieur le Docteur S. Prémilat du laboratoire de biophysique moléculaire (U.A. CNRS n° 494) de la Faculté des Sciences de l'Université de Nancy I.

Les acides aminés "épitope continu" ont été définis en utilisant un seuil correspondant à +0,7 fois l'écart type de l'étude statistique. Selon Van Regenmortel et de Marcillac, en utilisant ce seuil, les échelles donnant la meilleure évaluation sont :

- l'hydrophilicité de Parker et coll. (1986, 137)
- la mobilité de segment de Karplus et Schulz (1985, 91)
- le feuillet β inversé de Garnier et coll. (1978, 60)

Flanders et coll. (1988, 54) ont réalisé une étude expérimentale des anticorps polyclonaux produits chez le lapin contre plusieurs peptides synthétiques correspondant à différentes régions du TGF- β .

A l'aide de ces résultats, la séquence du peptide a été choisie (C-91-106) et la synthèse ainsi que le couplage (bisdiaminobenzidine) à des protéines porteuses (ovalbumine et BSA) ont été confiées aux Laboratoires Neosystem (Strasbourg, France), les taux de couplage étant de 25 moles de peptide/mole d'ovalbumine (conjugué C-91-106-OVA) et 15 moles de peptide/mole de BSA (conjugué C-91-106-BSA).

Une recherche d'homologie de séquence primaire du peptide C-91-106 a été réalisée par interrogation de la banque de données SWISSPROT grâce à l'aimable collaboration de Messieurs les Docteurs G. Fritz et F. Plewniak de l'INSERM U 184 (Strasbourg). Le programme utilisé est FASTA (Pearson et Lipman, 1988, 138).

2.2 Immunisation - Production des antisérums

Quatre lapins (P, C, S et B) Fauves de Bourgogne ont été immunisés (après une première saignée, dite pré-immune, P1m) avec différentes doses (100 à 1000 μ g) de conjugué C-91-106-OVA (0,5 ml en serum physiologique) en émulsion 50% adjuvant de Freund (Sigma, complet pour la première immunisation et incomplet pour les injections suivantes, intramusculaires ou intradermiques). Les rappels ont été effectués quinze jours (premier rappel, R1) puis une semaine après la primo-injection pendant trois semaines (première saignée, dite immune, Iml, dix jours après R3). Des injections d'entretien ont été réalisées tous les quinze jours :

- dose complète pendant cinq mois
- demi-dose tous les mois pendant cinq mois
- peptide non couplé jusqu'à Im29

Un essai de ré-immunisation (Im30 à Im35) avec du TGF- β 1 natif (TGF- β 1 après filtration sur gel de la méthode neutre) purifié au laboratoire, environ 100 ng de protéines) a été effectué dans la partie descendante du pic d'immunisation.

Une cinquantaine de saignées (dont trente correspondant à une immunisation par le peptide C-91-106 conjugué ou non) par entaille superficielle de la veine marginale de l'oreille (15 à 50 ml de sang sur tube sec) ont été réalisées dix à quinze jours après les rappels. Après coagulation 2 h à température ambiante et une nuit à 4°C, le sang est centrifugé à 3200 g pendant 30 min à 4°C, le serum recueilli et réparti est congelé à -80°C.

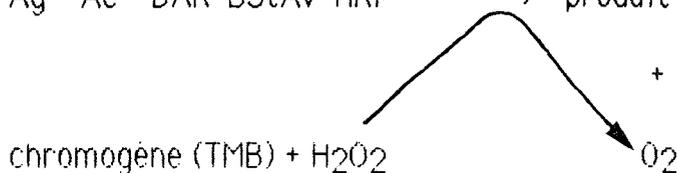
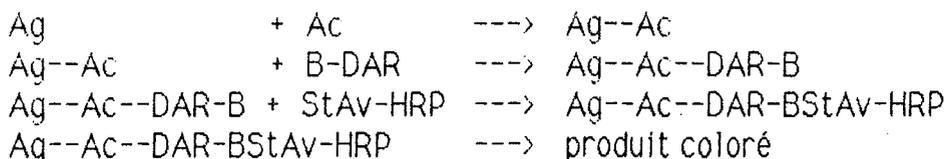
2.3 Caractérisation des antisérums

Les antisérums ont été caractérisés par détection de l'antigène sur phase solide en ELISA et immunoblotting et par réaction antigène/anticorps en phase liquide dans l'inhibition des propriétés du TGF- β 1 *in vitro*

2.3.1 "Enzyme-linked immunosorbent assay" (ELISA)

Un contrôle du degré d'immunisation des lapins a été réalisé après chaque saignée par ELISA sur peptide. Ce test consiste en un système de détection de l'antigène (Ag) sur phase solide à trois composantes A, B et C (ABC) :

- A : anticorps primaire (Ac) dirigé contre l'antigène (Ag) à détecter (dans notre cas, le peptide conjugué C-91-106-OVA et pour détecter le TGF- β 1)
- B : anticorps secondaire dirigé contre l'anticorps A et conjugué à la biotine (B-DAR)
- C : peroxydase conjuguée à la streptavidine (HRP-StAv)



Réactifs :

- tampon de revêtement : bicarbonate de sodium 35 mM, carbonate de

- sodium 15 mM, pH 9,6
- solution mère de peptide C-91-106 1mg/ml en eau distillée
- lait écrémé reconstitué
- tampon de lavage : PBS, tween-20 0,05%
- dilutions décimales de l'antiserum de lapin anti-C-91-106-OVA dans du lait
- anticorps immunopurifiés, biotinylés d'âne anti-IgG de lapin (B-DAR, Amersham) dilués au 1/1000 dans du lait
- peroxydase de raifort conjuguée à la streptavidine (HRP-StAv, Zymed, South San Francisco, CA, USA) diluée au 1/1000 en tampon de lavage
- tampon de révélation : acetate de sodium 140 mM, citrate de sodium 100 mM, pH 6 (solution d'acétate de sodium 60 mM ajustée à pH 6 par addition d'acide citrique 100 mM)
- solution mère de TMB à 1% en DMSO conservée en échantillons à -30°C
- substrat de révélation : 3, 3', 5, 5' tetramethylbenzidine (TMB, Fluka, Buchs, Switzerland) 0,01%, peroxyde d'hydrogène 0,012% en tampon de révélation (Bos et coll. 1981, 15)
- solution d'acide sulfurique 2 M

Environ 200 ng de peptide C-91-106 (100 µl/puits) en tampon de revêtement sont incubés une nuit à 4°C en plaque ELISA quatre vingt seize puits (Costar). Après trois lavages avec le tampon de lavage (laveuse de microplaque Titertek 120, Flow Laboratories), les sites libres sont saturés par incubation durant 1 h à 37°C avec 150 µl de lait écrémé. Après lavages, 100 µl des dilutions décimales en lait (1/1 à 1/10⁷) de l'antiserum à tester sont incubés pendant 1 h à 37°C (trois puits par essai et témoins négatifs). Après lavages, 100 µl de B-DAR dilué au 1/1000 en lait sont incubés pendant 1 h à 37°C. Après lavages, les puits reçoivent 100 µl de HRP-StAv diluée en tampon de lavage pour une incubation de 15 à 30 min à 37°C. Après cinq lavages et un rinçage (200 µl) avec du tampon de révélation, la révélation est effectuée par addition de 100 µl de substrat de révélation. La réaction (coloration bleue) est développée durant 5 à 15 min à température ambiante puis stoppée par addition de 25 µl d'H₂SO₄ 2 M. L'intensité de coloration du composé jaune est évaluée par spectrophotométrie à 450 nm (lecteur de microplaques Titertek Multiskan plus MKII, Flow Laboratories ; imprimante Epson LX-800).

Une courbe : dilutions de l'antiserum en fonction de l'absorbance à 450 nm permet de déterminer la dilution correspondant à 50% de l'absorbance maximale observée : la dilution efficace 50%, ED₅₀.

2.3.2 Immunoblotting

Après séparation par électrophorèse, les protéines d'un échantillon complexe sont transférées sur une membrane. Des anticorps spécifiques d'une

des protéines reconnaissent celle-ci sur la membrane et le complexe antigène/anticorps est mis en évidence par un système approprié.

2.3.2.1 Electrophorèse en gel de polyacrylamide (gradient 8-25%) en présence de SDS

Nous disposons d'un système d'électrophorèse/coloration PhastSystem (Pharmacia LKB Biotechnology) et les techniques utilisées sont réalisées selon les instructions du fabricant.

Réactifs :

- tampon d'échantillon : 10 mM Tris-HCl, pH 8, EDTA 1 mM, 2,5% SDS
- tampon réduction : tampon échantillon, β -mercapto-éthanol 5%, 5 min à 100°C ou tampon échantillon, dithiotreitol (DTT) 10 mM, 3 min à 95°C puis addition d'iodoacétamide 31 mM (concentration finale)
- kit de calibration de protéines de petits poids moléculaires (94,0 à 14,4 kDa, Pharmacia LKB Biotechnology)

Des gels avec gradient de polyacrylamide 8-25% (PhastGel Gradient 8-25, zone de séparation de 6 à 300 kDa) et des ponts de migration (SDS Buffer Strips) prêts à l'emploi sont utilisés. Les dépôts (tolérance de NaCl 0,75 M pour des valeurs de pH 7-10), de volume variable selon les peignes utilisés (0,3 μ l, douze puits ; 1,0 μ l, huit puits ; 4,0 μ l, six puits) sont réalisés automatiquement. Les charges protéiques conseillées sont de 20-30 ng de chaque protéine/ μ l (< 2000 ng/ μ l) pour une coloration au bleu de Coomassie et de 0,3-0,5 ng de chaque protéine/ μ l (< 50 ng/ μ l) pour une coloration argentique. La migration électrophorétique d'une durée d'environ 25 min est réalisée à 250 V affichés et à 15°C. Les protéines séparées par l'étape d'électrophorèse sont transférées sur une membrane ou colorées dans le module de coloration automatique

2.3.2.2 Transfert des protéines

Deux types de transfert, également réalisé à l'aide du PhastSystem selon les indications du fabricant, sont possibles :

- par diffusion thermique
- par champ électrique

Réactifs :

- tampon de lavage : Tris 20 mM, NaCl 500 mM
- tampon de transfert : Tris 25 mM, glycine 192 mM, méthanol 20%, pH 8,3

- lait écrémé reconstitué
- antiserum de lapins anti-C-91-106-OVA (se reporter au chapitre 2 "Obtention d'anticorps polyclonaux anti-TGF- β) dilué au 1/10 dans du lait
- anticorps immunopurifiés, biotinylés d'âne anti-IgG de lapin (B-DAR, Amersham) dilués au 1/400 dans du lait
- peroxydase de raifort conjuguée à la streptavidine (HRP-StAv, Zymed) diluée au 1/400 en tampon de lavage
- substrat de révélation (préparation extemporanée) : 10 mg de 4-chloro-1-naphtol (4C1N, Sigma) sont dissouts dans 3,3 ml de méthanol à 4°C. Un volume de 16,7 ml de tampon de lavage contenant 10 μ l de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) 30% à 4°C sont alors ajoutés et le substrat utilisé tout de suite.

Le port de gants et l'utilisation d'une petite pince sont nécessaires lors de la manipulation du gel et de la membrane de blotting.

Transfert par diffusion thermique

Après séparation électrophorétique des protéines, le gel est laissé sur la platine de l'appareil. Une membrane de nitrocellulose Hybond C extra (0,45 μ m, 5 X 5 cm, Amersham) hydratée en eau distillée, bouillie est placée à la surface du gel et ensuite recouverte d'une feuille (5 X 5 cm) de papier Whatman (Maidstone, England) 3 MM Chr puis d'une plaque de verre, le tout maintenu par un poids. La température est progressivement élevée à 70°C et maintenue pendant 30 min. Après réhydratation de la membrane, celle-ci est décollée, prête à subir la partie détection immunologique. Il est possible de colorer le gel pour vérifier la qualité du transfert (module de coloration automatique).

Transfert par champ électrique

Après séparation électrophorétique des protéines, le gel est décollé de son support plastique à l'aide d'un petit appareil prévu à cet effet. Le gel très fragile, tenu par sa partie 25% de polyacrylamide, est équilibré dans le tampon de transfert pendant quelques minutes ainsi que la membrane de nitrocellulose. Celle-ci est alors placée sur le gel reposant sur trois feuilles (5 X 5 cm) de papier Whatman 1 Chr imbibées de tampon de transfert, placées sur la cathode du système de transfert électrique Pharmacia LKB Biotechnology. Trois autres feuilles recouvrant la membrane, l'anode est mise en place. Un transfert d'environ 15 min est alors effectuée à 20 V affichés à 15°C. La membrane décollée est prête à subir la partie détection immunologique.

2.3.2.3 Coloration des protéines

Les protéines séparées par l'étape d'électrophorèse sont colorées pour analyse SDS-PAGE en tant que telle ou pour vérifier la qualité du transfert dans la méthode d'immunoblotting. Les méthodes de coloration (au bleu de Coomassie ou argentique) sont réalisées, selon les instructions du fabricant, dans le module de coloration automatique du PhastSystem.

Coloration au bleu de Coomassie (environ 45 min)

Reactifs

- A : solution colorante : 0,1% Bleu de Coomassie R-250, 30% méthanol, 10% acide acétique
- B : solution décolorante : 30% méthanol, 10% acide acétique
- C : solution de conservation : 5% glycérol, 10% acide acétique

Coloration argentique (la plus utilisée du fait des petites quantités de TGF- β 1 mises en jeu, environ 1 h)

Réactifs

- solution A : 50% éthanol, 10% acide acétique
- solution B : 10% éthanol, 5% acide acétique
- solution C : 8,3% glutardialdéhyde (préparation extemporanée)
- solution D : 0,25% nitrate d'argent (préparation extemporanée)
- solution E : 2,5% carbonate de sodium, 0,04% formaldéhyde (préparation extemporanée)
- solution F : 5% acide acétique
- solution G : 10% acide acétique, 5% glycérol

Les solutions doivent être préparées avec une eau de très bonne qualité (eau bidistillée), surtout pour la coloration argentique. L'appareil utilise pour chaque étape un volume de 80 ml, il est donc utile de préparer 100 ml de solution pour chaque étape. Après coloration, le gel est séché à l'air libre ou en étuve à température modérée. L'exploitation peut se faire directement ou après montage du gel sous la forme d'une diapositive et projection.

2.3.2.4 Détection immunologique

Il s'agit comme pour la technique ELISA, d'un système de détection de l'antigène sur phase solide à trois composantes (voir technique précédemment décrite au chapitre 2.3.1 "ELISA").

Toutes les étapes sont réalisées à température ambiante. La membrane est placée dans la solution saturante (lait) durant une heure pour bloquer les sites libres. Après un rinçage en eau distillée et deux lavages en tampon de

lavage pendant 15 min, la membrane est incubée pendant 1 h avec l'anticorps primaire (antiserum anti-C-91-106-OVA). Après rinçage et lavages, le second anticorps (B-DAR) est incubé pendant 1 h, comme précédemment.

Après rinçage et lavages, la membrane est incubée pendant 30 min avec le système enzymatique de révélation (HRP-StAv). Après une dernière procédure de rinçage et lavages, un temps de contact d'environ 10 min avec le substrat permet de révéler les protéines TGF- β reconnues par l'anticorps primaire. La réaction est stoppée par rinçage de la membrane dans l'eau distillée. Après séchage entre deux feuilles de papier filtre, la membrane doit être conservée à l'abri de la lumière car sinon, la coloration disparaît très vite.

Il est à noter que la spécificité des antisérums et la sensibilité de la technique ont été évaluées par utilisation de TGF- β 1 du commerce (R & D Systems). Les tests de blocage ont été réalisés par incubation de la dilution de l'antiserum au 1/10 dans le lait avec un excès de 100 μ g/ml de peptide ou 10 μ g/ml de TGF- β 1 pendant 1 h à température ambiante et une nuit à 4°C.

2.4 Purification des anticorps

2.4.1 Précipitation au sulfate d'ammonium

Une précipitation du sérum au sulfate d'ammonium à 50% de saturation (agitation 1 h à 4°C et centrifugation à 3800 g pendant 15 min à 4°C) permet un enrichissement grossier en immunoglobulines. Le précipité est repris par un petit volume de tampon PBS et dialysé contre ce même tampon PBS.

2.4.2 Chromatographie FPLC d'échange d'anions

Réactifs .

- solution A : tampon phosphate de sodium/potassium 0,16 M, pH 6,5
- solution B : tampon phosphate de sodium/potassium 0,30 M, pH 6,5

Il s'agit d'une méthode de séparation grossière d'une fraction sérique contenant les IgG et les IgA d'une autre fraction contenant les IgM (Sampson et coll. 1984, 62) par système FPLC sur colonne Mono Q HR 5/5 (0,5 X 5 cm, Pharmacia LKB Biotechnology). Le sérum est dilué au 1/5 avec la solution A et la préparation (0,5 ml) injectée (611 cm/h, 120 ml/h) après filtration 0,45 μ m (filtre HPLC Millex, Millipore) sur la colonne équilibrée en cette même solution. La fraction de lavage est collectée car contenant les IgG et IgA. Les IgM sont éluées par gradient 0 à 100% de solution B en 2 min.

2.4.3 Chromatographie d'affinité sur protéine A-Sepharose

Réactifs :

- solution d'éluion : acide acétique 0,1 M, NaCl 0,15 M

- solution de Tris 4 M

Il s'agit d'une méthode de purification spécifique des IgG à partir du sérum de lapin (Goding 1978, 497). Le gel (Protein A-Sepharose, Pharmacia LKB Biotechnology) est mis à gonfler et lavé plusieurs fois en tampon PBS avant d'être coulé en colonne (C 10/10 Pharmacia LKB Biotechnology, 1 X 5,5 cm). Le sérum est injecté (12,7 cm/h, 10 ml/h) sur la colonne équilibrée en PBS. Après lavage, les IgG sont éluées avec la solution d'éluion et dialysées après neutralisation (présence de 3% de solution de Tris dans les fractions d'éluion) contre le tampon PBS. La concentration en IgG est évaluée par spectrophotométrie à 280 nm ($A_{280}^{1\%} = 14$).

2.4.4 Chromatographie d'immuno-affinité

Les anticorps spécifiques sont purifiés par immuno-affinité sur le peptide conjugué à la BSA (C-91-106-BSA) immobilisé sur Sepharose CL-4B (Pharmacia LKB Biotechnology).

2.4.4.1 Préparation de l'immuno-adsorbant

Réactifs :

- tampon de couplage : bicarbonate de sodium 0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 8,5
- solution aqueuse de bromure de cyanogène 10% (préparation extemporanée)
- solution de NaOH 10 N
- solution d'éthanolamine 1 M, pH 8
- solution d'éluion : thiocyanate de sodium 3 M en tampon acétate de sodium 0,1 M, pH 6

Le conjugué peptide-BSA est immobilisé sur Sepharose CL-4B activé au bromure de cyanogène selon la méthode de Cuatrecasas et coll. 1968, 37).

Toute la partie activation du support est réalisée sous hotte aspirante. Le gel Sepharose CL-4B prêt à l'emploi, est lavé plusieurs fois par suspension en eau distillée et essorage sur verre fritté. Un volume de solution de bromure de cyanogène à 10% (préparée extemporanément par dissolution en eau distillée sous agitation vigoureuse) est ajouté à un volume de Sepharose CL-4B dans un bécher placé dans un bain de glace (réaction d'activation exothermique). Le pH (mesure directe, électrode au KCl) est maintenu à une valeur de 11 par addition continue de soude 10 N jusqu'à stabilisation du pH. Le gel est alors lavé plusieurs fois avec de l'eau distillée et avec le tampon de couplage à 4°C. Le support activé (fonctions ester de cyanate instables à pH basique) est utilisé immédiatement.

Un volume de conjugué C-91-106-BSA (dilué en tampon de couplage basique, 926 µg/ml) est ajouté à un volume de gel activé et laissé une nuit à 4°C.

sous agitation douce (les groupements amine primaire des acides aminés forment des liaisons covalentes avec les fonctions ester de cyanate). Après trois lavages avec du tampon de couplage pour éliminer le conjugué non fixe, les sites actifs libres sont saturés par incubation durant 2 h avec un volume de la solution d'éthanolamine à température ambiante. Après trois lavages pendant 15 min avec la solution d'éluion pour éliminer les interactions protéine/protéine et plusieurs lavages avec du tampon PBS, le gel est prêt à utilisation ou peut être conservé en présence d'azide de sodium 0,02% à 4°C.

Il est à noter que l'efficacité et le taux de couplage sont évalués par mesure de la concentration protéique par spectrophotométrie à 280 nm dans les effluents de couplage (avant l'étape de saturation) comparée à la solution de conjugué peptide-BSA mise en jeu.

2.4.4.2 Immunopurification des anticorps

La purification est suivie par système de détection à 280 nm et collecte de la totalité des pics effluents. La colonne (IBF 11A, IBF-Biotechnics, Villeneuve la Garenne, France, 0,9 X 7 cm) subit un cycle de lavage PBS puis solution d'éluion et équilibrage en PBS avant chaque utilisation. Le serum est directement injecté sur la colonne à un débit de 15,7 cm/h (10 ml/h) et la colonne abondamment lavée avec le tampon PBS. Après éluion avec la solution d'éluion, les anticorps sont dialysés une nuit à 4°C contre du tampon PBS.

2.5 Inhibition des propriétés du TGF- β 1 *in vitro* par les antisérums et les anticorps purifiés

Il s'agit ici d'une réaction antigène/anticorps en phase liquide. Celle-ci est réalisée par incubation de la dilution d'antisérum (ou les anticorps immunopurifiés, se référer au chapitre 2.4 "Purification des anticorps") avec les différentes concentrations de TGF- β 1 (R & D Systems) durant 1 h à température ambiante puis une nuit à 4°C. Un contrôle négatif est toujours réalisé dans les mêmes conditions sans TGF- β 1. Une gamme très large de dilutions des antisérums (1/10 à 1/10000) ou de concentration des anticorps (0,1 à 100 μ g/ml) a été testée.

2.5.1 Induction de la croissance de cellules NRK-49F en agar semi-solide

(voir technique précédemment décrite au chapitre 1.3 "Induction de la croissance de cellules NRK-49F en agar semi-solide", concentration de TGF- β 1 utilisée : 2 ng/ml, 80 pM)

2.5.2 Fixation de TGF- β 1 radiomarqué au récepteur cellulaire

(voir technique précédemment décrite au chapitre 1.4 "Fixation compétitive de TGF- β 1 radiomarqué au récepteur cellulaire", concentration de TGF- β 1 radiomarqué utilisée : 2,5 ng/ml, 100 pM)

2.5.3 Inhibition de l'incorporation de thymidine tritiée par les cellules CCL 64

(voir technique précédemment décrite au chapitre 1.5 "Inhibition de l'incorporation de thymidine tritiée par les cellules CCL64", concentration de TGF- β 1 utilisée : 0,25 ng/ml, 10 pM)

2.6 Utilisation des antisérums en immuno-électrodifusion

L'immuno-électrodifusion est une technique de dosage immunologique d'un antigène qui, durant une séparation électrophorétique dans un gel d'agarose contenant des anticorps spécifiques de cet antigène, conduit à la formation d'un précipité antigène/anticorps de forme allongée : une fusée ascendante. La possibilité de doser l'antigène TGF- β 1 par cette méthode spécifique et rapide a été étudiée. Une méthode "classique" a tout d'abord été réalisée puis une microtechnique a été développée selon les instructions du fabricant par utilisation du PhastSystem (Pharmacia LKB Biotechnology).

Réactifs .

- tampon stock 5X : barbital 122 mM, Tris 366 mM, lactate de calcium 2 mM, azide de sodium 12 mM
- solution d'agarose HSB (Litex, Glostrup, Denmark) 2% en eau distillée
- solution de décoloration : eau distillée - acide acétique - méthanol (6/1/3)
- solution colorante : bleu de Coomassie R-250 0,1% en solution de décoloration
- extraits plaquettaires neutres (méthode neutre) dont la concentration saline a été ajustée à 1 X par addition de PBS 10 X
- des échantillons de TGF- β 1 purifiés (LLC humain d'origine plaquettaire) et recombinants (SLC) généreusement fournis par Monsieur le Docteur K. Miyazono (LICR, Uppsala, Suède)

Méthode "classique"

La solution d'agarose est portée à ébullition, sous agitation puis maintenue au bain marie à 56°C. Une plaque de verre 10 X 12,5 cm en est badigeonnée de quelques gouttes étalées rapidement et la plaque est séchée et

maintenue à 100°C. Une préparation de 3 ml de tampon stock 5X, 0,75 ml d'eau distillée maintenue à 56°C est mélangée à 7,5 ml d'agarose et 3,75 ml d'antisérum. Le tout est rapidement coulé sur la plaque de verre. Après solidification pendant 30 min à 4°C en chambre humide, des puits de 4 mm de diamètre sont percés à l'emporte-pièce (1,5 cm du bord cathodique). Les échantillons (5 μ l) à tester sont rapidement déposés et une migration électrophorétique (250 V affichés - 20 V/cm -, système d'électrophorèse Multiphor, Pharmacia LKB Biotechnology) d'une durée de 2 h à 15°C est effectuée après mise en place de ponts (papiers Whatman 3 MM Chr) dans le tampon d'électrophorèse (tampon stock 2,5 X). La plaque est alors lavée une nuit à température ambiante dans du PBS et 1 h en eau distillée. Séchée (recouverte d'une feuille de papier Whatman 1 Chr imbibée d'eau distillée), la plaque est colorée pendant 15 min. Après plusieurs bains de décoloration, la plaque est à nouveau séchée.

Microméthode

Les conditions de réalisations sont similaires à la méthode "classique". Le support est un film plastique (4,3 X 5 cm, Gelbond Pharmacia LKB Biotechnology) collé par une goutte d'eau (face inférieure hydrophobe) sur une plaque de verre et le volume de gel utilisé est de 2 ml. Après solidification en chambre humide et 5 min à 4°C, les puits (2,5 mm) sont creusés et les échantillons (1 μ l) déposés. Le gel est alors placé sur la platine de l'appareil et les ponts (constitués d'agarose IEF Pharmacia LKB Biotechnology, 2% en tampon stock 5X coulés dans une matrice standard) sont mis en place. La migration électrophorétique (100 V affichés - 20 V/cm - à 15°C) dure environ 1 h. Trois feuilles de papier Whatman 1 Chr imbibées de serum physiologique sont placées sur le gel (sur une plaque de verre). Deux tissus éponge secs sont eux-mêmes déposés sur les papiers, le tout étant maintenu par une autre plaque de verre avec un poids d'environ 1 kg pendant 1-2 h. La même opération est réalisée avec de l'eau distillée pendant 15-30 min. Le gel séché est placé dans le module de coloration automatique.

Après séchage, le gel peut être interprété directement ou par projection après montage en diapositive.

Dans le but de diminuer le bruit de fond observé dans ces essais, différentes méthodes d'enrichissement et de purification des anticorps ont été utilisées (voir chapitre 2.4 "Purification des anticorps"). La proportion d'anticorps plus ou moins purifiés est respectée en référence à la dilution résultante.

2.7 Utilisation des anticorps immunopurifiés en immunohisto- et -cytochimie

Les anticorps obtenus par immunisation avec un peptide synthétique en place de la protéine native sont les réactifs de choix pour une étude immunohistochimique. Pour compléter la caractérisation des anticorps anti-C-91-106-OVA, ceux-ci ont été utilisés au Centre anti-cancéreux Alexis Vautrin de Nancy-Brabois (sous la direction de Monsieur le Docteur M. Parache, Chef du service d'anatomie pathologique) pour une étude Immunohisto- ou -cytochimique sur divers tissus normaux ou pathologiques et sur des frottis frais de moelle osseuse, humaine, aimablement fournis par Monsieur le Docteur J. P. Aymar et avec les conseils de Monsieur le Docteur J. C. Humbert du C.R.T.S. de Nancy-Brabois.

Réactifs

- acétone - méthanol (1/1)
- formol neutre tamponné : formol 40% - hydrogénophosphate de sodium 46 mM, dihydrogénophosphate de sodium 29 mM, pH 7,0 (1/9)
- solution de peroxyde d'hydrogène 3% (Immunostaining kit Histogen, Biogenex Laboratories, San Ramon, CA, USA)
- lait écrémé reconstitué
- anticorps de lapin anti-C-91-106-OVA immunopurifiés (4 µg/ml dans du lait)
- IgG de lapin, purifiées sur protéine A-Sepharose (à partir de serum pré-immun, 4 µg/ml dans du lait)
- anticorps immunopurifiés, biotinylés d'âne anti-IgG de lapin (B-DAR, Amersham) dilués au 1/200 dans du lait
- peroxydase de raifort conjuguée à la streptavidine (HRP-StAv, Zymed) diluée au 1/500 en tampon PBS
- substrat de révélation : 3-amino-9-éthylcarbazole (AEC, Immunostaining kit)

Les pièces de tissu sont fixées dans le fixateur de Boin alcoolique ou dans le formol neutre tamponné. Après inclusion des tissus fixés en paraffine, des coupes de 4-5 µm d'épaisseur sont collées sur des lames en verre par incubation pendant une nuit à 56°C. Les coupes sont alors déparaffinées dans le toluène, progressivement réhydratées dans l'éthanol puis laissées en tampon PBS. Les peroxydases endogènes sont bloquées par incubation pendant 10 min avec quelques gouttes de peroxyde d'hydrogène 3%. Après rinçage en tampon PBS, les coupes sont incubées une nuit à 4°C avec les anticorps immunopurifiés anti-C-91-106-OVA 4 µg/ml (lait). Il est à noter que, systématiquement, une lame témoin négatif ne subit pas cette première incubation. Après lavage en tampon PBS, une incubation pendant 1 h à température ambiante avec le second anticorps (B-DAR dilué au 1/200 dans du lait) est réalisée. Les coupes sont

alors incubées pendant 1 h à température ambiante avec le système enzymatique de révélation (HRP-StAv dilué au 1/500 en tampon PBS) après lavage. Après un dernier lavage, la révélation est effectuée par incubation pendant environ 30 min avec le substrat de révélation. Viennent ensuite la contre coloration à l'hématoxyline et le montage des lames.

Un témoin négatif a été réalisé ponctuellement en utilisant des IgG de lapin (purifiées par chromatographie d'affinité sur protéine A Sepharose, serum pré-immun) en place des anticorps primaires anti-C-91-106-OVA.

Un test de blocage des anticorps immunopurifiés anti-C-91-106-OVA par le peptide C-91-106 (100 µg/ml) et par le TGF-β1 natif (R & D Systems, 10 µg/ml) a également été réalisé (selon les conditions précédemment décrites au chapitre 2.3.2.4 "Détection immunologique") sur des coupes d'un tissu ayant déjà démontré un immunomarquage positif (prostate).

Pour ce qui concerne les lames de moelle osseuse, des frottis frais sont fixés et conservés dans un mélange acétone/méthanol à température ambiante. Les peroxydases endogènes sont bloquées par incubation pendant 15 min à température ambiante dans une solution (préparée extemporanément) de peroxyde d'hydrogène 0,6% en méthanol 80%. Après lavage en tampon PBS, les frottis sont incubés pendant 1 h à température ambiante dans du lait pour bloquer les sites libres. Après rinçage en tampon PBS, les opérations de détection immunologique, décrites ci-dessus, sont alors accomplies.

Un test immunocytochimique a également été réalisé sur des frottis plaquettaires (concentrés plaquettaires, humains, périmes) fixés dans l'acétone à -20°C pendant 10 min. Puis, après un séchage rapide, les lames sont conservées à -20°C jusqu'à leur utilisation après un lavage en tampon PBS.

Une étude particulière sur des cellules musculaires lisses a été effectuée par immunocytochimie et immunoblotting.

Les cellules musculaires lisses, trachéales, humaines (isolées par la méthode des explants, passage 1), aimablement fournies par Madame le Docteur N. Martinet (INSERM U14) ont été cultivées en milieu DMEM additionné de SVF 10%.

Des lames de verre ont été dégraissées par sonication, à deux reprises, en acétone puis méthanol. Après lavage en eau distillée et stérilisation par chaleur sèche à 160°C pendant 2 h, les lames ont été revêtues par incubation à 4°C pendant 2 h dans un mélange de fibronectine bovine (Sigma) 10 µg/ml, collagène type I de rat (Gibco) 10 µg/ml, BSA (fraction V, Sigma) 0,1 µg/ml en tampon PBS. Des cellules musculaires lisses (passage 1) ont été cultivées sur ce support ainsi qu'en boîte 75 cm² (passage 2) pour préparer un milieu conditionné.

Les cultures sur lame (non confluentes), soigneusement rincées avec du milieu DMEM seul, ont été fixées pendant une nuit à température ambiante en

formol neutre tamponné. Il est à noter qu'une lame a été colorée par la méthode de Papanicolaou (pour étude morphologique). Après lavage en tampon PBS, les lames subissent les opérations de détection immunologique décrites ci-dessus.

Après trois lavages d'une culture confluente en boîte 75 cm² avec le milieu DMEM seul, le milieu conditionné a été préparé par incubation durant 24 h avec un demi-volume (12,5 ml pour une boîte de 75 cm²) de milieu DMEM seul. Après centrifugation à 3200 g pendant 15 min à 4°C, le surnageant a été concentré deux cent fois par ultrafiltration (système Millipore, membrane à seuil de coupure 10 kDa).

Après collecte des cellules de cette culture à l'aide d'un "rubber policeman" (Costar), un extrait cellulaire (100 µl) a été préparé par sonication (Soniprep 150, OSI, Paris, France) pendant 10 secondes à 4°C (amplitude de 10 µm).

Une analyse par immunoblotting (SDS-PAGE avec gradient 8-25%) du milieu conditionné et de l'extrait cellulaire (non activés et activés) a été réalisée.

3 Purification du TGF-β1 humain d'origine plaquettaire

Compte tenu de l'**extrême hydrophobicité** et de l'adhérence du TGF-β à une grande variété de matériaux, il est préférable de manipuler les préparations de ce facteur de croissance dans des récipients plastiques (le **polypropylène** est le plastique de choix, Wakefield 1987, 191) ou en **verre siliconé**. La verrerie utilisée est traitée avec du Rhodorsil (Prolabo), émulsion silicone E 70001 à 1% en eau distillée pendant 20 min, à température ambiante. Après un égouttage soigneux, il est procédé à une cuisson à 210°C (chaleur sèche) pendant 1h30. L'addition à l'échantillon de BSA 1 mg/ml est souhaitable.

3.1 La source de TGF-β1

Les concentrés standards de plaquettes humaines (un concentré provenant d'une unité standard de sang prélevée sur 67,5 ml de solution anticoagulante (ACD, acide citrique/citrate de sodium/dextrose) - Environ 50 ml de plasma pH 6,8 contenant environ 5.10¹⁰ plaquettes) sont collectés le jour même de leur péremption (cinquième jour après préparation, conservation sous agitation horizontale à température ambiante) au Centre Régional de Transfusion Sanguine de Nancy-Brabois.

Précautions de manipulation : Il est souhaitable de manipuler les dérivés sanguins avec port d'une blouse et de gants de protection et de désinfecter les objets en contact avec les solutions antiseptiques adéquates. La protection des yeux n'est pas superflue notamment lors de l'ouverture des poches plastiques des concentrés plaquettaires. Les plaquettes sont adhérentes au verre et donc

activables sur cette surface. Il est donc nécessaire de manipuler les préparations plaquettaires dans des récipients plastiques ou en verre traité.

Compte tenu des conditions de préparation et de conservation des concentrés plaquettaires, un dosage de la β -tromboglobuline (β -TG), marqueur de l'activation plaquettaire (sécrétion), a été réalisé ponctuellement, à l'aide d'un kit RIA (Amersham), au C.R.T.S. de Nancy-Brabois.

Après centrifugation (centrifugeuse GR.11, Jouan, Saint Herblain, France) dans des pots en plastique à 3200 g pendant 30 min et à 20°C, le plasma est éliminé le plus soigneusement possible. Le culot plaquettaire est recueilli :

- directement, à l'aide d'une spatule
- après homogénéisation avec une solution de lyse

Cette étape dépend de l'utilisation future des plaquettes. Les préparations sont conservées à -30°C dans des récipients en plastique jusqu'à l'obtention d'un nombre suffisant à la réalisation d'une purification.

3.2 Purification du TGF- β 1 selon la méthode d'Assoian

Cette méthode décrite par Assoian et coll. (1983, 6 ; Assoian 1987, 7) concerne la purification de TGF- β 1 plaquettaire humain par extraction à l'éthanol acide de culots plaquettaires lavés, précipitation à l'éthanol/éther et deux étapes de filtration sur gel.

3.2.1 Lyse-extraction

Réactifs .

- solution anti-coagulante ACD (formule A) : acide citrique 38 mM, glucose 2,2%, citrate de sodium 88 mM
- tampon Tris-HCl/citrate : neuf volumes de tampon Tris-HCl 17 mM, pH 7,5, glucose 0,1% et un volume de solution anti-coagulante ACD
- éthanol acide : éthanol 93%, HCl 235 mM, PMSF 1 mM, pepstatine 5 μ g/ml

Le culot plaquettaire centrifugé est lavé à deux reprises par resuspension en tampon Tris-HCl/citrate (Antoniades et coll. 1979, 2), 20 ml par concentré. Un volume de 4 ml d'éthanol acide (Roberts et coll. 1980, 144) par concentré plaquettaire est alors ajouté au culot lavé, centrifugé. Après homogénéisation de la préparation à l'aide d'un homogénéiseur (Ultra Turrax, Janke & Kunkel, Staufen, Deutschland), le volume d'extrait est ajusté à 6 ml/concentré avec de l'eau distillée (ED) et laissée une nuit à 4°C. Après centrifugation (centrifugeuse J 2-21, rotors JA 14 et JA 17, Beckman,) à 11000 g durant 15

min à 4°C, le pH du surnageant est ajusté à une valeur de 3, à l'aide d'ammoniaque concentré.

Après précipitation par addition à la préparation de 2 volumes d'éthanol 95% et de 4 volumes d'oxyde de diethyl (éther) froid (une nuit à 4°C), le précipité est collecté par centrifugation à 30000 g pendant 1 h et à 4°C. Un volume de 0,5 ml d'acide acétique 1 M/concentré est utilisé pour reprendre le précipité. Après dialyse (Spectra/POR 3 (3500 Da), Spectrum Medical Industries, Los Angeles, CA, USA) contre une solution d'acide acétique M et centrifugation à 30000 g pendant 30 min et à 4°C, l'échantillon contenant 8% de saccharose est prêt à subir la première filtration sur gel.

3.2.2 Filtration sur gel 1 (Biogel P-60 coarse)

Cette première étape est réalisée sur un support polyacrylamide Biogel P-60 (coarse, 50-100 mesh, Biorad, Richmond, CA, USA).

Le support (14 ml de gel pour 1 g de support) est mis à gonfler dans une solution d'acide acétique 1 M dégazée. Après deux lavages et dégazage soigneux, la colonne (K 50/100, Pharmacia LKB Biotechnology) est coulée puis placée à 4°C, en armoire frigorifique. Un lavage conséquent et le conditionnement du gel sont alors réalisés par application (pompe Minipuls II, Gilson, Villiers le Bel, France) du débit de travail 1 cm/h (20 ml/h).

La colonne (5 X 83,5 cm) est calibrée par application d'un échantillon (2 ml) contenant 1 mg/ml d'un mélange de protéines (Sigma) BSA fraction V (68 kDa), chymotrypsinogène A (27 kDa), cytochrome C (12,5 kDa) et insuline (6 kDa) en acide acétique 1 M contenant 8% de saccharose. La détection des protéines est réalisée par suivi de l'absorbance à 280 nm (DéTECTEUR 2 voies - enregistreur Pharmacia LKB Biotechnology).

L'échantillon est injecté sur la colonne dans les mêmes conditions. Des fractions de 5 ml sont collectées (collecteur MTDC Gilson) en tubes plastiques (polypropylène) ou verre siliconé.

3.2.3. Filtration sur gel 2 (Biogel P-60 fine)

Réactif : acide acétique 1 M - urée 8 M. Une solution d'urée 8 M est réalisée en acide acétique M puis, la concentration en acide acétique est réajustée en ajoutant de l'acide acétique glacial. Le maintien de l'urée en milieu acide permet d'éviter la carbamylation des protéines durant la filtration sur gel préparative. Un dégazage soigneux de la solution est important.

Cette seconde étape est réalisée sur Biogel P-60 (fine, 100-200 mesh, Biorad).

Le support est mis à gonfler dans une solution d'acide acétique M. Après trois lavages dans la solution acide acétique 1 M - urée 8 M et dégazage soigneux, la colonne (C 16/100, Pharmacia LKB Biotechnology) est coulée. Un

lavage conséquent et le conditionnement de la colonne sont réalisés au débit de travail de 1,5 cm/h (3ml/h)

La colonne (1,6 x 80 cm) est calibrée par application d'un échantillon (2 ml) d'un mélange de protéines (1 mg/ml en solution acide acétique 1 M - urée 8 M contenant 8% de saccharose) constitué de BSA, chymotrypsinogène A, cytochrome C et insuline dont le poids moléculaire est de 3 kDa en raison de la présence d'urée.

Les fractions "actives" de la première étape de filtration sur gel sont congelées à -70°C, lyophilisées (lyophilisateur de pailleuse RP 2V CIRP, Argenteuil, France). Après reconstitution dans un petit volume de solution acide acétique 1 M - urée 8 M - saccharose 8%, l'échantillon est appliqué sur cette seconde colonne dans les mêmes conditions. Des fractions de 0,5 ml sont collectées.

3.2.4 Chromatographie en phase inversée (ProRPC HR 5/10)

Cette troisième étape chromatographique est réalisée sur une colonne système FPLC, prête à l'emploi, dite en phase inversée C8/C1 ProRPC HR 5/10 (0,5 x 10 cm).

Réactifs :

- solution A : eau bidistillée (ED2) - acide trifluoroacétique (TFA) 0,1%
- solution B : acétonitrile - TFA 0,1%

Les fractions "actives" réunies (seconde étape de filtration sur gel) sont dialysées contre une solution d'acide acétique 1 M puis congelées et lyophilisées. La préparation est reconstituée avec un petit volume d'acétonitrile 25% - TFA 0,1% puis filtrée sur membrane 0,45 µm avant l'injection sur la colonne équilibrée en acétonitrile 25% - TFA 0,1%.

La colonne (0,5 x 10 cm) subit une préparation consistant en un lavage avec 10 ml de solution B puis un gradient linéaire 100% à 0% de solution B en 60 min et enfin, 10 ml de solution A (le débit étant de 92 cm/h, 18 ml/h).

La chromatographie préparative est alors réalisée en développant après injection et lavage (débit 92 cm/h ou 18 ml/h), un gradient de 25 à 50% d'acétonitrile - TFA 0,1% en 30 min. La détection des protéines est réalisée par suivi de l'absorbance à 280 nm. Des fractions de 0,5 ml sont collectées (système de détection 2238 Uvicord SII - enregistreur, collecteur FRAC-100 Pharmacia LKB Biotechnology).

3.3 Purification du TGF- β 1 selon la méthode de Cone

Cette méthode décrite par Cone et coll. (1988, 36) concerne la purification de TGF- β 1 humain d'origine plaquettaire par extraction à l'éthanol acide de culots plaquettaires non lavés et deux étapes chromatographiques HPLC d'échange de cations et en phase inversée. Dans notre cas, les étapes chromatographiques ont été adaptées à une chromatographie d'échange de cations basse pression et une chromatographie en phase inversée FPLC.

3.3.1 Lyse-extraction

Réactifs : éthanol acide : éthanol 70% - HCl 0,05 N

Quatre volumes d'éthanol acide sont ajoutés au culot plaquettaire. La suspension est agitée vigoureusement et laissée une nuit à 4°C. Après centrifugation à 30000 g pendant 1 h à 4°C, le surnageant est ajusté à pH 5,5 par addition de NaOH 1 N. L'éthanol est éliminé par évaporation rotative à 40°C (Büchi HB 240, Flawil, Switzerland). L'extrait est alors centrifugé à 30000 g pendant 1 h à 4°C. Après une dialyse contre le tampon d'équilibrage de la colonne chromatographique d'échange de cations, une nouvelle centrifugation clarifie la préparation.

3.3.2 Chromatographie d'échange de cations (COOH-Spherodex LS)

Cette première étape chromatographique est réalisée sur un support échangeur de cations fort, hydrophile : COOH-Spherodex LS (IBF-Biotechnics)

Réactifs :

- tampon d'équilibrage : acétate de sodium 0,025 M, pH 5,5
- solution de régénération NaCl : NaCl 1 M
- solution de régénération HCl : HCl 0,1 N
- solution de régénération AlAc : acide acétique 0,5 M - éthanol 60%

La colonne (5 X 15 cm) est coulée et conservée en solution de régénération AlAc.

L'injection de l'extrait et le rinçage de la colonne équilibrée en tampon d'équilibrage sont réalisés à un débit de 10 cm/h (200 ml/h) alors que pour la procédure de régénération (NaCl puis HCl et enfin AlAc), il s'agit de 20 cm/h (400 ml/h). Les fractions sont collectées sous forme de la totalité des pics chromatographiques effluents.

Le pic de régénération AlAc est soumis à une évaporation rotative à 40°C pour éliminer la forte proportion d'éthanol puis, après une centrifugation clarifiante à 30000 g pendant 1 h à 4°C, congélation, lyophilisation, reconstitution avec un petit volume d'acétonitrile 25% - TFA 0,1% et filtration

0,45 μm , l'échantillon est prêt à subir la seconde étape chromatographique de phase inversée

3.3.3 Chromatographie en phase inversée (ProRPC HR 5/10)

Les conditions de réalisation sont identiques à celles précédemment décrites au chapitre 3.2.4 "Chromatographie en phase inversée".

3.4 Purification du TGF- β 1 selon la méthode neutre

Les premiers essais de cette méthode ont été réalisés lors d'un premier stage pré-doctoral (purification du complexe latent de haut poids moléculaire du TGF- β 1 humain d'origine plaquettaire) dans les laboratoires de Ludwig Institute for Cancer Research (LICR, Uppsala, Suède) sous la direction de Monsieur le Professeur C.H. Heldin.

3.4.1 Lyse-extraction

Il s'agit d'une lyse-extraction à pH neutre par choc osmotique/congélation-décongélation (Heldin et coll. 1987, 73)

Réactifs :

- solution de lyse : eau distillée contenant PMSF 1 mM, benzamidine 20 mM, acide ϵ -aminocaproïque 100 mM, aprotinine 1% V/V, pH neutre (NaOH ou HCl 0,1 N)
- tampon phosphate de sodium 1 M, pH 7,4

Les culots plaquettaires congelés sont placés dans la solution de lyse (4 ml par concentré, pH neutre) et cinq cycles de congélation (-30°C)/décongélation (10°C) sont alors effectués. Après addition de tampon phosphate 1 M jusqu'à une molarité de 10 mM, la préparation est centrifugée à 30000 g pendant 1 h à 4°C. L'extrait neutre est alors prêt à subir les autres étapes de purification. Il est à noter qu'à partir de cette extraction, toutes les opérations suivantes, mise à part la chromatographie en phase inversée, sont effectuées à 4°C pour diminuer les pertes d'activité par protéolyse, développement microbien et dénaturation.

3.4.2 Chromatographie d'échange de cations (COOH-Spheredex LS)

Cette première étape chromatographique est réalisée dans les conditions précédemment décrites (au chapitre 3.3.2 "Chromatographie d'échange de cations) mis à part que le tampon d'équilibrage est un tampon phosphate de sodium 10 mM, pH 7,4, et que la colonne est maintenue à 4°C, en armoire frigorifique. Le pic d'injection-lavage est injecté directement sur la seconde colonne chromatographique.

3.4.3 Chromatographie d'échange d'anions (Q Sepharose FF)

Réactifs :

- tampon d'équilibrage : phosphate de sodium 10 mM, pH 7,4
- tampon d'élution 1 : tampon d'équilibrage, NaCl 200 mM
- tampon d'élution 2 : tampon d'équilibrage, NaCl 500 mM
- tampon d'élution 3 : tampon d'équilibrage, NaCl 1000 mM
- solution de régénération : NaCl 1000 mM, NaOH 100 mM

Cette seconde étape chromatographique est réalisée sur un support échangeur d'anions fort : Q Sepharose Fast Flow (Pharmacia LKB Biotechnology). Le gel prêt à l'emploi, est lavé plusieurs fois dans le tampon d'équilibrage dégazé. La colonne (C 26/40, Pharmacia LKB Biotechnology) est coulée (2,6 X 7,9) et conditionnée par lavage avec ce tampon d'équilibrage à 19 cm/h (100 ml/h). L'injection de l'échantillon, le lavage et les éluions sont effectuées (à 4°C) à ce même débit. La fraction d'élution 2 (NaCl 500 mM) correspondant à la fraction L-TGF- β 1 est soumise à une précipitation au sulfate d'ammonium.

3.4.4 Précipitation au sulfate d'ammonium et activation

Réactifs :

- solution de sulfate d'ammonium saturée, pH 7,4
- acide acétique 1 M

La fraction d'élution 2 (NaCl 500 mM) est lentement amenée à 35% de saturation en sulfate d'ammonium. Après 1 h sous agitation douce et repos une nuit à 4°C, la préparation est centrifugée à 3800 g pendant 15 min à 4°C.

Le culot est resuspendu dans un petit volume de PBS et dialysé contre une solution d'acide acétique 1 M pendant une nuit à 4°C. Après centrifugation à 30000 g pendant 15 min à 4°C, la fraction activée est congelée, lyophilisée et reconstituée dans un petit volume d'acide acétique 1 M. Après addition de saccharose jusqu'à 8%, la filtration sur gel peut alors avoir lieu.

3.4.5 Filtration sur gel (Biogel P-60 fine)

La préparation de cette étape est similaire à la filtration sur gel 1 de la méthode d'Assoian (décrite au chapitre 3.2.2 "Filtration sur gel 1"). La filtration sur gel (Biogel P-60 fine) est réalisée (après calibrage) à 4°C, 5 cm/h (10 ml/h), en acide acétique 1 M (colonne 83 X 1,6 cm). Des fractions d'un volume de 1 ml sont collectées. Les fractions "actives", réunies sont congelées, lyophilisées et reconstituées dans un petit volume de solution A de chromatographie en phase inversée, filtrées 0,45 μ m avant injection sur la colonne.

3.4.6 Chromatographie en phase inversée (ProRPC HR 5/10)

Reactifs :

- solution A : ED₂ - TFA 0,1%
- solution B : 1-propanol - TFA 0,1%

Après injection de l'échantillon sur la colonne équilibrée en solution A et lavage soigneux (306 cm/h, 60 ml/h), un gradient de 0 à 60% de 1-propanol en TFA 0,1% est développé en 70 min. L'absorbance est suivie à 280 nm et des fractions de 1 ml sont collectées. Une analyse SDS-PAGE (gradient 8-25%) avec coloration argentique est alors réalisée.

3.4.7 Filtration sur gel HPLC LiChrospher Si DIOL

La phase DIOL possède de nombreuses propriétés (adsorption ionique, phase inversée ...) et peut être utilisée en filtration sur gel (LiChrospher Si 100 DIOL, 5 µm, Merck, domaine de fractionnement de protéines natives en phase aqueuse : 3-300 kDa). Le solvant est une solution d'acide acétique 1 M. La colonne (0,4 X 25 cm) est montée sur un système FPLC (Pharmacia LKB Biotechnology), le débit est de 48 cm/h (6 ml/h) et les échantillons injectés ont un volume de 25 µl. Une analyse SDS-PAGE (gradient 8-25%) avec coloration argentique est alors réalisée.

3.4.8 Chromatographie HPLC en phase inversée narrow-bore C4

Cette analyse a été réalisée au Ludwig Institute for Cancer Research (Uppsala, Suède), sous la direction de Monsieur le Docteur U. Hellman, lors d'un second séjour pré-doctoral.

Le système HPLC est composé :

- d'une pompe modifiée Beckman système GOLD programmable solvant module 126
- d'un four à colonne, régulateur de température Pharmacia LKB Biotechnology 2155 HPLC column oven
- d'une colonne Aquapore butyl BU-300, 7 µm, 300 Å, cartouche (0,21 X 3 cm) Brownlee Lab (Santa Clara, CA, USA)
- d'un détecteur multi-longueurs d'onde photodiode array detector Waters 990 (Millipore, Milford, MA, USA)
- d'un ordinateur NEC PC-8201 A

Réactifs :

- solution A : ED₂ - TFA 0,15%
- solution B : ED₂ 10% - TFA 0,1% - 1-propanol 90%

La colonne est maintenue à une température de 45°C et subit un protocole de lavage identique au gradient linéaire d'éluion de 0 à 40% de 1-propanol en 40 min. Le débit est de 173 cm/h (6 ml/h) et la détection est réalisée simultanément à 215 et 280 nm. Après injection et lavage avec la solution A, le gradient est développé avec collecte de la totalité des pics effluents. Une analyse SDS-PAGE (gradient 8-25%) avec coloration argentique est alors réalisée.

3.5 Utilisation des anticorps en immunopurification de TGF- β 1

Les anticorps spécifiques, immunopurifiés et immobilisés sur Sepharose CL-4B sont utilisés pour purifier, par immuno-affinité, l'antigène natif (TGF- β 1).

3.5.1 Préparation de l'immuno-adsorbant

(voir technique précédemment décrite au chapitre 2.4.4.1 "Préparation de l'immuno-adsorbant"). Les anticorps immunopurifiés sont concentrés par ultrafiltration (système Millipore à seuil de coupure 50 kDa) et dialysés une nuit à 4°C contre le tampon de couplage. Après centrifugation à 30000 g pendant 15 min à 4°C et filtration 0,22 μ m, la concentration en anticorps est vérifiée par spectrophotométrie à 280 nm (5 mg/ml). L'activation du support et le couplage des anticorps sont réalisés mais la saturation est effectuée par une solution de glycine 1 M, pH 8 (en place de l'éthanolamine) pour augmenter l'hydrophilicité du gel. Il est à noter qu'une partie du Sepharose CL-4B active est traitée dans les mêmes conditions mais ne subit pas le couplage avec les anticorps.

3.5.2 Immunopurification du TGF- β 1

Réactifs .

- solution de NaCl 1 M en PBS
- solution de glycine 0,05 M, NaCl 0,15 M, pH 2,3
- solution d'éluion : thiocyanate de sodium 3 M en acetate de sodium 0,1 M, pH 6

Diverses préparations plaquettaires plus ou moins purifiées ont été soumises à immunopurification du TGF- β 1. Parmi elles, les préparations obtenues à pH neutre ont été acidifiées à pH 2-3 (par addition d'HCl 6 N) pendant 30 min à température ambiante, puis neutralisation (par addition de soude 5 N) et dialyse contre le tampon PBS (après centrifugation clarifiante, 30000 g pendant 30 min à 4°C) dans le but d'activer le TGF- β 1 latent. Après une nouvelle centrifugation clarifiante, la préparation est prête à injection sur la colonne d'immunopurification. Des extraits acides selon la méthode de Cone (décrite au

chapitre 3.3 "Purification selon la méthode de Cone") ont également été préparés mais après évaporation de l'éthanol, l'extrait est dialysé contre du tampon PBS et clarifié par centrifugation avant injection.

La purification est suivie par système de détection à 280 nm et collecte de l'intégralité des pics effluents. Après injection de la préparation (15,7 cm/h, 10 ml/h) sur la colonne (0,9 X 7,2 cm) lavée (cycle PBS - solution d'élution - PBS), équilibrée en PBS, un lavage est réalisé avec le tampon PBS puis la solution NaCl 1 M en PBS. Le sens de la colonne est inversé pour éviter une migration inutile des protéines désorbées, lors de l'élution, au travers de la totalité de la colonne de support et pour diminuer le volume de la fraction d'élution. La procédure d'élution est effectuée par la solution de glycine puis la solution de thiocyanate de sodium (solution d'élution). Une dialyse une nuit à 4°C, en présence ou non de BSA 1 mg/ml contre une solution d'acide acétique 1 M élimine les solutés d'élution. Par la suite, seule l'élution avec la solution d'élution (après lavage par le tampon PBS) a été réalisée. Il est à noter que l'efficacité d'immuno-adsorption est définie comme le rapport entre la quantité de TGF- β 1 adsorbée sur la colonne d'immunopurification et la quantité de TGF- β 1 injectée sur cette colonne (expression en pourcentage).

3.5.3 Chromatographie en phase Inversée (ProRPC HR 5/10)

Reactifs :

- solution A : acétonitrile 25% - TFA 0,1%
- solution B : acétonitrile 50% - TFA 0,1%

Deux ml de TGF- β 1 immunopurifié à partir d'un extrait de Cone dialysés contre une solution d'acide acétique 1 M, lyophilisés et reconstitués avec deux ml de solution A sont injectés sur la colonne équilibrée en solution A (92 cm/h, 18 ml/h). Après un lavage soigneux, un gradient de 25 à 50% d'acétonitrile en TFA 0,1% est développé en 25 min. l'absorbance est suivie à 280 nm et des fractions de 0,6 ml sont collectées. Un dosage biologique du TGF- β 1 est réalisé par inhibition de l'incorporation de thymidine tritiée par les cellules CCL64 sur les fractions d'injection, lavage et élution.

4 Analyse du TGF- β 1 purifié

Des échantillons sont prélevés au cours de la purification. Ceux-ci sont placés en récipients plastique (polypropylène de préférence) et conservés à 4°C ou congelés à -20°C, avant utilisation.

Une filtration stérilisante (0,22 μ m, filtre Millex GV, Millipore, Bedford, MA, USA) est utile pour les tests d'activité cellulaire (en conditions stériles).

Seuls les échantillons destinés à la quantification des protéines totales et à des analyses électrophorétiques ou qualitatives ne seront pas additionnés

de BSA. Compte tenu du fait que la conservation du TGF- β est optimale en milieu acide, une solution d'acide acétique 1 M (volatile à la lyophilisation) est fréquemment utilisée (dialyse avec ou sans lyophilisation) ainsi que la reconstitution en HCl 4 mM, BSA 1 mg/ml. L'acide acétique est d'un usage très commode pour l'analyse électrophorétique par reconstitution avec tampon d'échantillon après la lyophilisation ou concentration par centrifugation sous vide (Speed Vac, Savant, Farmingdale, NY, USA), deux moyens d'enrichissement très appropriés au TGF- β en lieu de l'ultrafiltration. Un module de micro-dialyse (Mega System avec membrane 8 kDa, Health Products, Rockford, IL, USA) a été utilisé avec de bons résultats pour le déssalage rapide de petits volumes (jusqu'à 0,2 ml).

5 Dosage des protéines totales par la méthode de Lowry (Lowry et coll. 1951, 112).

Réactifs :

- tampon PBS légèrement alcalin (pH 8)
- solution A : carbonate de sodium à 2% dans une solution d'hydroxyde de sodium 0,1 N
- solution B : sulfate de cuivre pentahydraté à 5% dans une solution de tartrate double de sodium et de potassium à 1%
- solution C : mélange extemporané 50 : 1 des solutions A et B
- solution D : réactif de Folin-Ciocalteu dilué au 1/3 en eau distillée
- solution étalon de BSA 1 mg/ml échantillonnée et conservée à -20°C

Les échantillons sont dilués dans le tampon PBS de façon à contenir 25 à 300 μ g de protéines dans un volume total de 0,5 ml. Trois ml de solution C sont ajoutés. Après 10 min à température ambiante, 0,3 ml de solution D sont rapidement ajoutés, sous agitation vigoureuse. La lecture au spectrophotomètre (UV-120-02 Shimadzu, Kyoto, Japon) à 750 nm est réalisée après une incubation de 30 min à température ambiante et à l'obscurité. Une gamme d'étalonnage et les témoins adéquats (acide acétique 1 M et autres solutions salines concentrées) permettent la quantification simple et rapide des protéines totales.

Il est à noter qu'une microtechnique a été souvent utilisée. Les volumes sont de 0,2 ml d'échantillons, 1 ml de solution C et 0,1 ml de solution D pour 10 à 100 μ g de protéines.

RESULTATS

1 Méthodes de dosage du TGF- β 1

1.1 Test d'activité biologique : induction de la croissance de cellules NRK-49F en agar semi-solide

Comme le montre la figure 4, une gamme de TGF- β 1 (R & D Systems) de 0,03 à 1 ng/ml (1,2 à 40 pM) permet un dosage de l'activité d'induction de croissance en agar semi-solide (cellules NRK-49F) de 0,03 à 0,3 ng/ml (1,2 à 12 pM) avec une ED₅₀ de 0,17 ng/ml (6,8 pM). L'ED₅₀ est définie comme la concentration de TGF- β 1 correspondant à un nombre de colonies moitié (50%) du plus grand nombre de colonies observé. Il est à noter que l'efficacité de clonage, c'est à dire le rapport entre le plus grand nombre de colonies observé et le nombre de cellules viables mises en jeu dans le test, est variable. Dans le cas présenté, il est relativement faible : 20% (généralement supérieur à 50%). Il peut refléter la qualité de la technique de mise en oeuvre et des cellules employées (vieillesse de la culture, exposition trop longue à la chaleur ...).

1.2 Dosage par fixation compétitive de TGF- β 1 radiomarqué au récepteur cellulaire

1.2.1 Radiomarquage du TGF- β 1

La méthode de Frolik et coll. (1984, 59) simple et rapide permet un radiomarquage par l'iode 125 avec une activité spécifique satisfaisante d'environ 5 MBq/ μ g de TGF- β 1 (135 μ Ci/ μ g). La précipitabilité au TCA est généralement supérieure à 90% et l'activité biologique de la molécule n'est pas affectée (test ponctuel d'induction de croissance en agar semi-solide des cellules NRK-49F de 110% par rapport à la molécule froide).

1.2.2 Dosage par fixation compétitive

La figure 5 montre qu'une gamme de TGF- β 1 froid (R & D Systems), compétiteur de 1,25 à 20 ng/ml (50 à 800 pM) avec une concentration fixe de 0,625 ng/ml (25 pM) de TGF- β 1 radiomarqué permet le dosage de 0 à 5 ng/ml de TGF- β 1 (0 à 200 pM) avec une ED₅₀ (concentration en TGF- β 1 froid correspondant à une radioactivité moitié de la radioactivité maximale observée pour l'essai sans TGF- β 1 compétiteur) de 2,6 ng/ml (104 pM) et une fixation non spécifique relativement importante de 21% pour une concentration de compétiteur de 200 ng/ml (8000 pM)

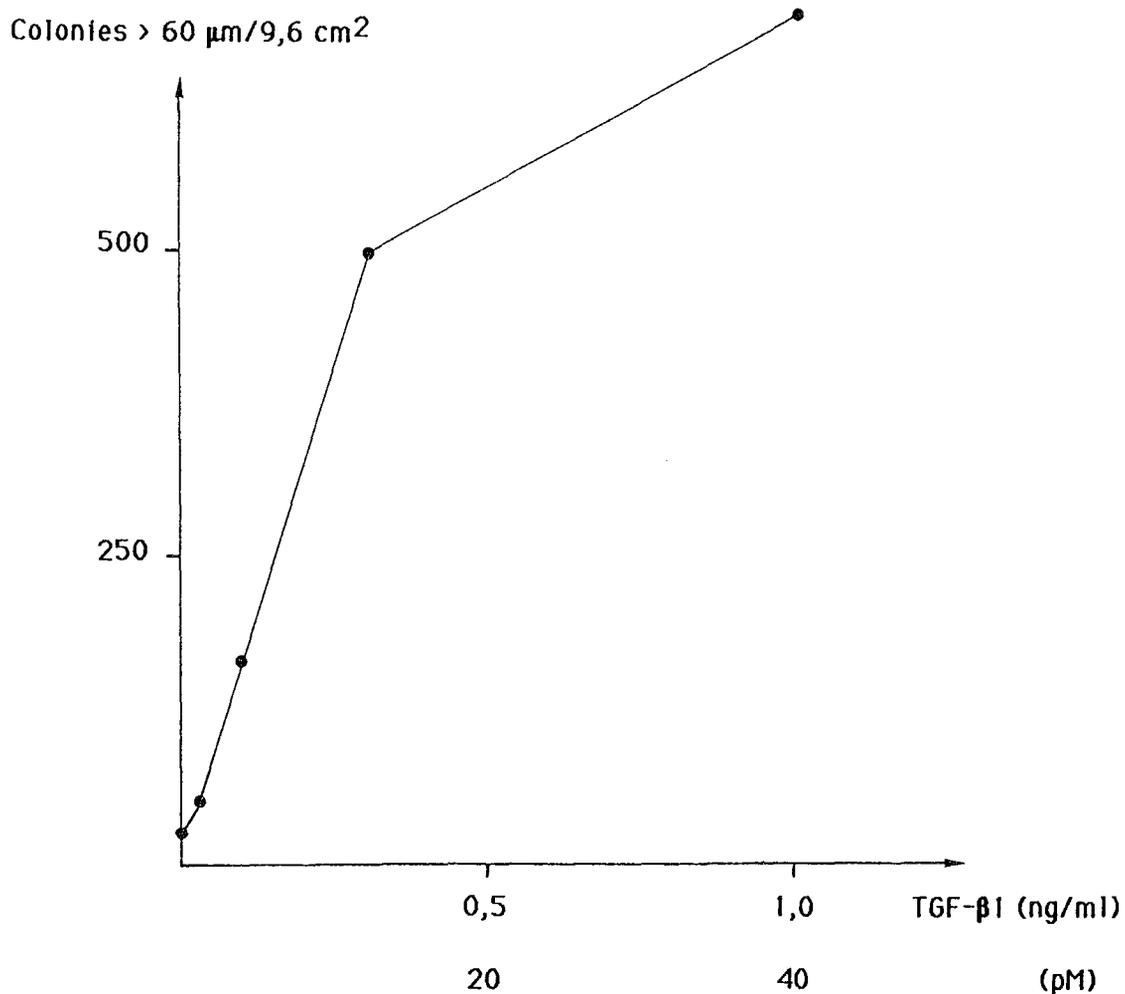


Figure 4 : Dosage biologique du TGF-β1 par induction de la croissance de cellules NRK-49F en agar semi-solide. Après 14 jours d'incubation, les colonies cellulaires, fixées, de diamètre supérieur à 60 μm, résultantes de l'induction de l'"anchorage independence" par le TGF-β1 et en présence d'EGF 5 ng/ml, sont comptées par un compteur-analyseur d'image sur la surface d'une boîte de Pétri (35 mm, 9,6 cm²). Une courbe étalon peut alors être tracée (ED50 = 0,17 ng/ml ou 6,8 pM) dont la linéarité est observée pour des concentrations de TGF-β1 de 0,1 à 0,3 ng/ml (4 à 12 pM). Les points représentent la moyenne de trois essais (p < 0,10)

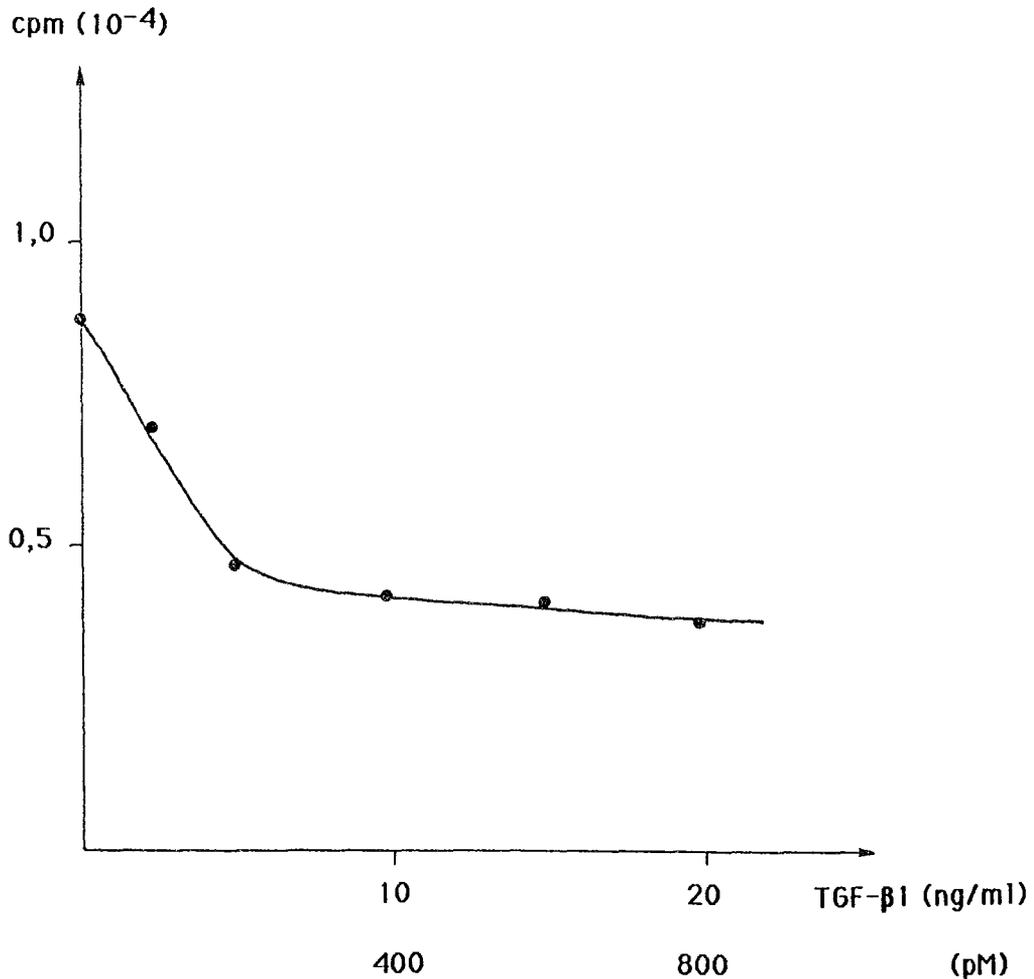


Figure 5 : Dosage biologique du TGF- β 1 par fixation compétitive au récepteur cellulaire. Une quantité fixe de TGF- β 1 radiomarqué (0,625 ng ou 25 pM) est mise en compétition avec une gamme de TGF- β 1 froid (1,25 à 20 ng/ml ou 50 à 800 pM) pour fixation au récepteur de cellules NRK-49F. Une courbe étalon peut être réalisée (ED₅₀ = 2,6 ng/ml ou 104 pM) dont la linéarité est observée pour des concentrations de TGF- β 1 jusqu'à 5 ng/ml (200 pM). Les points représentent la moyenne de deux essais ($p < 0,05$).

1.3 Test d'activité biologique : inhibition de l'incorporation de thymidine tritiée par les cellules CCL64

Ce test simple et rapide à mettre en oeuvre, sensible, permet d'effectuer le titrage des échantillons et de quantifier des concentrations de TGF- β 1 de 0,1 à 0,6 ng/ml (4 à 24 pM), comme le montre la figure 6 , avec une ED50 (concentration en TGF- β 1 correspondant à un pourcentage d'inhibition de 50%) de 0,24 ng/ml (9,6 pM).

2 Obtention d'anticorps polyclonaux anti-TGF- β

2.1 Prédiction d'épitopes continus - Choix d'un peptide synthétique

La figure 7 présente les résultats limités aux échelles d'hydrophilicité de Parker et coll. (1986, 137), de mobilité de segment de Karplus et Schulz (1985, 91) et de feuillet β inversé de Garnier et coll. (1978, 60). Celles-ci sont considérées comme les plus performantes en utilisant un seuil de +0,7 fois l'écart-type de l'étude statistique (Van Regenmortel et de Marcillac (1988, 189).

L'étude de l'hydrophilicité démontre que vingt cinq acides aminés sur cent douze sont "épitopes continus" avec la présence d'un seul triplet : résidus N° 11-12-13 en partie N terminale. L'étude de la mobilité de segment fait apparaître quatre séquences continues : acides aminés N° 9-13, 55-59, 68-71 et 94-100, une séquence en partie N et C terminales et deux centrales parmi les quarante et un résidus "positifs" sur cent six. L'étude de feuillet β inversé permet de mettre en évidence trente et un résidus "positifs" sur cent douze avec un triplet (acides aminés N°12-13-14) en partie N terminale, un quartet central (résidus N° 37-38-39-40). Onze acides aminés disséminés (sauf N° 95, 97 et 99) sont communs aux trois méthodes et quatre aux huit méthodes réalisées : résidus N° 26, 37, 95 et 97. La lysine est prédominante parmi ceux-ci : cinq acides aminés sur les onze communs aux trois méthodes et la totalité des quatre acides aminés communs aux huit méthodes.

Selon ces résultats et les indications de l'étude de Flanders et coll. (1988, 54), la séquence choisie du peptide synthétique correspond aux résidus N° 91-106 avec une cystéine en position N°90 en place d'une tyrosine afin d'obtenir deux sites de couplage différents : cystéine N°90 et tyrosine N°91.

La recherche d'homologie de séquence primaire du peptide C-91-106 par interrogation de la banque de données SwissPROT a révélé des homologies de la séquence 91-106 de 75 à 100% pour les TGF- β formes 1, 2, 3, 4 et 5 parmi diverses espèces, de l'homme à la grenouille. L'étude plus particulière des homologies entre la séquence 91-106 et les différentes formes d'actine et de myosine n'a pas donné de résultats positifs.

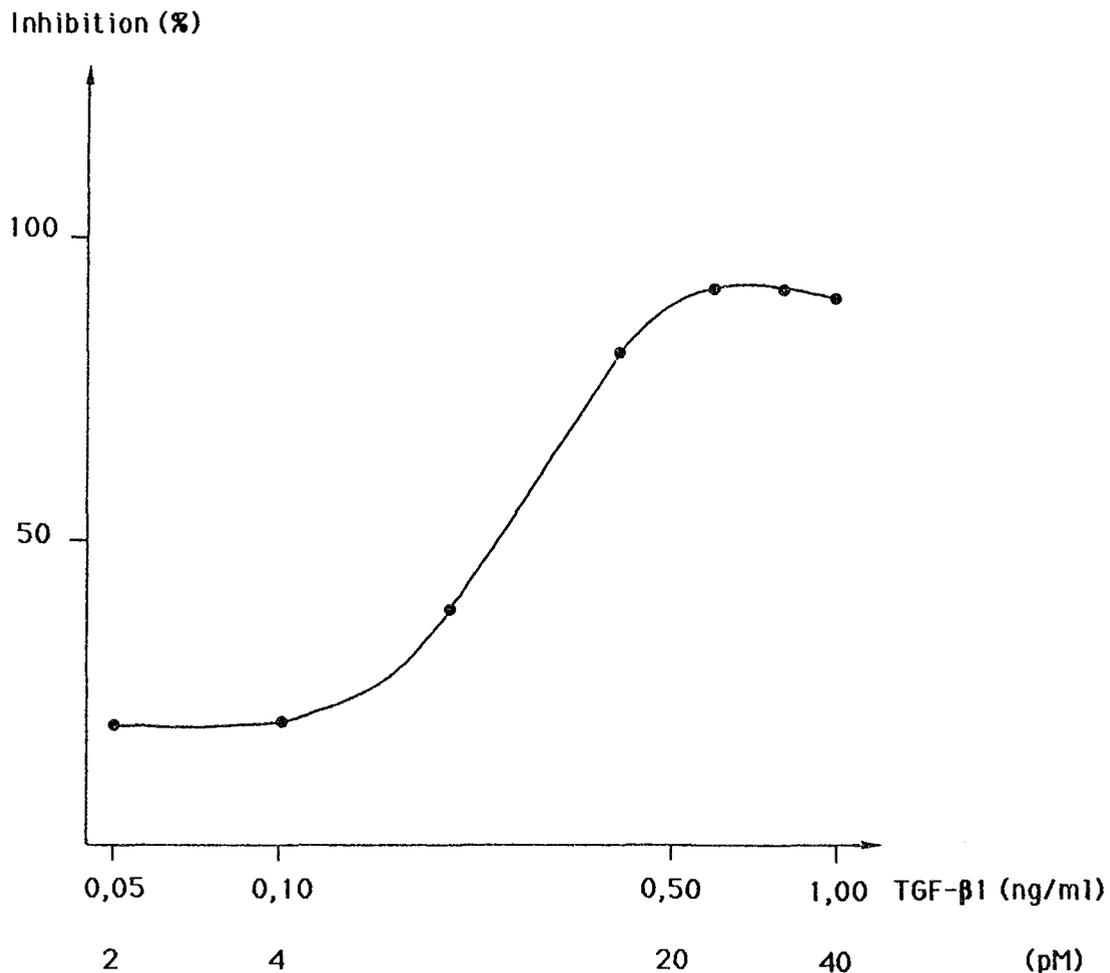


Figure 6 : Dosage biologique du TGF-β1 par inhibition de l'incorporation de thymidine tritiée par les cellules CCL64. Des cellules CCL64 non confluentes sont incubées pendant 24 h avec une gamme de TGF-β1 (0,05 à 1 ng/ml ou 2 à 40 pM). Une courte incubation (pendant les quatre dernières heures) avec 7,4 kBq/ml (0,2 μCi/ml) de thymidine tritiée permet d'évaluer l'inhibition d'incorporation induite (pourcentage d'inhibition). Une zone utile de dosage est observée pour des concentrations de TGF-β1 de 0,1 à 0,6 ng/ml (4 à 24 pM) avec une ED₅₀ = 0,24 ng/ml (9,6 pM). Les points représentent la moyenne de trois essais (p < 0,05).

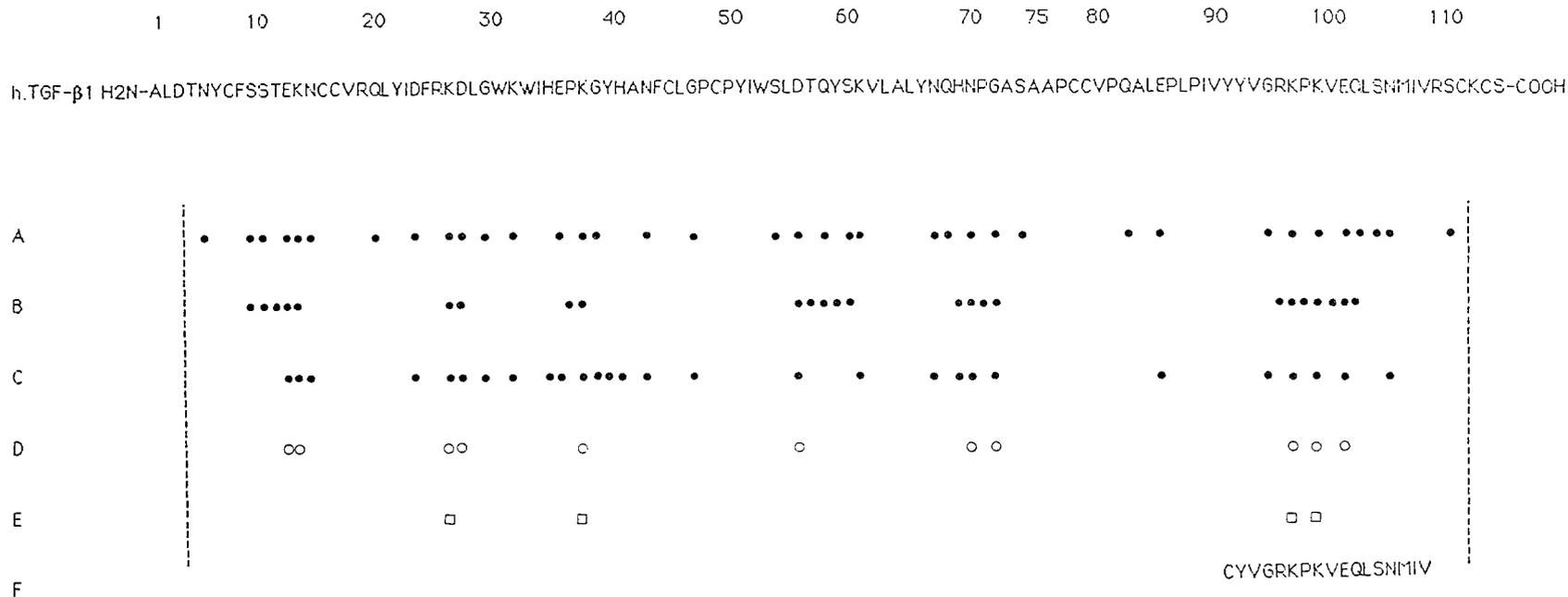


Figure 7 : Prédiction d'épitopes continus – Choix d'un peptide synthétique. La séquence primaire du TGF- β 1 humain (**h. TGF- β 1**) est présentée. Les résultats de trois des huit méthodes appliquées à l'"étude antigénique" du TGF- β 1 sont représentées du fait de leur "efficacité" en utilisant un seuil de + 0,7 fois l'écart type de l'étude statistique (Van Regenmortel et de Marcillac 1988, 189) : **hydrophilicité de Parker et coll.** (1986, 137, ligne **A**), **mobilité de segment de karplus et Schulz** (1985, 91, ligne **B**) et **feuillelet β inversé de Garnier et coll.** (1978, 60, ligne **C**). Il est à noter que les résultats sont limités aux résidus (n+3) N et (n-3) C terminaux (N° 4 à 109) du fait que les échelles de Karplus et Schulz prennent en compte les acides aminés proches voisins. Les acides aminés "épitopes continus" (●) communs aux trois (ligne **D**, ○) et aux huit méthodes (ligne **E**, □) sont indiqués ainsi que la séquence choisie du peptide synthétique (ligne **F**). Symboles des acides aminés : **R**, ARG ; **D**, ASP ; **E**, GLU ; **K**, LYS ; **S**, SER ; **N**, ASN ; **Q**, GLN ; **G**, GLY ; **P**, PRO ; **T**, THR ; **A**, ALA ; **H**, HIS ; **C**, CYS ; **M**, MET ; **V**, VAL ; **I**, ILE ; **L**, LEU ; **Y**, TYR ; **F**, PHE ; **W**, TRP.

2.2 Immunisation - Production des antisérums

Les quatre lapins ont été immunisés (sites intradermiques ou intramusculaires) avec différentes doses de peptide conjugué à l'ovalbumine. La figure 8 montre le titrage d'un "pool" d'antisérums en ELISA vis à vis du peptide, du TGF- β 1 natif et réduit. Une intensité de réaction décroissante est visible respectivement pour le peptide, le TGF- β 1 réduit et enfin, le TGF- β 1 natif. Le tableau III décrit la méthodologie d'immunisation ainsi que le suivi du degré d'immunisation par ELISA (vis à vis du peptide, méthode décrite au chapitre suivant), à partir de la première saignée jusqu'à un "pool" de vingt trois saignées correspondant au "pic" d'immunisation. Pour ce qui concerne la première saignée, une dose de 500 μ g de conjugué par voie intramusculaire permet d'obtenir une ED₅₀ correcte et une absorbance maximale. L'étude du "pool" démontre que la plus forte ED₅₀ est atteinte pour une dose de 1000 μ g de conjugué et qu'une absorbance maximale est obtenue pour des doses de 100 à 500 μ g (voie d'injection intradermique ou intramusculaire). Les ED₅₀ maximales observées pour les dix premières saignées chez les lapins P, C, S et B sont respectivement de $1/5 \cdot 10^6$ (Im3), $1/8 \cdot 10^5$ (Im2, Im4 et Im10), $1/4 \cdot 10^5$ (Im2 et Im5) et $1/5 \cdot 10^5$ (Im3). L'injection de TGF- β 1 purifié au laboratoire n'a permis qu'une faible "ré-immunisation" ponctuelle (ED₅₀ $1/6,5 \cdot 10^3 \rightarrow 2,8 \cdot 10^4$).

2.3 Caractérisation des antisérums

2.3.1 ELISA

Le suivi de l'immunisation des lapins a donc été effectué par cette méthode en utilisant le peptide comme antigène de revêtement. Il est à noter que le lait écrémé a été choisi comme agent de saturation après comparaison des bruits de fond observés en ELISA avec différentes concentrations de BSA, gélatine de poisson (Sigma) et lait. Les pourcentages (par rapport à un témoin négatif sans revêtement peptide) étaient, respectivement, de -25%, -42% et -57%. L'utilisation du lait comme agent de saturation et de dilution a été étendue aux autres techniques de détection immunologique du TGF- β 1 (immunoblotting et immunohistochimie). Le titre de l'antisérum est caractérisé par la dilution correspondant à une valeur moitié de la valeur d'absorbance maximale observée pour ce même antisérum (ED₅₀).

Il est à noter que les ED₅₀ des antisérums vis à vis des conjugués à l'ovalbumine ou à la BSA (100 ng/puits) sont respectivement de $8,3 \cdot 10^5$ et $4,1 \cdot 10^4$ par rapport au peptide : $7,3 \cdot 10^3$

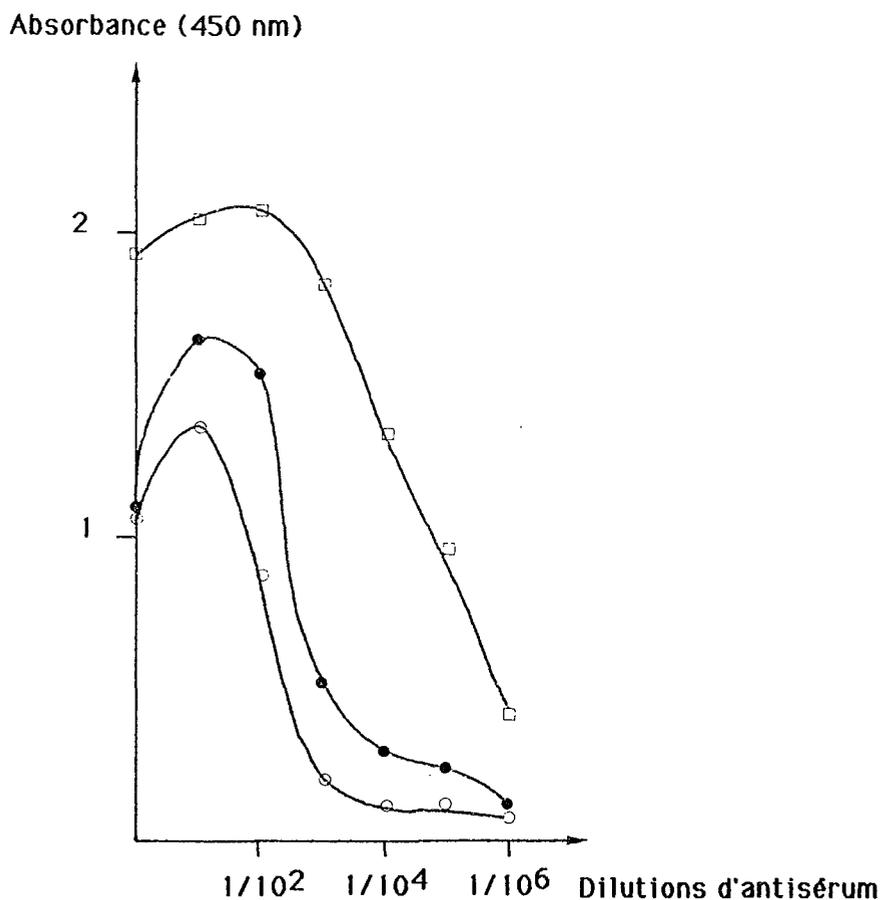


Figure 8 : Titrage d'un antiserum par ELISA. La réactivité de dilutions décimales d'un "pool" d'antisérum est titrée vis à vis de différents antigènes de revêtement : le peptide C-91-106 (200 ng/puits, □), le TGF- β 1 natif (20 ng/puits, ○) et le TGF- β 1 réduit (20 ng/puits, ●). Le système de détection immunologique de l'antigène sur phase solide est composé de trois éléments ABC (anticorps primaire, anticorps secondaire- pont biotine/streptavidine - peroxidase). La dilution d'antisérum correspondant à 50% de l'absorbance maximale observée (450 nm) est alors évaluée : ED50

Tableau III : Protocole d'immunisation - Titrage des antisérums produits.

Lapin		P	C	S	B
Voie d'injection		ID	IM	IM	ID
Dose (μg) ^a	Première	1000	500	250	100
	Rappels	500	500	250	100
Saignée 1	ED ₅₀ ^b	1/5200	1/9800	1/4500	1/3100
	Absorbance max. (450 nm) (antiserum non dilué)	1,273	1,388	1,297	1,251
"Pool" de 23 saignées	ED ₅₀	1/5000	1/2300	1/2300	1/910
	Absorbance max. (450 nm) (antiserum dilué 1/100)	2,086	2,121	1,997	2,189

a : quantité de C-91-106-OVA injectée par voie intradermique (ID) ou intramusculaire (IM)

b : dilution de l'antiserum correspondant à la moitié de la valeur d'absorbance (450 nm) maximale observée (ED₅₀)

Les tests ELISA (vis à vis du peptide C-91-106) ont été réalisés simultanément et pour les quatre lapins (moyenne de trois essais par dilution)

2.3.2 Immunoblotting

La sensibilité de détection de la méthode a été mesurée par dépôt de différentes quantités de TGF- β 1 natif (même s'il y a présence de monomère, R & D Systems). Dans les conditions opératoires décrites, le seuil de détection se situe entre 5 et 10 ng.

Il est à noter que le L-TGF- β 1 n'est pas révélé par ce test.

La spécificité de la détection fut démontrée par incubation de l'antisérum avec un excès de peptide ou de TGF- β 1 natif. La figure 9 montre que le blocage des anticorps est total avec le peptide mais partiel avec le TGF- β 1 natif.

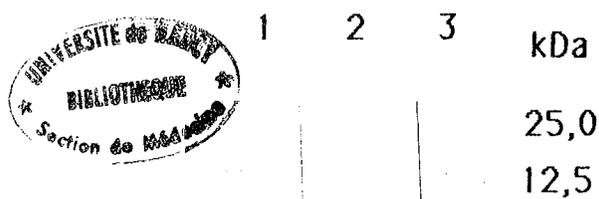


Figure 9 : Immunoblotting et tests de blocage. La détection de TGF- β 1 sur phase solide après électrophorèse (environ 100 ng) a été testée par incubation de la membrane de nitrocellulose avec l'antisérum anti-C-91-106-OVA (dilution 1/10) puis détection immunologique (similaire à la technique ELISA). Les tests de blocage sont réalisés par rapport à un immunoblotting témoin négatif (1), après incubation de l'antisérum avec 100 μ g/ml de peptide (2) ou 10 μ g/ml de TGF- β 1 (3).

2.4 Purification des anticorps

Différentes méthodes d'enrichissement et de purification des anticorps ont été réalisées pour leur utilisation dans les tests d'inhibition des activités biologiques du TGF- β 1, en IED, en immunopurification et en immunohistochimie.

2.4.1 Précipitation au sulfate d'ammonium

Cette méthode grossière d'enrichissement précipite environ 70% des protéines (mesure de la concentration en protéines totales de l'antisérum et du surnageant).

2.4.2 Chromatographie FPLC d'échange d'anions

Cette méthode permet la séparation de la fraction IgG, IgA et de la fraction IgM. Il est à noter des ED₅₀ (ELISA vis à vis du peptide) de 1/2,1. 10⁴ et 1/85, respectivement pour les fractions IgG + IgA et IgM par rapport à 1/2,9. 10⁴ pour l'antisérum.

2.4.3 Chromatographie d'affinité sur protéine A-Sepharose

La purification effective des IgG est effectuée par cette méthode simple et rapide. Environ 5,6 mg (5,1-6,8) d'IgG sont obtenus pour une injection de 10 ml d'antisérum. Les ED₅₀ (titration ELISA vis à vis du peptide) correspondant à l'antisérum, l'effluent de lavage et l'éluat ont été déterminées ponctuellement à respectivement $3,2 \cdot 10^4$, $6,8 \cdot 10^2$ et $3,2 \cdot 10^3$. Il semble donc rester une fraction anticorps dans l'effluent de lavage.

2.4.4 Chromatographie d'immuno-affinité

Il s'agit de la méthode de purification des anticorps spécifiques par affinité sur un antigène similaire (peptide conjugué à la BSA) à l'antigène ayant servi à l'immunisation (peptide conjugué à l'ovalbumine).

2.4.4.1 Préparation de l'immuno-adsorbant

Une quantité de 4,6 mg de peptide conjugué à la BSA mis en jeu dans la réaction de couplage conduit à un taux de couplage de 0,5 mg de conjugué/ml de gel, le volume de la colonne étant de 4,45 ml.

2.4.4.2 Immunopurification des anticorps

Un chromatogramme d'immunopurification des anticorps à partir d'antisérum de lapin est présenté sur la figure 10. Un volume de 30 ml d'antisérum injecté sur la colonne permet d'obtenir, en moyenne (vingt cinq immunopurifications), 2,4 mg d'anticorps (1-6,5 mg). L'étude ELISA (vis à vis du peptide) de l'effluent (fractions de 2,5 ml) d'une injection de 30 ml d'un "pool" d'antisérum ayant une ED₅₀ importante ($1/10^6$) n'a pas mis en évidence une saturation de la colonne. L'analyse SDS-PAGE (gradient 8-25%, non présentée) avec coloration argentique d'une préparation révèle une bande majeure à 125 kDa.

2.5 Inhibition des activités biologiques du TGF- β 1 *in vitro* par les antisérums et les anticorps immunopurifiés

La capacité d'inhibition des anticorps sur les propriétés biologiques du TGF- β 1 a été testée par utilisation des antisérums ("pool" de vingt trois saignées des quatre lapins) et des anticorps immunopurifiés (voir chapitre 2.4.4.2 "Immunopurification des anticorps"). Mais l'utilisation de l'antisérum pose des problèmes du fait de l'addition de sérum consécutive (présence d'autres facteurs de croissance, d' α 2-macroglobuline ...).

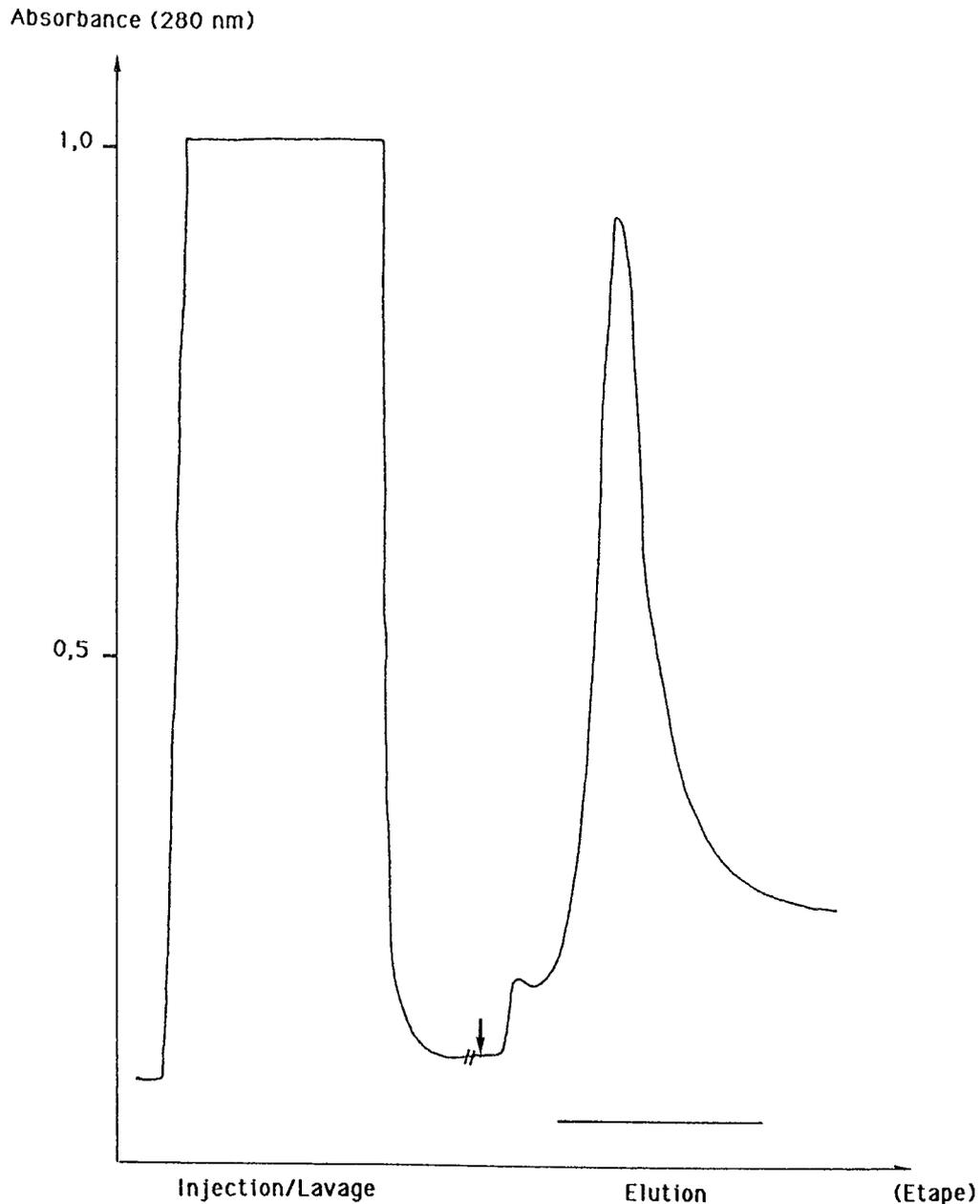


Figure 10 : Immunopurification des anticorps anti-C-91-106. L'antisérum (30 ml) est injecté sur la colonne C-91-106-BSA - Sepharose (0,9 x 7 cm) équilibrée en tampon PBS à un débit de 15,7 cm/h (10 ml/h). L'absorbance est suivie à 280 nm et la totalité des pics collectée. Après lavage, la fraction anticorps (barre) est éluée par une solution thiocyanate de sodium 3 M en tampon acétate de sodium 0,1 M, pH 6.

2.5.1 Test d'induction de la croissance de cellules NRK-49F en agar semi-solide

La figure 11 montre une inhibition (comparaison entre témoin négatif et essai) de l'induction de croissance en agar semi-solide des cellules NRK-49F en présence de 2 ng/ml (80 pM) de TGF- β 1 (R & D Systems) et 5 ng/ml d'EGF. L'effet stimulateur des dilutions d'antisérum seul (1/10 à 1/10³) est à noter. Pour la dilution 1/10², l'essai (antisérum + TGF- β 1 + EGF) comparé au témoin (antisérum + EGF), permet de constater une nette inhibition par cette dilution d'antisérum puisque le nombre de colonies de l'essai est inférieur au nombre de colonies du témoin malgré l'effet stimulateur (non négligeable) de l'antisérum dans le témoin. Les anticorps immunopurifiés (10⁻³ à 10² μ g/ml) n'ont pas d'effet inhibiteur notable (résultats non représentés).

2.5.2 Test de fixation de TGF- β 1 radiomarqué au récepteur cellulaire

La fixation de 2,5 ng/ml (100 pM) TGF- β 1 radiomarqué aux cellules NRK-49F est inhibée par l'antisérum et par les anticorps immunopurifiés. Comme le montre la figure 12, l'ED₅₀ est de 1/60 pour l'antisérum et une concentration de 10² μ g/ml d'anticorps induit une inhibition de 30%. Il s'agit donc d'un essai où les anticorps de l'antisérum et les anticorps immunopurifiés démontrent un effet inhibiteur sur les propriétés du TGF- β 1 en tant que ligand.

2.5.3 Test d'inhibition de l'incorporation de thymidine tritiée par les cellules CCL64

Les résultats présentés sur la figure 13 permettent de montrer que l'antisérum possède un effet inhibiteur, avec une ED₅₀ de 1/70, sur l'inhibition de l'incorporation de thymidine tritiée par les cellules CCL64 en présence de 0,25 ng/ml (10 pM) de TGF- β 1 (R & D Systems). Les anticorps immunopurifiés n'ont pas démontré d'effet inhibiteur notable à des concentrations testées de 10⁻³ à 10 μ g/ml (résultats non représentés).

2.6 Utilisation des antisérums en immuno-electrodiffusion

La figure 14 montre une IED réalisée sur PhastSystem. Les échantillons sont des extraits plaquettaires neutres et activés par acidification transitoire (environ 20 ng/ml, 800 pM, activité dosée par induction de croissance des cellules NRK-49F en agar semi-solide). Cette microtechnique utilise 7,5 fois moins d'antisérum que la technique classique. Des résultats similaires ont été observés pour les deux techniques. Les fusées sont fines et la projection des gels est utile pour l'interprétation. Les extraits neutres conduisent à la formation de trois fusées alors qu'une fusée est observée pour les extraits acidifiés. Il est à noter que la hauteur des fusées est proportionnelle aux

Colonies > 60 $\mu\text{m}/9,6 \text{ cm}^2$

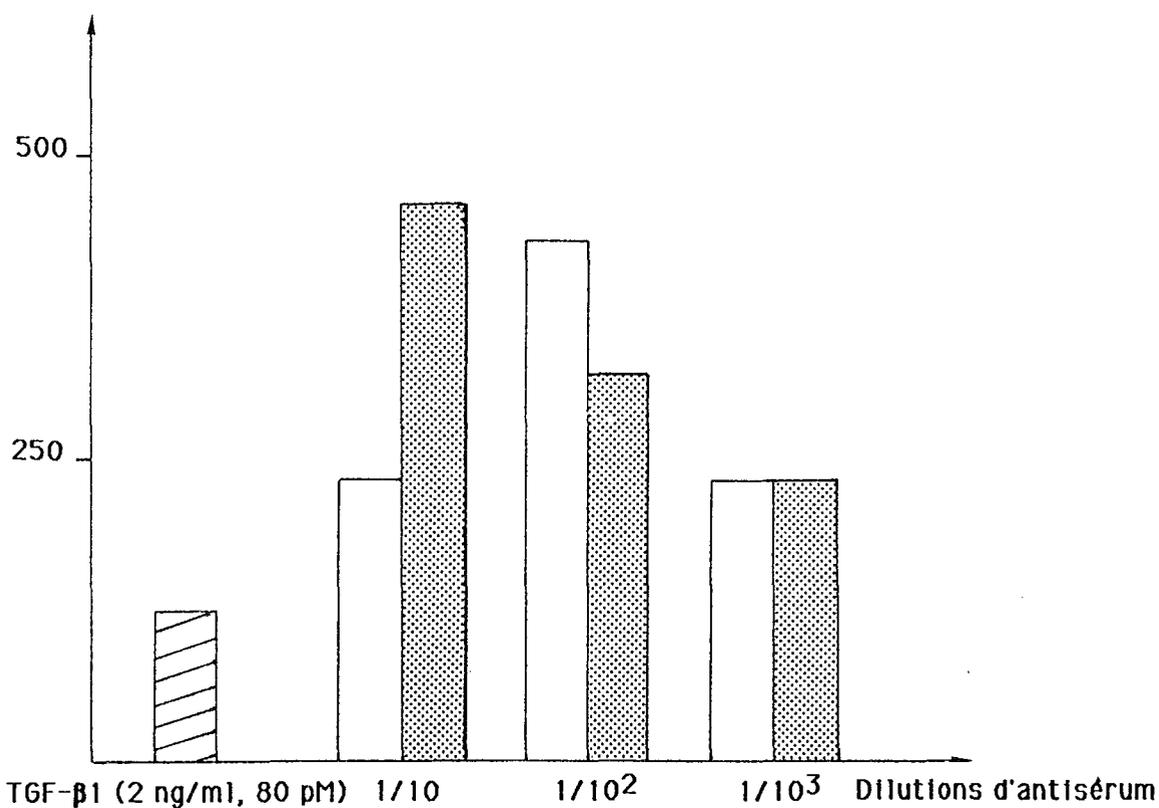


Figure 11 : Effet des anticorps sur les propriétés biologiques du TGF- β 1 : induction de la croissance des cellules NRK-49F en agar semi-solide. Des dilutions d'antisérum (1/10 - 1/10³) sont testées pour inhiber l'induction de l'"anchorage independence" par le TGF- β 1 en présence d'EGF (□) par rapport à un témoin négatif (dilution d'antisérum sans TGF- β 1, □) et un témoin TGF- β 1 (2 ng/ml ou 80 pM, ▨). Les valeurs présentées (nombre de colonies > 60 $\mu\text{m}/9,6 \text{ cm}^2$) correspondent à la moyenne de trois essais.

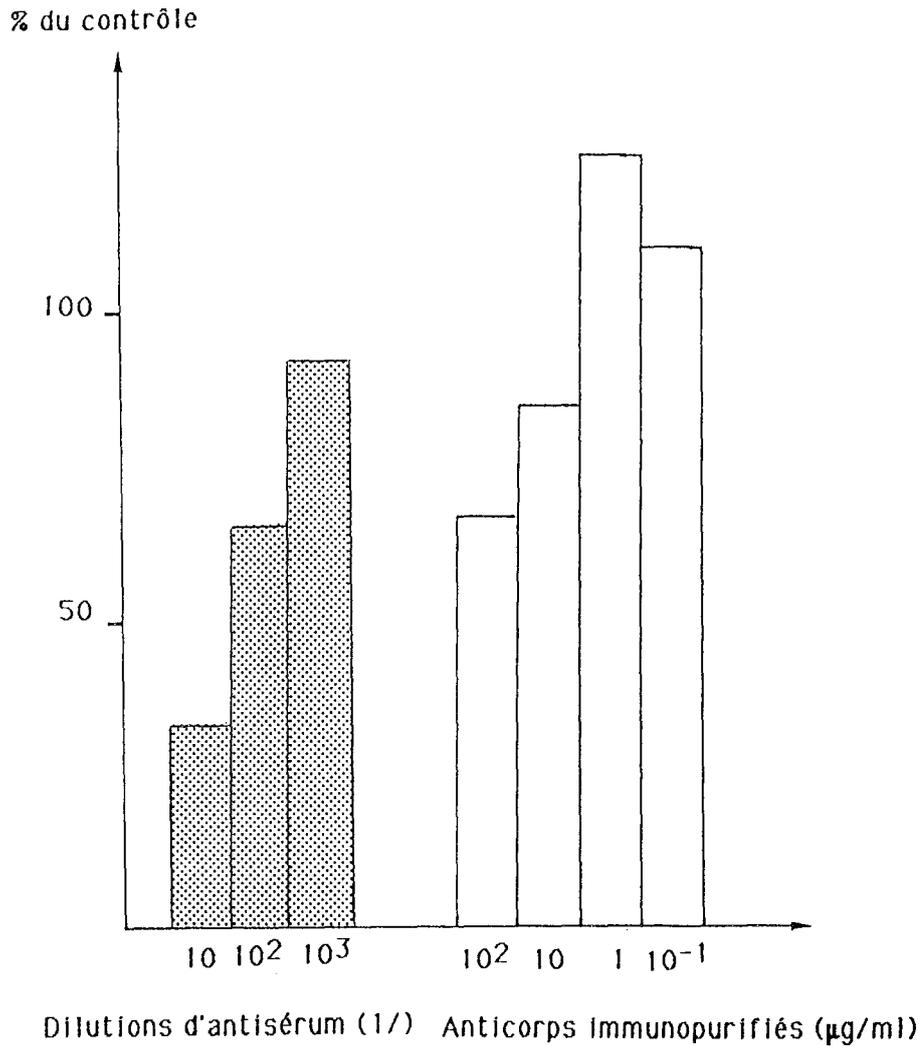


Figure 12 : Effet des anticorps sur les propriétés biologiques du TGF- β 1 : fixation de TGF- β 1 radiomarqué au récepteur cellulaire. Des dilutions d'antisérum (1/10-1/10³, ■) et d'anticorps immunopurifiés (10⁻¹ - 10² µg/ml, □) sont testées pour inhiber la fixation au récepteur cellulaire de TGF- β 1 radiomarqué (2,5 ng/ml ou 100 pM). Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport à un témoin négatif (sans antisérum ou anticorps immunopurifiés). Les valeurs présentées correspondent à la moyenne de deux essais.

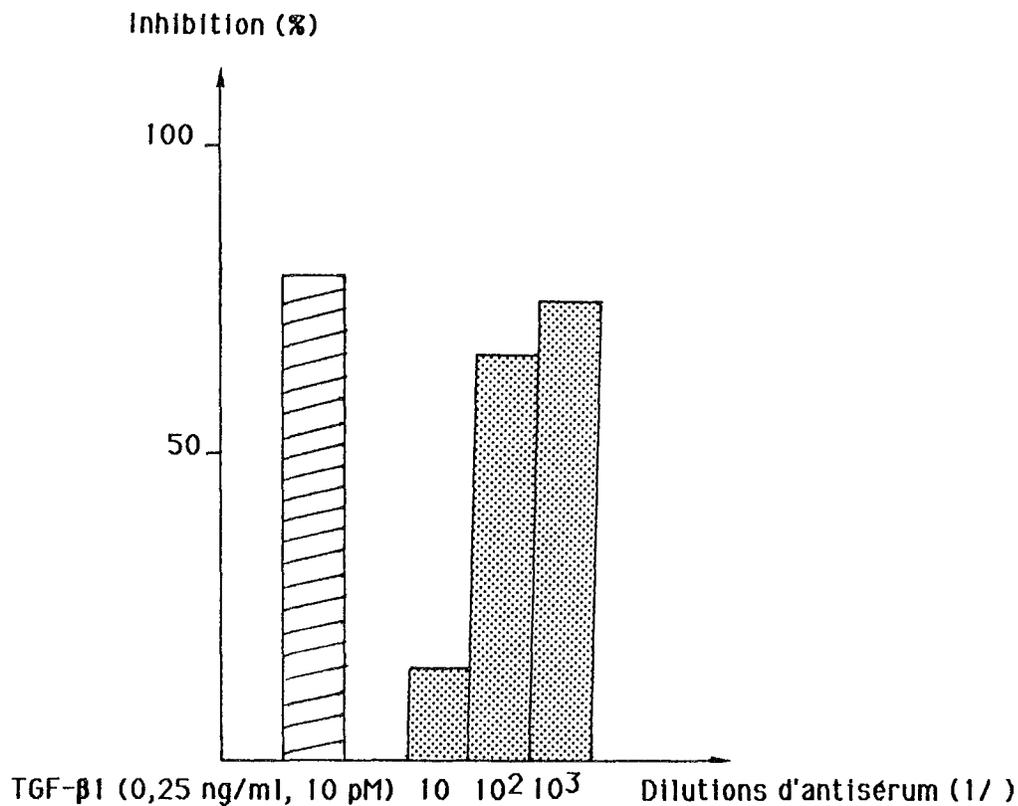


Figure 13 : Effet des anticorps sur les propriétés biologiques du TGF- β 1 : inhibition de l'incorporation de thymidine tritiée par les cellules CCL64. Des dilutions d'antisérum (1/10-1/10³) sont testées pour inhiber l'inhibition de l'incorporation de thymidine tritiée par les cellules CCL64 par le TGF- β 1 (0,25 ng/ml ou 10 pM). Un témoin TGF- β 1 est présent (▨). Les résultats sont exprimés en tenant compte des résultats obtenus pour un témoin négatif (sans TGF- β 1). Les valeurs présentées (pourcentage d'inhibition) correspondent à la moyenne de trois essais.

dilutions d'un extrait neutre (1/1 à 1/8, 20 à 2,5 ng/ml, 800 à 100 pM). La présence de plusieurs fusées superposées est caractéristique d'un antigène hétérogène (Laurell 1972, 103). Des échantillons de TGF- β 1 (R & D Systems, jusqu'à 1 μ g/ml), de SLC recombinant (jusqu'à 1 mg/ml) et de L-TGF- β 1 purifié (jusqu'à 0,1 mg/ml) ont été appliqués. Le SLC et le L-TGF- β 1 activés ou non ont conduit à un résultat positif. Deux précipités sont visibles pour les échantillons activés. Le TGF- β 1 n'a pas donné lieu à la formation de fusée même en présence de BSA 1 et 10 mg/ml dans l'échantillon ou de PEG 2000 (5 et 10%) dans le gel. Des échantillons à 1 mg/ml de conjugué ovalbumine (immunisation) ou de conjugué BSA (immunopurification) ont permis de mettre en évidence au moins quatre fusées dans le cas du conjugué ovalbumine avec une intensité particulière pour l'une d'entre elle correspondant certainement à des anticorps plus particulièrement anti-ovalbumine.

Pour diminuer un bruit de fond important et gênant pour l'interprétation, des préparations enrichies en anticorps ou plus purifiées ont été expérimentées (voir chapitre 2.4 "Purification des anticorps"). Des fusees ont été observées mais, mis à part pour les anticorps immunopurifiés (précipité très flou), le bruit de fond n'a pas diminué notablement. Un "lavage" plus long du gel est plus efficace.



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Figure 14 : Immuno-électrodifffusion. Des extraits plaquettaires (concentration en TGF- β 1 d'environ 20 ng/ml ou 800 pM évaluée par induction de la croissance de cellules NRK-49F en agar semi-solide) neutres (1-5) et activés (6-10) ont été testés en electro-immunodiffusion (PhastSystem Pharmacia LKB Biotechnology). Après coloration au bleu de Coomassie, trois immunoprécipités (flèches) ou fusées sont visibles pour les extraits neutres alors que pour les extraits activés, un immunoprécipité est observé.



2.7 Utilisation des anticorps immunopurifiés en Immunohisto- et -cytochimie

Différents tissus normaux ou pathologiques ont été étudiés pour la mise en évidence de TGF- β par les anticorps anti-C-91-106-OVA immunopurifiés sur C-91-106-BSA - Sepharose. Les témoins négatifs sans anticorps primaires anti-C-91-106-OVA mais avec IgG de lapin (serum pré-immuns) ont toujours été de bonne qualité (bruit de fond inexistant ou très faible). Environ quinze cas ont été étudiés pour la prostate. Pour ce qui concerne le sein, il s'agit d'une étude portant sur quatre cas de lésion bénigne (où il y a présence de cellules myo-épithéliales). La figure 15 présente les résultats positifs obtenus dans le cas d'un carcinome de la prostate, de glandes mammaires, de vaisseaux sanguins, d'une ponction-biopsie osseuse (PBO) et de cellules musculaires lisses en culture. Le marquage, très net, observé sur la coupe de prostate se situe au niveau du tissu musculaire lisse alors que les structures carcinomateuses ne sont pas marquées. Cette glande est riche en tissu musculaire lisse et celui-ci est également marqué dans le tissu normal ou adénomateux (hypertrophique). Cette révélation immunohistochimique est présente pour les cellules myo-épithéliales des glandes mammaires et les péricytes des vaisseaux sanguins ou les cellules musculaires lisses de la media vasculaire. Le tissu musculaire strié n'est pas révélé. Parmi les cinq PBO étudiées, une seule a démontré un marquage intracytoplasmique au niveau des mégakaryocytes. Enfin, un marquage granulaire est observé pour les cellules musculaires lisses en culture. Celui-ci semble ordonné selon les myofilaments du cytoplasme. Les frottis de moelle osseuse (quatre cas) n'ont pas démontré de marquage mais il est à noter que ce tissu étant très "sanguin", la qualité des tests est médiocre. Les frottis plaquettaires n'ont pas donné de résultats significatifs, la qualité du marquage étant plus que médiocre. Enfin, trois cas de leiomyosarcome, tissu cancéreux du tissu musculaire lisse, n'ont pas démontré de marquage.

L'immunoblotting réalisé sur le milieu conditionné par les cellules musculaires lisses et l'extrait cellulaire associé n'a pas démontré de révélation non spécifiques au niveau des protéines présentes dans ces échantillons (activés ou non). Il est également à noter que la présence de TGF- β n'a pas été mise en évidence (probablement quantité trop faible).

3 Purification du TGF- β 1 humain d'origine plaquettaire

3.1 Les concentrés plaquettaires humains périmes

Il a été possible de récolter environ mille poches de concentrés standards de plaquettes humaines, périmes du jour (cinquième jour) durant une période de trois mois (lundi-vendredi). Combinée à des chiffres indicatifs du C.R.T.S. de Nancy-Brabois, cette observation permet d'estimer à environ quatre à cinq mille par an, le nombre de concentrés périmes pouvant être obtenus à des fins de purification de facteurs de croissance.

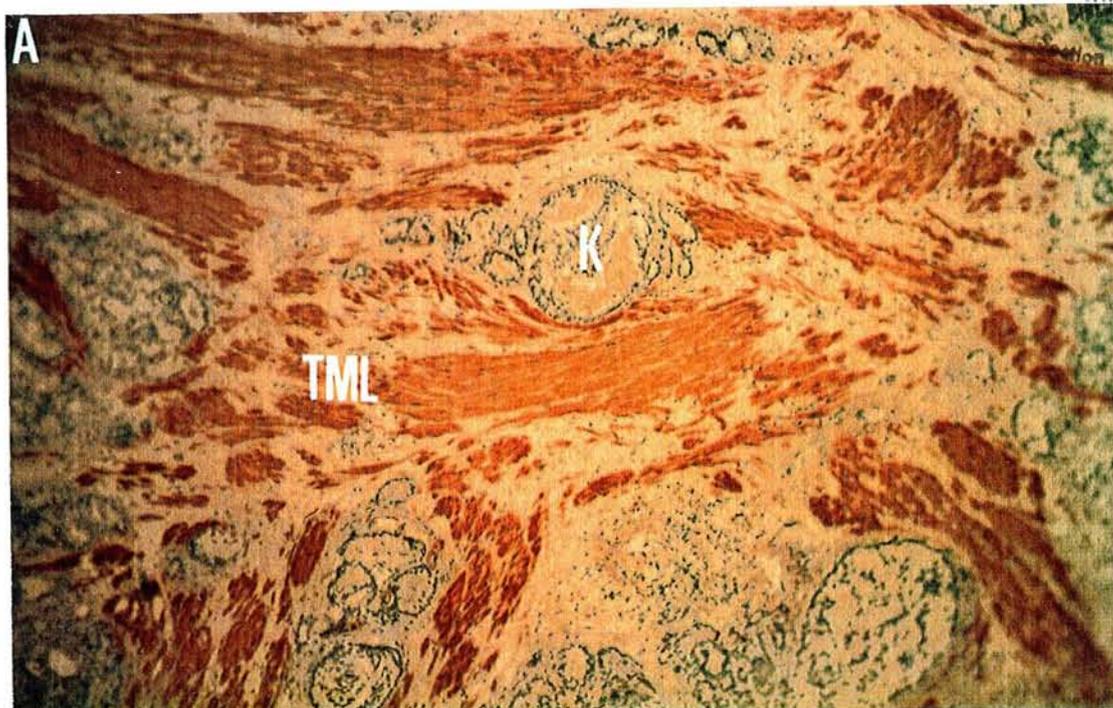


Figure 15 : Détection immunohistochimique du TGF- β par les anticorps immunopurifiés. A : carcinome de la prostate (objectif X 10), le tissu musculaire lisse (TML) est révélé par rapport au tissu cancéreux (K). **B :** glande mammaire (objectif X 25), le marquage se situe au niveau des cellules myo-épithéliales (MY). **C :** péricytes vasculaires (objectif X 25)

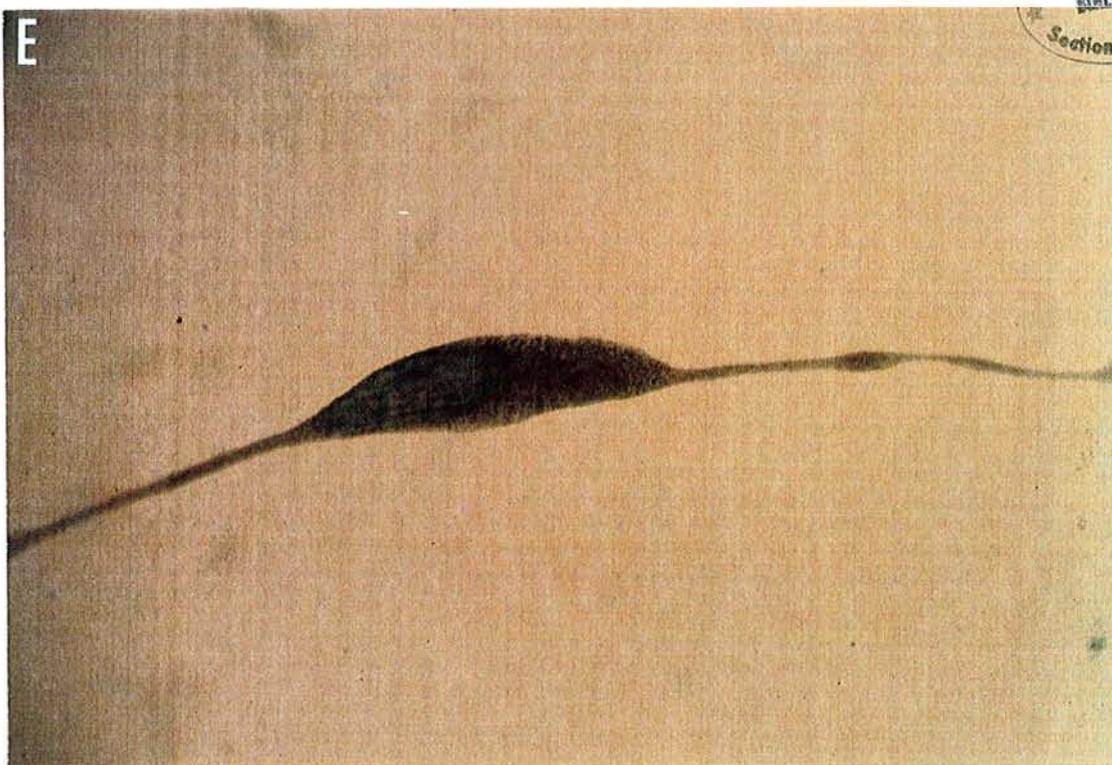
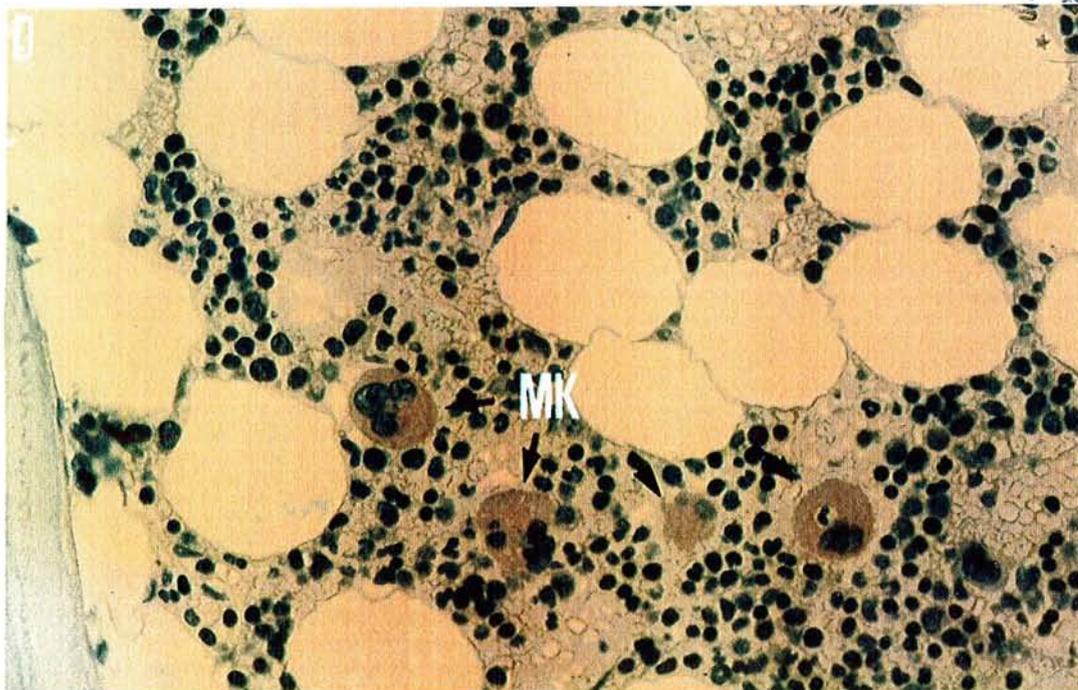


Figure 15 (suite) **D** : Ponction-biopsie osseuse (objectif X 40), un marquage intracytoplasmique est visible pour les mégakaryocytes (**MK**). **E** . cellules musculaires lisses en culture (objectif X 100), un marquage intracytoplasmique, ordonné est visible.

Les poches sont traitées le jour de leur péremption pour isoler les culots plaquettaires (il est à noter une proportion non négligeable de globules rouges dans ces culots). Une possibilité pratique serait la congélation, au fur et à mesure, permettant ainsi une collecte plus importante et plus aisée des concentrés.

Un dosage ponctuel de la β -TG réalisé sur le plasma de plaquettes périmées non congelées et après congélation a démontré une augmentation de 80% (13300 \rightarrow 24000 ng/ml). Alors que le dosage parallèle de l'activité TGF- β (inhibition de l'incorporation de thymidine tritiée par les cellules CCL64) a décelé une augmentation de 11,5% (89 \rightarrow 99 ng/ml).

Vingt cinq à deux cent concentrés ont été utilisés dans les méthodes de purification décrites.

3.2 Purification du TGF- β 1 selon la méthode d'Assoian

Quatre purifications de ce type ont été réalisées.

3.2.1 Lyse - extraction

Lors du lavage des culots plaquettaires, il a parfois été observé ce qui semble une activation des plaquettes, se traduisant par une diminution importante du volume du culot (avec un aspect plus transparent), le culot globulaire se retrouvant en phase supérieure.

La procédure de lyse - extraction ne pose pas de problème, mise à part la manipulation délicate d'éther qui demanderait un matériel protégé. L'extrait éthanol acide est brun. Après centrifugation et ajustement à pH 3, la préparation limpide est jaune clair. L'addition d'éthanol-éther donne naissance à un précipité nébuleux, blanc. Après centrifugation et redissolution dans l'acide acétique, la préparation est jaune-brun.

L'exemple présenté, ici, correspond à une purification réalisée à partir de vingt cinq concentrés périmés.

3.2.2 Filtration sur gel 1

Un chromatogramme de cette première étape qui permet d'éliminer les protéines de PM $>$ 60 kDa et de séparer grossièrement les protéines de PM similaire au TGF- β 1 est présenté sur la figure 16. L'élution du TGF- β 1 se situe à 18 kDa ($K_{av} = 0,32$).

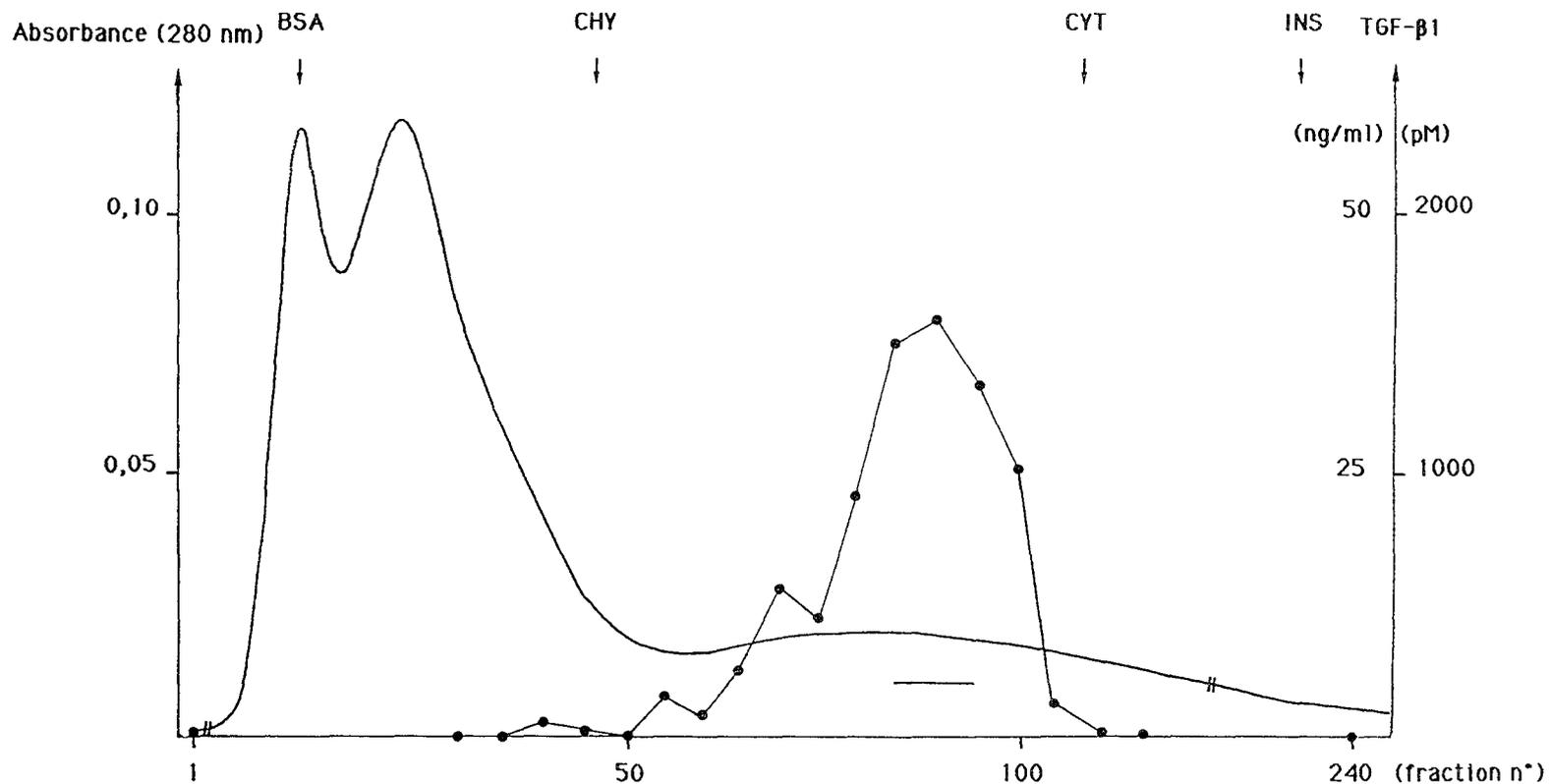


Figure 16 : Filtration sur gel 1. L'extrait plaquettaire (20 ml) additionné de saccharose 8% est injecté sur la colonne (4°C) de Biogel P-60 coarse (5 X 83.5 cm) équilibrée en acide acétique 1 M à un débit de 1 cm/h (20 ml/h). L'absorbance est suivie à 280 nm et des fractions de 5 ml sont collectées. Les fleches indiquent la position d'éluion (calibration) des protéines marqueurs de poids moléculaire : **BSA**, 68 kDa ; chymotrypsinogène A, **CHY**, 27 kDa ; cytochrome c, **CYT**, 12.5 kDa ; insuline, **INS**, 6 kDa. La position d'éluion du TGF- β 1 (18 kDa) a été déterminée par dosage biologique (induction de la croissance de cellules NRK-49F en agar semi-solide, concentration en ng/ml ou pM, ●) sur échantillon des fractions, lyophilisés en présence de BSA 1 mg/ml. Les fractions TGF- β 1 reunies sont indiquées par la barre.

3.2.3 Filtration sur gel 2

La présence d'urée 8 M permet la séparation du TGF- β 1 des protéines de PM voisin en évitant son élution "retardée". Comme le montre la figure 17, l'élution du TGF- β 1 se situe à 20 kDa ($K_{av} = 0,12$).

3.2.4 Chromatographie en phase inversée

Une dialyse contre une solution d'acide acétique 1 M et une lyophilisation ont été réalisées avant injection sur une colonne FPLC Pro RPC HR 5/10. La figure 18 présente le chromatogramme de cette dernière étape. L'élution du TGF- β 1 se situe à environ 36% d'acétonitrile.

3.2.5 Bilan de purification

Le tableau IV présente le bilan d'une purification ayant porté sur vingt cinq concentrés.

Les quantités de TGF- β 1 évaluées dans l'extrait (200 ng) et dans la fraction filtration sur gel 1 (1750 ng) sont faibles et discordantes. Ceci souligne les difficultés de quantification biologique du TGF- β . Environ 95% des protéines de l'extrait sont éliminés après la filtration sur gel 1 et seuls 1% des protéines injectées sur la colonne de filtration sur gel 2 sont retrouvées dans la fraction TGF- β 1. Il est à noter qu'il n'a pas été possible d'évaluer la concentration protéique dans la fraction phase inversée. Une très forte perte de TGF- β 1 est observée lors de cette étape de chromatographie en phase inversée. Le rendement final de purification est estimé à 10,8%.

3.2.6 Caractérisation du TGF- β 1 purifié

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide avec gradient (8-25%) et coloration argentique permet de contrôler rapidement l'efficacité des différentes étapes de purification. Sur le gel présenté en figure 19, une bande se situant à un poids moléculaire de 25 kDa correspond probablement au TGF- β 1. Après la première étape de filtration sur gel, une très forte contamination par des protéines d'environ 14,4 kDa est visible. Une amélioration notable est obtenue après la seconde étape de filtration sur gel et une bande de PM 55 kDa peut être observée. Cette même bande n'est plus visible après chromatographie en phase inversée mais une contamination par des protéines de petits PM persiste (PM inférieur à 14,4 et jusqu'à 20 kDa).

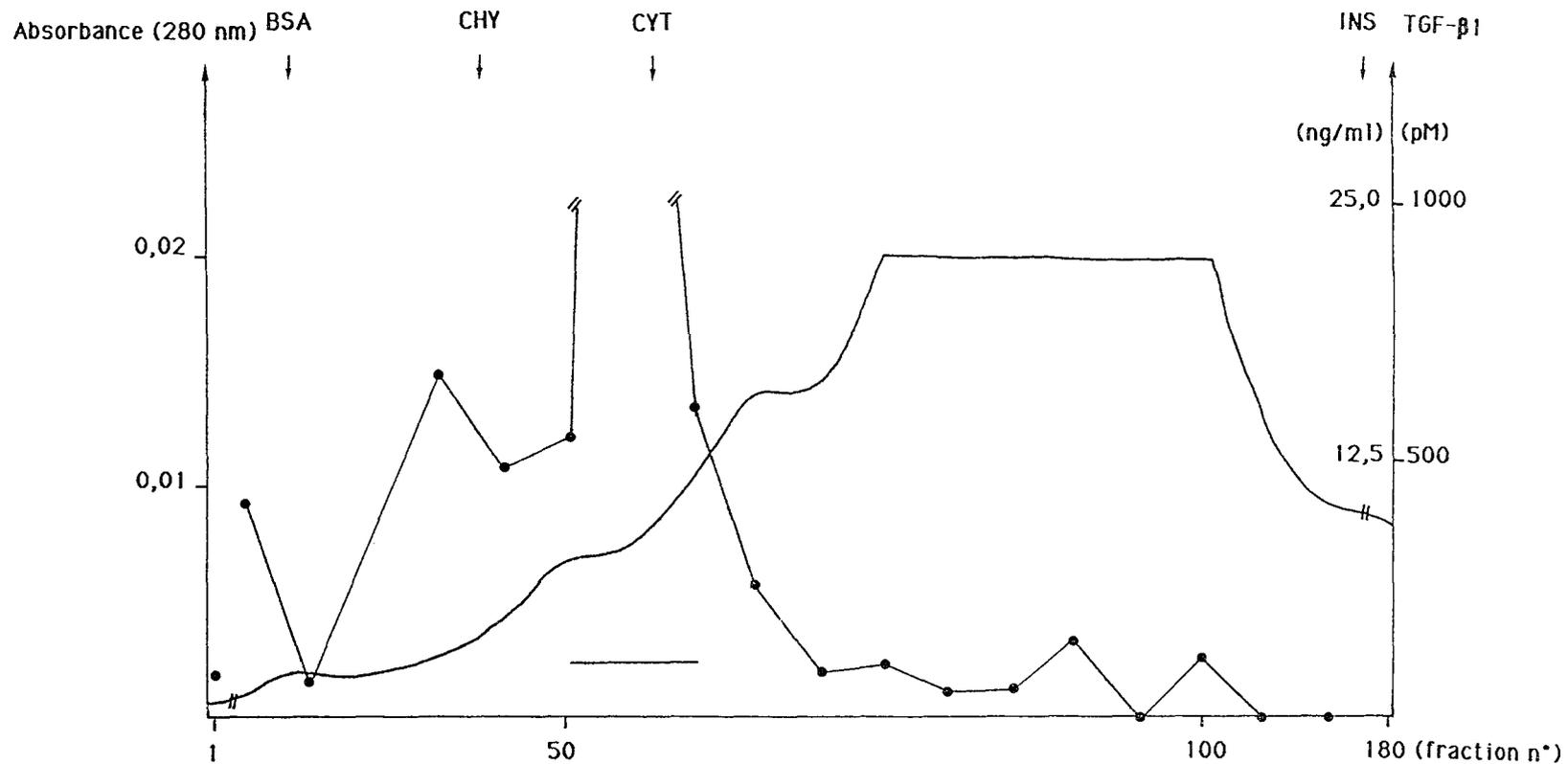


Figure 17 : Filtration sur gel 2. Les fractions TGF- β 1 réunies (précédente étape) sont lyophilisées et reconstituées par 1 ml de solution d'acide acétique 1 M - urée 8 M - saccharose 8%. L'échantillon est injecté sur la colonne de Bio-Gel P-60 fine (1,6 X 80 cm) équilibrée dans la solution acide acétique 1 M - urée 8 M à un débit de 1,5 cm/h (3 ml/h). L'absorbance est suivie à 280 nm et des fractions de 0,5 ml sont collectées. Les flèches indiquent la position d'éluion (calibration) des protéines marqueurs de poids moléculaire : **BSA**, 68 kDa ; chymotrypsinogène A, **CHY**, 27 kDa ; cytochrome c, **CYT**, 12,5 kDa ; insuline, **INS**, 3 kDa. La position d'éluion du TGF- β 1 (20 kDa) a été déterminée par dosage biologique (induction de la croissance de cellules NRK-49F en agar semi-solide, concentration en ng/ml ou pM, ●) sur échantillon des fractions dialysés en présence de BSA 1 mg/ml contre une solution d'acide acétique 1 M puis lyophilisés. Les fractions TGF- β 1 réunies sont indiquées par la barre.

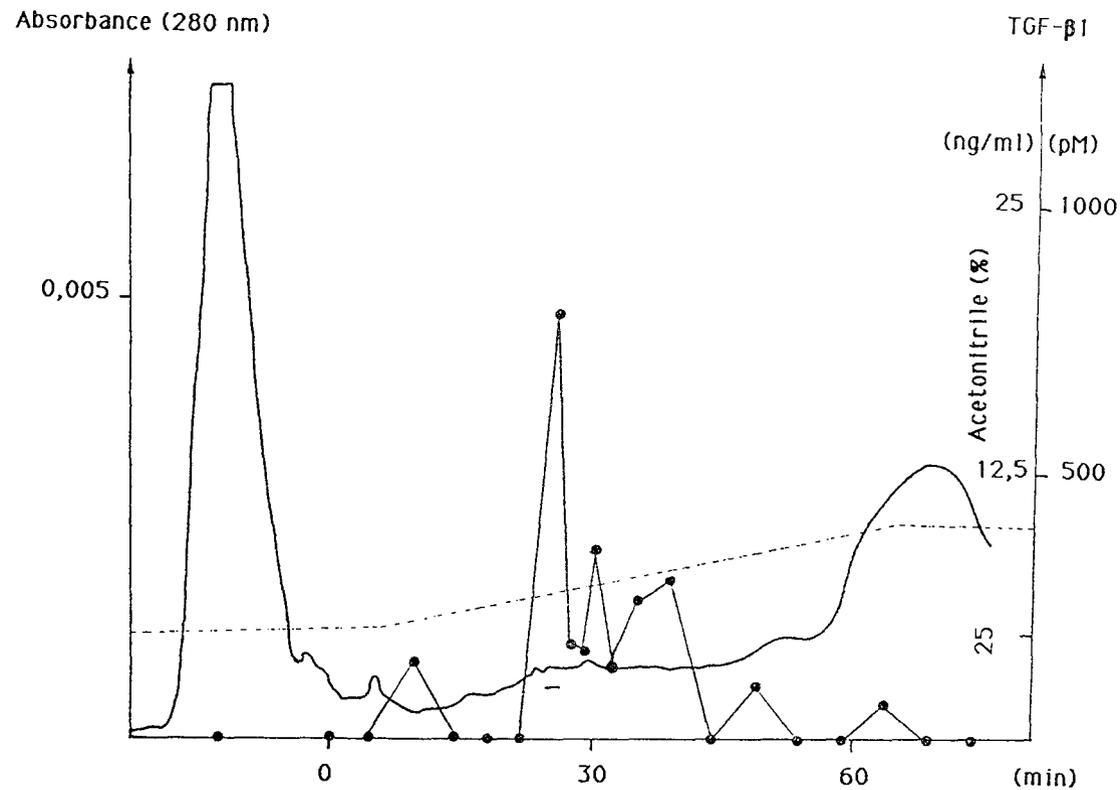


Figure 18 : Chromatographie en phase inversée. Les fractions TGF- β 1 réunies (étape de filtration sur gel 2) sont dialysées contre une solution d'acide acétique 1 M puis lyophilisées. Reconstituées par 1 ml d'acétonitrile 25% - TFA 0,1%, l'échantillon filtré 0,45 μ m est injecté sur la colonne FPLC Pro RPC HR 5/10 équilibrée en solution acétonitrile 25% - TFA 0,1%, à un débit de 92 cm/h (18 ml/h). Après lavage, un gradient linéaire (--) de 25 à 50% d'acétonitrile en TFA 0,1% est développé pendant 60 min. L'absorbance est suivie à 280 nm et des fractions de 0,5 ml sont collectées. La position d'élution du TGF- β 1 (36% d'acétonitrile) a été déterminée par dosage biologique (induction de la croissance de cellules NRk-49F en agar semi-solide, concentration en ng/ml ou pM, ●) sur échantillon des fractions lyophilisées en présence de BSA 1 mg/ml. Les fractions TGF- β 1 réunies sont indiquées par la barre.

Tableau IV : Bilan de purification selon la méthode d'Assoian (vingt cinq concentrés).

Etape	Volume (ml)	Concentration en protéines ($\mu\text{g/ml}$)	Quantité de protéines (mg)	Concentration en TGF- β 1 (ng/ml)	Quantité de TGF- β 1 (ng)	Activité spécifique (mg/mg. 10^{-6})	Facteur de purification	Rendement de purification (%)
Extrait	20,0	4187,0	83,74	10	200,0	2	1	100,0
Filtration sur gel 1	50,0	82,0	4,10	35	1750,0	427	177	875,0
Filtration sur gel 2	5,0	7,5	0,04	332	1660,0	44267	104	95,0
Phase inversee	0,5			43	21,5			1,3
Rendement final de purification :								10,8

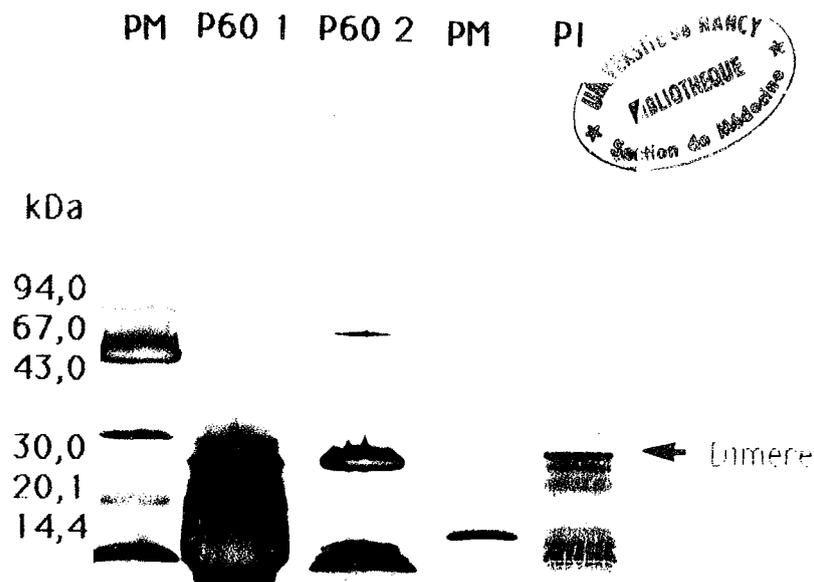


Figure 19 : Analyse SDS-PAGE (gradient 8-25%) avec coloration argentique du TGF- β 1 (flèche) purifié selon la méthode d'Assolian. Les échantillons appliqués : filtrations sur gel 1 (P60 1) et 2 (P60 2) ainsi que chromatographie en phase inversée (PI) contiennent environ 100-200 ng de protéines. Les protéines marqueurs de petits poids moléculaires sont : phosphorylase b, 94,0 kDa ; BSA, 67,0 kDa ; anhydrase carbonique, 30,0 kDa ; soybean trypsin inhibitor, 20,1 kDa ; α -lactalbumine, 14,4 kDa.

3.3 Purification du TGF- β 1 selon la méthode de Cone

Six purifications de ce type ont été réalisées.

3.3.1 Lyse - extraction

Cette méthode de lyse - extraction directe des culots plaquettaires (deux cent concentrés) permet leur traitement rapide et aisé. L'extrait éthanol acide est semblable à celui de la méthode d'Assolian. L'étape d'évaporation rotative permet une réduction de volume de 50% de l'extrait. Une dialyse contre le tampon d'équilibrage permet d'ajuster la force ionique en évitant une augmentation de volume par dilution.

3.3.2 Chromatographie d'échange de cations

Un support hydrophile d'utilisation très aisée (bonne résistance mécanique, débits élevés ...) a été expérimenté en chromatographie liquide (COOH Spheredex, IBF-Biotechnics). Une élution-régénération par une solution de NaCl 1 M n'a pas permis la désorption de TGF- β 1. Une tentative d'élution par gradient linéaire jusqu'à NaCl 3 M (en 20 h) a également échoué. L'application de la

solution de régénération AlAc après la solution de régénération HCl, élue l'activité TGF- β 1. Cette fraction est lactescente car elle doit contenir des lipides ou lipoprotéines désorbés par la forte proportion d'éthanol (60%) en milieu acide acétique (0,5 M). Un exemple de chromatogramme est présenté sur la figure 20.

3.3.3 Chromatographie en phase inversée

Comme indiqué sur la figure 21, l'élution du TGF- β 1 se situe à environ 35 % d'acétonitrile.

3.3.4 Bilan de purification

L'exemple présenté sur le tableau V est une purification portant sur deux cent concentrés. Les quantités de TGF- β 1 dans l'extrait et la fraction échange de cations sont discordantes soulignant, à nouveau, les difficultés de quantification du TGF- β . L'efficacité d'adsorption sur le support échangeur de cations est de 98-99%. Il est à noter qu'il n'a pas été possible d'évaluer la concentration protéique dans la fraction phase inversée. Le rendement final de purification est estimé à 11%.

3.3.5 Caractérisation du TGF- β 1 purifié

L'analyse SDS-PAGE (gradient 8-25%, présentée sur la figure 22) avec coloration argentique permet de mettre en évidence dans la fraction échange de cations, une contamination majeure par des protéines de petit PM par rapport à la bande TGF- β 1 se situant à 25 kDa.

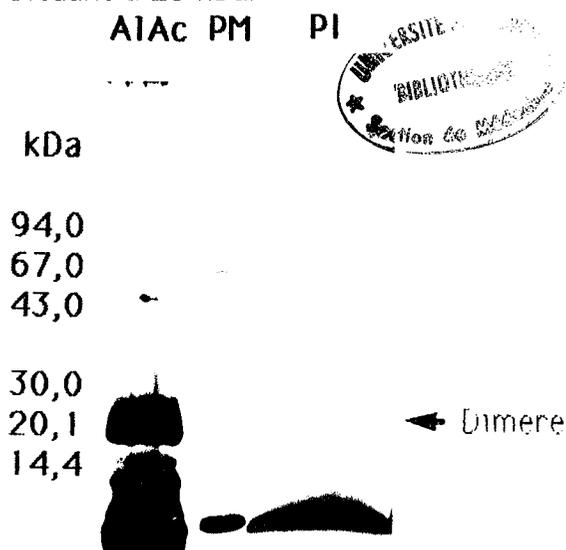


Figure 22 : Analyse SDS-PAGE (gradient 8-25%) avec coloration argentique du TGF- β 1 (flèche) purifié par la méthode de Cone. Echantillons appliqués chromatographies d'échange de cations (AIAc) et phase inversée (PI)

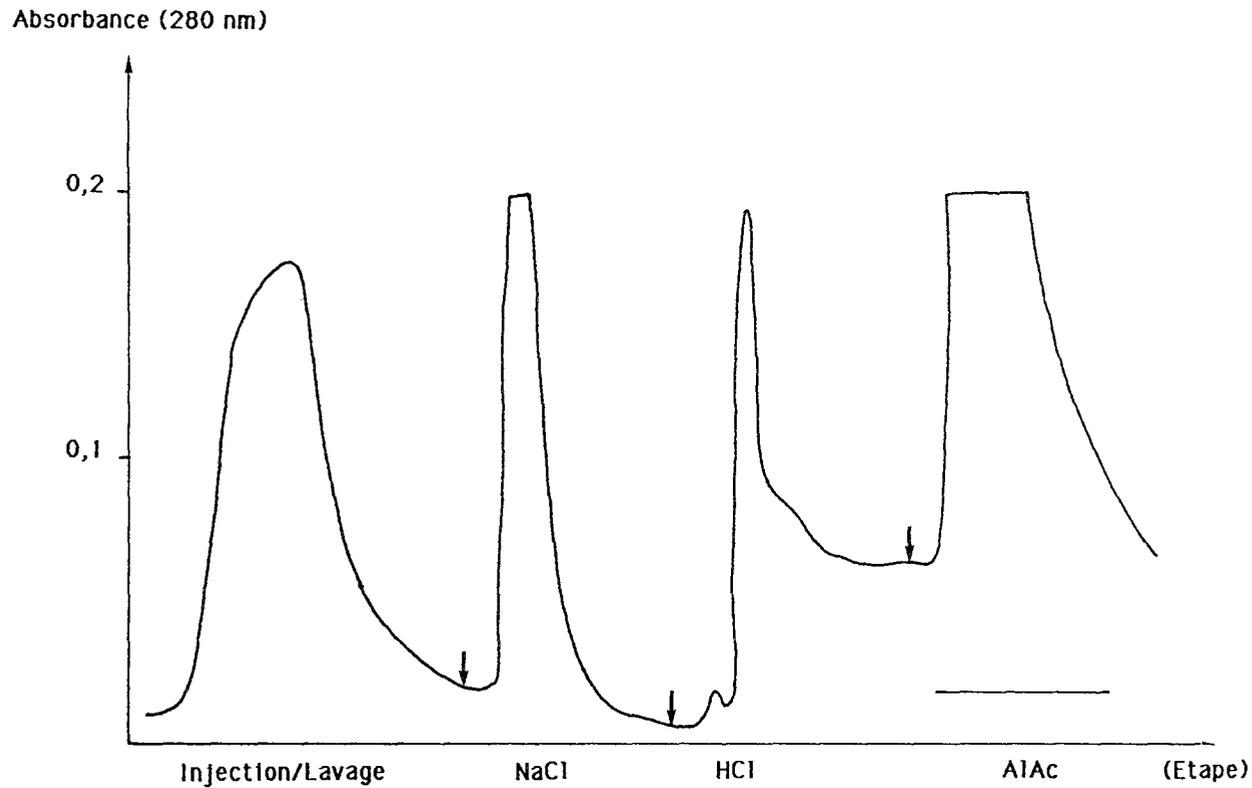


Figure 20 : Chromatographie d'échange de cations. L'extrait plaquettaire (250 ml) est injecté sur la colonne de COOH-Spherodex (5 X 15 cm) équilibrée en tampon acétate de sodium 0,025 M, pH 5,5, à un débit de 10 cm/h (200 ml/h). L'absorbance est suivie à 280 nm et la totalité des pics est collectée. Les solutions de régénération sont injectées à un débit de 20 cm/h (400 ml/h). La position d'élution du TGF- β 1 (fraction AIAC, barre) a été déterminée par dosage biologique (fixation compétitive au récepteur) sur échantillon de fractions dialysé en présence de BSA 1 mg/ml et lyophilisé.

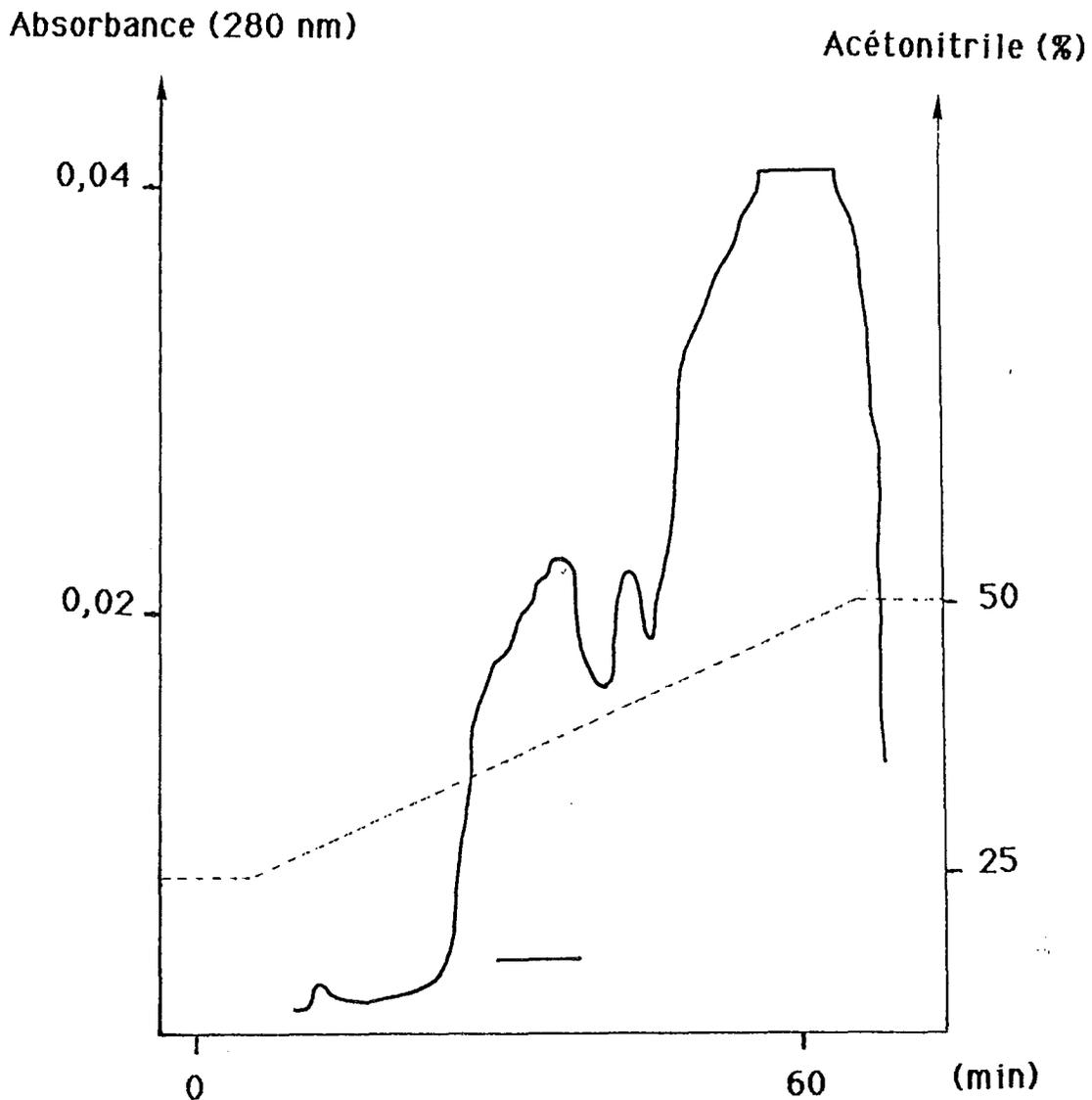


Figure 21 : Chromatographie en phase inversée. Le pic de régénération A1Ac de l'étape précédente est soumis à évaporation rotative à 40°C, centrifugé et lyophilisé. Après reconstitution (8 ml d'acétonitrile 25% - TFA 0,1%) et filtration 0,45 μm , l'échantillon est injecté sur la colonne FPLC Pro RPC HR 5/10. Un gradient linéaire (--) de 25 à 50% d'acétonitrile en TFA 0,1% est développé pendant 60 min (méthode d'Assouan). L'absorbance est suivie à 280 nm et des fractions de 0,5 ml sont collectées. La position d'éluion du TGF- β 1 (35% d'acétonitrile) a été déterminée par analyse SDS-PAGE (gradient 8-25%) avec coloration argentique d'échantillon de fractions lyophilisé.

Tableau V : Bilan de purification selon la méthode de Cone (deux cent concentrés).

Etape	Volume (ml)	Concentration en protéines ($\mu\text{g/ml}$)	Quantité de protéines (mg)	Concentration en TGF- β 1 (ng/ml)	Quantité de TGF- β 1 (ng)	Activité spécifique (mg/mg. 10^{-6})	Facteur de purification	Rendement de purification (%)
Extrait	250	700	175	2800	$7 \cdot 10^5$	4000	1	100
Echange de cations	11	4690	52	$1,7 \cdot 10^5$	$1,9 \cdot 10^6$	36247	9	267
Phase inversée	24			3300	$7,9 \cdot 10^4$			4
Rendement final de purification :								11

L'étape de chromatographie en phase Inversées élimine une grande partie de ces contaminants puisqu'il est alors possible d'observer deux bandes contaminantes majeures à 19 et 14 kDa. Un immunoblotting a confirmé l'identité TGF- β 1 de la bande se situant à 25 kDa.

3.4 Purification du TGF- β 1 selon la méthode neutre

Cette méthode de purification appliquée à la préparation de TGF- β 1 est un des éléments d'un schéma de purification global de facteurs de croissance humains d'origine plaquettaire. Elle fut d'abord expérimentée lors d'un premier stage pré-doctoral au LICR effectué pour l'apprentissage de la méthode de purification du L-TGF- β 1. Une dizaine de purification de TGF- β 1 par cette méthode neutre a été réalisée.

3.4.1 Lyse -extraction

Le choc osmotique et/ou les congélations/décongélations ont été comparés. Il est observé sur la figure 23 qu'une seule congélation/décongélation est très efficace par rapport au choc osmotique seul. Ensuite, il y a une stabilisation par rapport au nombre de ces congélations/décongélations mais la combinaison choc osmotique - cinq congélations/décongélations semble plus efficace que cinq congélations/décongélations, donc ce protocole fut appliqué (deux cent concentrés).

3.4.2 Chromatographie d'échange de cations

L'étape de chromatographie d'échange de cations permet l'adsorption de traces de TGF- β 1 présentes dans l'extrait neutre qui sont éluées dans la fraction A1Ac.

3.4.3 Chromatographie d'échange d'anions

Cette seconde étape est très importante puisqu'il y a adsorption de PD-ECGF et L-TGF- β 1. Une étude de la molarité en NaCl (accroissement par palier de 100 à 1000 mM, résultats présentés sur la figure 24) nécessaire à l'éluion du L-TGF- β 1, dans les conditions opératoires décrites, a démontré que celle-ci est maximale à 300-400 mM. En conséquence, comme présenté sur la figure 25, la première éluion est réalisée à 200 mM et la seconde à 500 mM en NaCl. La régénération du support est réalisée par le tampon d'éluion 3 (NaCl 1000 mM) et la solution de régénération. La première étape d'éluion permet la desorption d'un anneau noirâtre puis un second rouge (hémoglobine).

Colonies < 60 $\mu\text{m}/9,6 \text{ cm}^2$

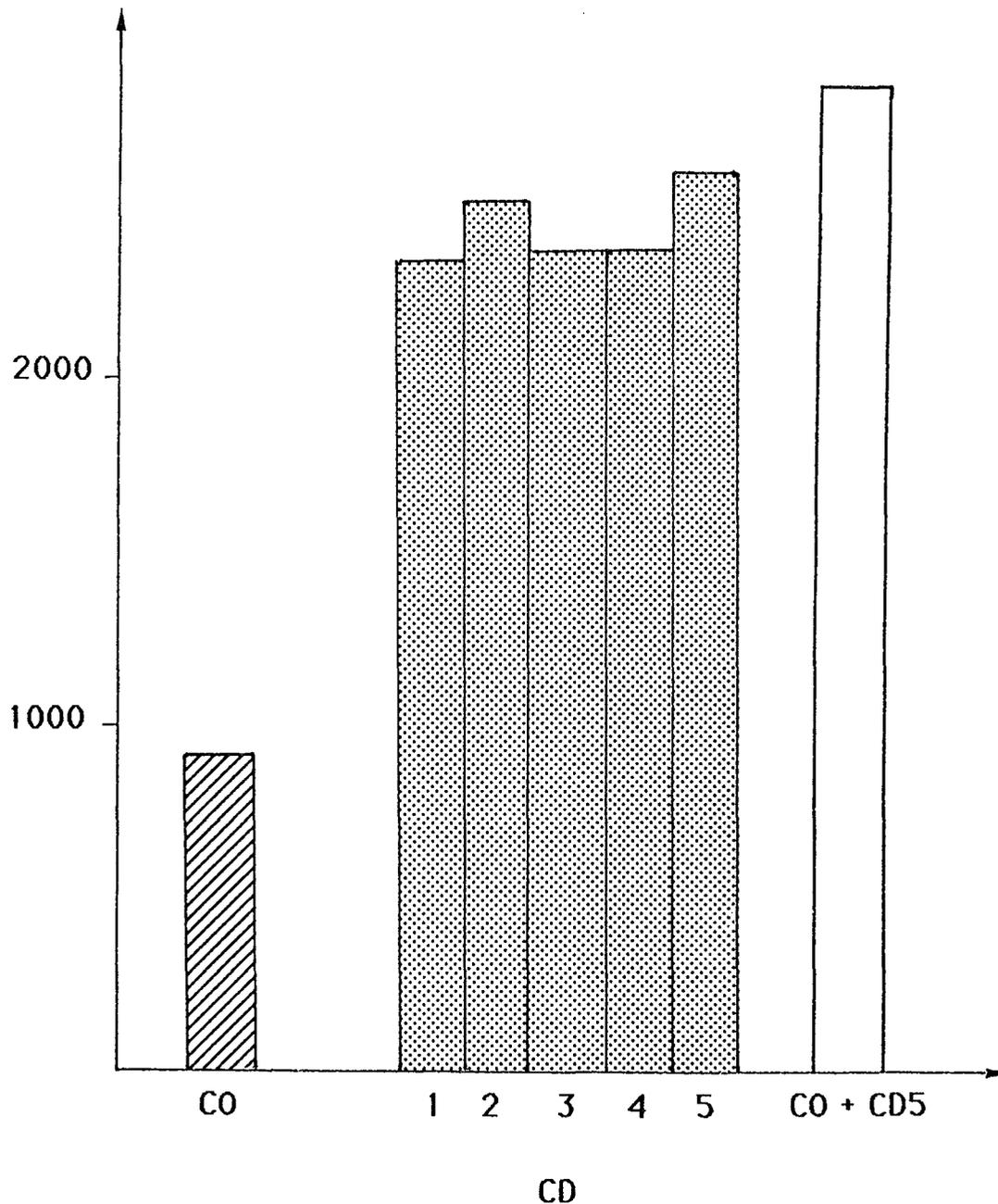


Figure 23 : Lyse - extraction neutre des concentrés plaquettaires. Une comparaison de l'efficacité de la lyse - extraction des plaquettes par choc osmotique (CO) et/ou congélation/décongélation (CD 1-5) a été réalisée. Le dosage biologique du TGF- β 1 dans les différents extraits a été effectué par induction de la croissance de cellules NRK-49F en agar semi-solide (après activation). Le nombre de colonies > 60 $\mu\text{m}/9,6 \text{ cm}^2$ représenté correspond à la différence entre la valeur de l'échantillon non activé et la valeur de l'échantillon activé.

Colonies < 60 $\mu\text{m}/9,6 \text{ cm}^2$

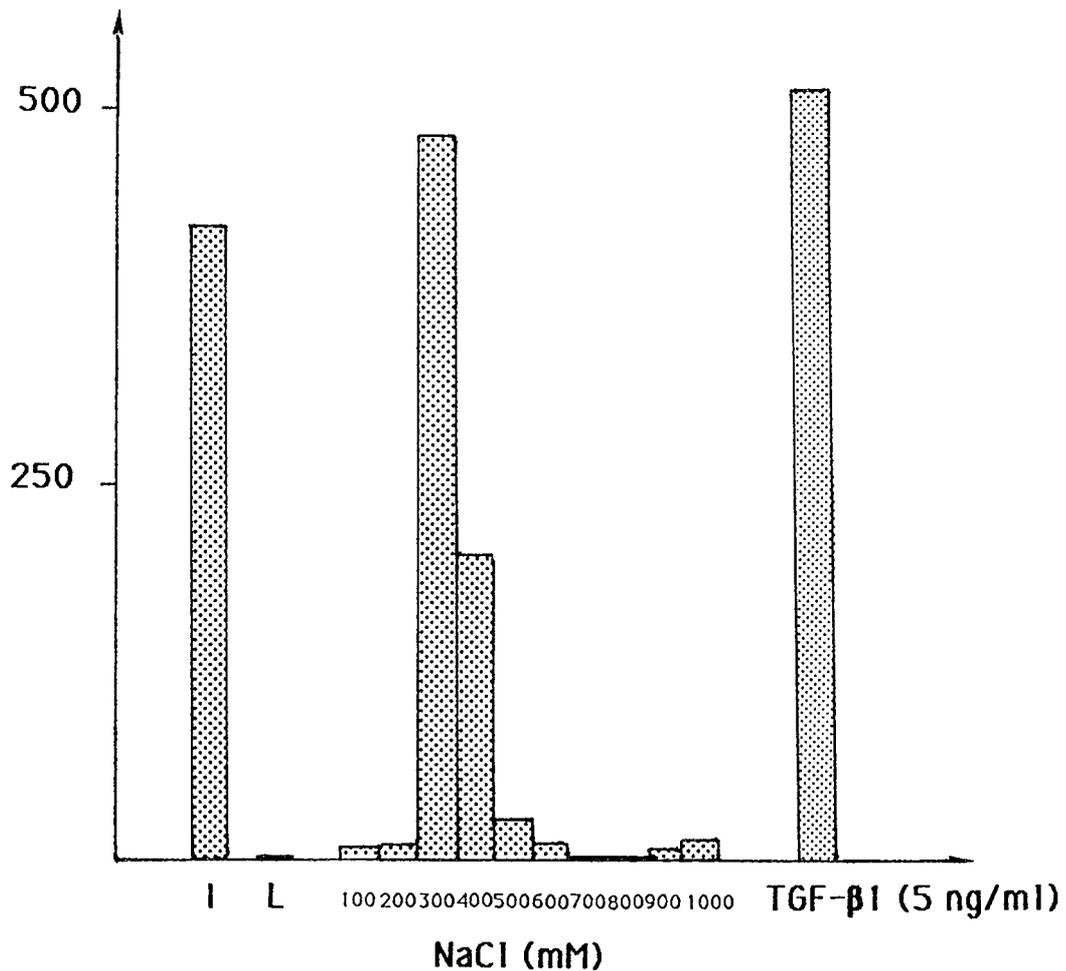


Figure 24 : Conditions d'élution du L-TGF- β 1 du support échangeur d'anions : Q Sepharose Fast Flow. Un extrait plaquettaire (vingt concentrés) est injecté (I) sur la colonne (4°C) de Q Sepharose Fast Flow (2,6 X 7,9 cm) équilibrée en tampon phosphate de sodium 10 mM, pH 7,4, à un débit de 19 cm/h (100 ml/h). Après lavage (L), la molarité en chlorure de sodium dans le tampon phosphate de sodium 10 mM, pH 7,4 nécessaire à l'élution du L-TGF- β 1 a été déterminée par élution par palier (NaCl 100 à 1000 mM), collecte de la totalité des pics et dosage du TGF- β 1 (après activation) par induction de croissance de cellules NRK-49F en agar semi-solide (nombre de colonies cellulaires de diamètre supérieur à 60 $\mu\text{m}/9,6 \text{ cm}^2$). Un témoin TGF- β 1 (5 ng/ml ou 200 pM) est présenté

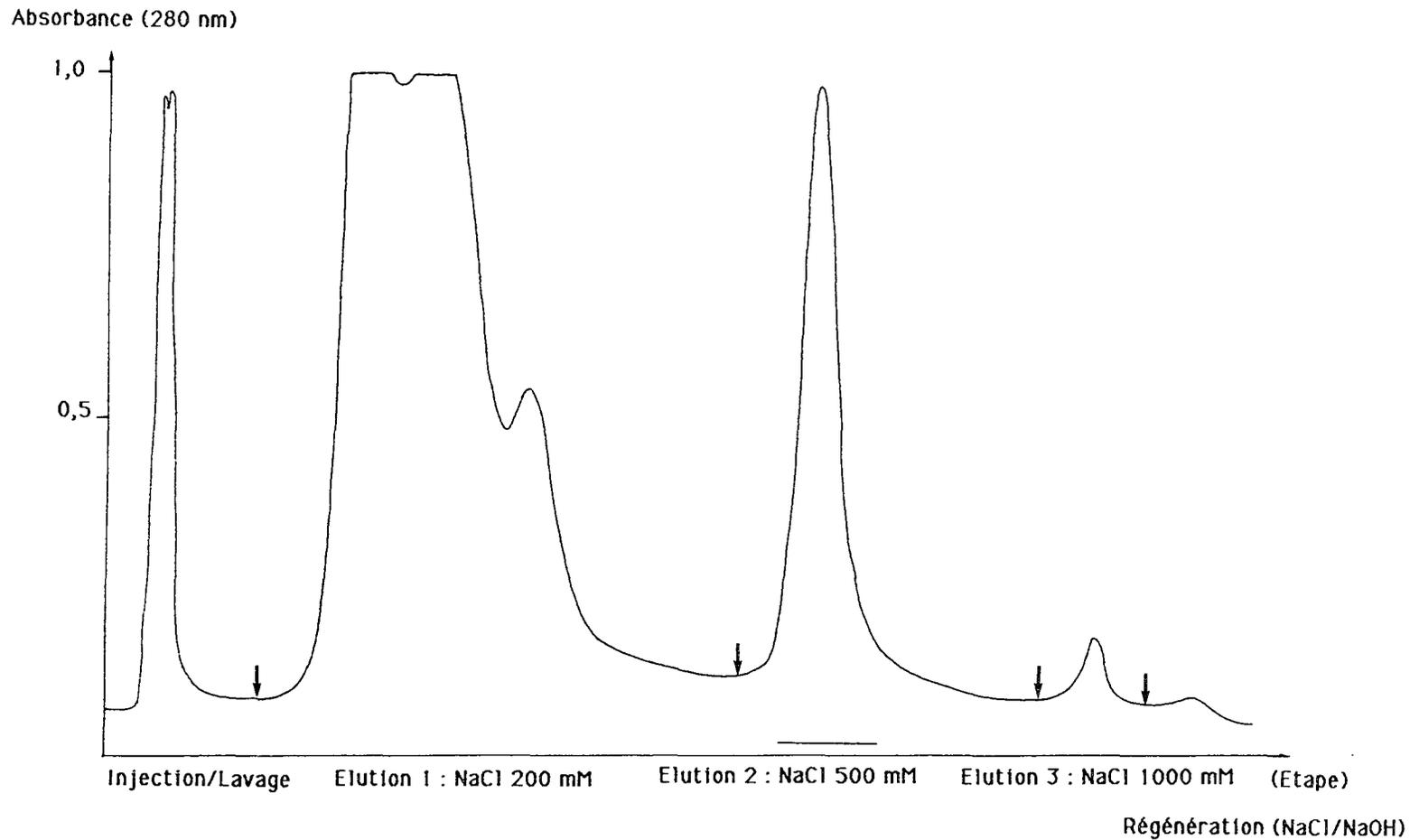


Figure 25 : Chromatographie d'échange d'anions. L'extrait plaquettaire ayant subi une première chromatographie d'échange de cations sur COOH-Spherodex (200 ml) est injecté sur la colonne (4°C) de O Sepharose Fast Flow (2,6 X 7,9 cm) équilibrée en tampon phosphate de sodium 10 mM, pH 7,4 à un débit de 19 cm/h (100 ml/h). L'absorbance est suivie à 280 nm et la totalité des pics est collectée. Le L-TGF- β 1 est élué (élution 2) dans la fraction correspondante au tampon phosphate de sodium 10 mM, NaCl 500 mM, pH 7,4 (barre).

3.4.4 Précipitation au sulfate d'ammonium et activation

La précipitation au sulfate d'ammonium à 35% de saturation et à pH neutre constitue une étape de concentration du L-TGF- β 1 (62% des protéines précipités et 97% du L-TGF- β 1). Cette opération est effectuée dès la fin de la collecte de la fraction d'éluion 500 mM en NaCl.

L'activation du L-TGF- β 1 oriente la purification vers la préparation de TGF- β 1. Cette étape est critique puisqu'elle libère le TGF- β 1 de son complexe et les problèmes d'hydrophobicité de cette molécule sont à prendre en compte pour éviter des pertes trop importantes. Différentes méthodes d'activation par acidification, en présence ou non de BSA 1 mg/ml, ont été expérimentées. Les résultats en sont présentés sur la figure 26. La présence de BSA pour diminuer l'adsorption hydrophobe du TGF- β 1 est utile dans tous les cas mais d'une façon marquée pour la dialyse en acide acétique 1 M. Il est certain qu'une telle adjonction de BSA n'est pas possible dans un protocole de purification. La dialyse contre une solution d'acide acétique 1 M ou l'addition directe d'acide acétique concentré dans l'échantillon jusqu'à une concentration de 1 M, en absence de BSA, semblent les meilleures méthodes d'activation.

3.4.5 Filtration sur gel

Cette étape (chromatogramme présenté sur la figure 27) similaire à la filtration sur gel réalisée dans la méthode d'Assoian permet une purification partielle du TGF- β 1 (K_{av} = 0,39) par élimination des protéines de PM > 60 kDa.

3.4.6 Chromatographie en phase inversée

Cette étape n'a pas été réalisée systématiquement mais seulement dans le but de trouver un outil pour améliorer très significativement la qualité de la préparation du TGF- β 1 après l'étape de filtration sur gel. En utilisant le système FPLC Pro RPC HR 5/10 (chromatogramme présenté sur la figure 28), l'éluion du TGF- β 1 se situe à environ 32-33% de 1-propanol. L'analyse SDS-PAGE avec coloration argentique (en encadré) démontre la persistance de protéines contaminantes de petit PM. Il est à noter la présence d'une bande 55 kDa au dessus de la bande TGF- β 1 se situant à 25 kDa.

3.4.7 Filtration sur gel HPLC Lichrospher Si DIOL

Lors d'un essai qualitatif, ponctuel, cette méthode a permis la séparation effective de trois pics (présentée sur la figure 29) dont la concentration protéique trop faible n'a pas permis une analyse par SDS-PAGE avec coloration argentique (la totalité des pics lyophilisée et appliquée pour une analyse). Ne s'agissant pas d'une étape de filtration sur gel au sens propre du terme (autres

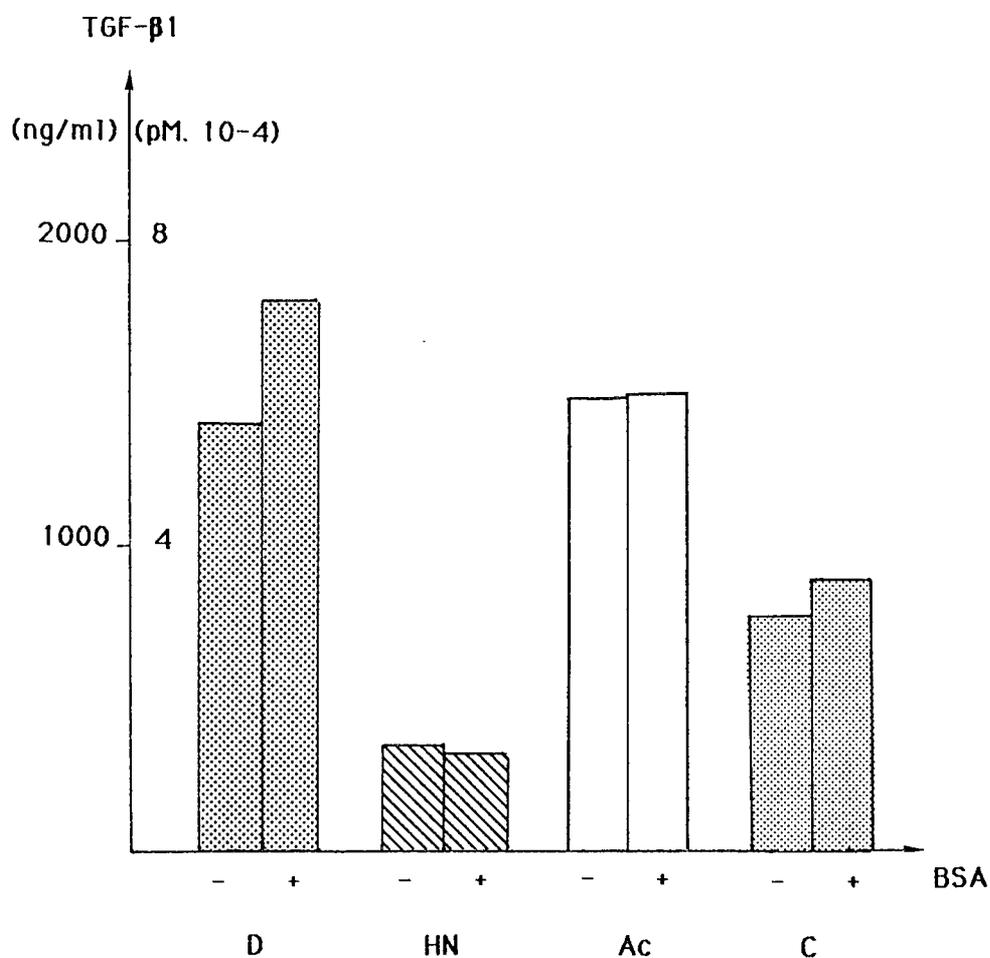


Figure 26 : Conditions d'activation par acidification du L-TGF-β1 après précipitation au sulfate d'ammonium. Une fraction d'éluion de L-TGF-β1 par le tampon phosphate de sodium 10 mM, NaCl 500 mM, pH 7,4 a été soumise à différentes techniques d'activation par acidification en présence ou non (+ ou -) de **BSA** 1 mg/ml : dialyse acétique 1 M (**D**), acidification transitoire par addition d'HCl puis NaOH (**HN**), addition directe d'acide acétique concentré jusqu'à 1 M (**Ac**), extrait ethanol acide de Cone (**C**). L'efficacité d'activation a été déterminée par dosage biologique (inhibition de l'incorporation de thymidine tritiée par les cellules CCL64, facteur de dilution pris en compte, ng/ml ou pM).

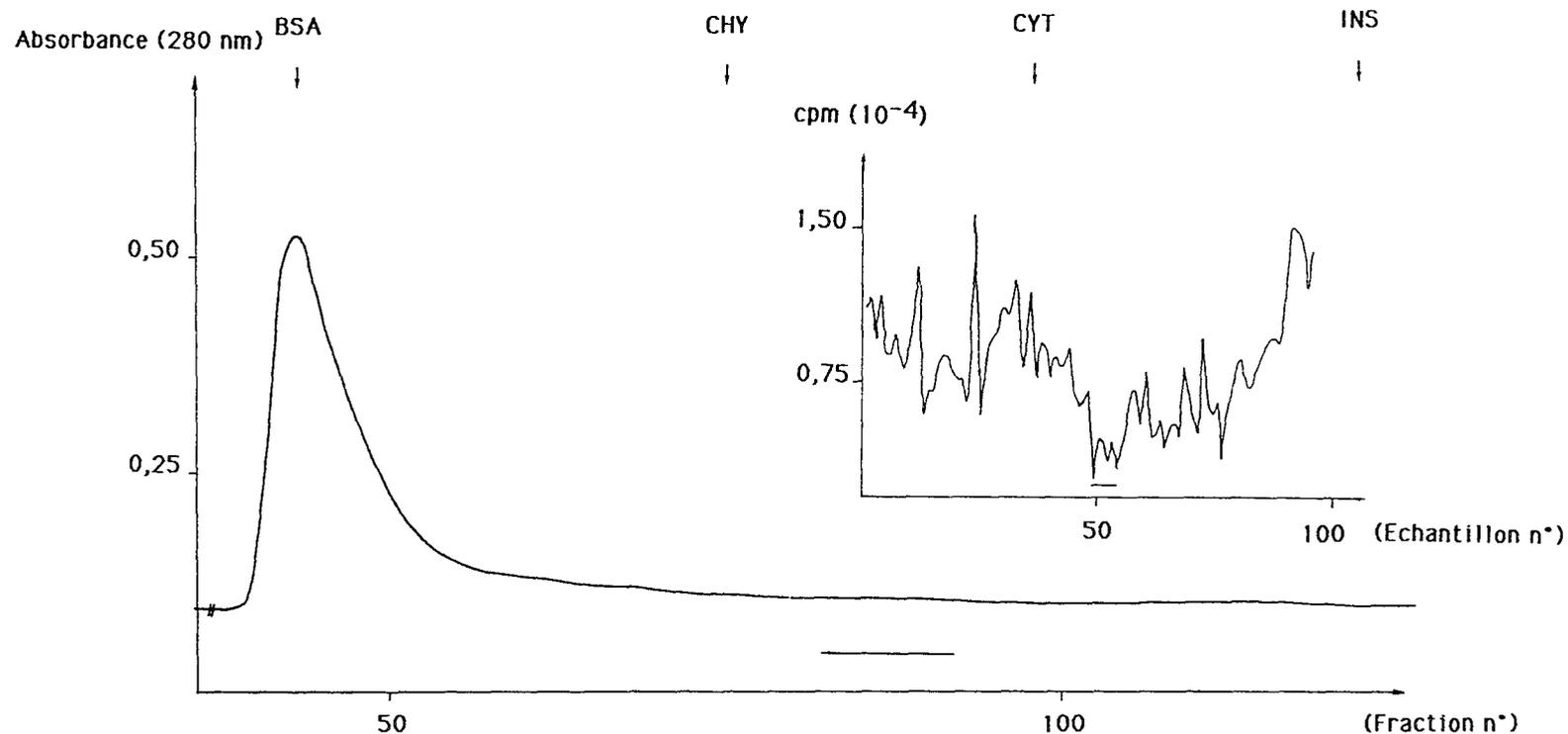


Figure 27 : Filtration sur gel. La preparation de TGF- β 1 activé (2 ml, saccharose 8%) est injectée sur la colonne (4°C) de Biogel P-60 fine (1,6 X 83 cm) équilibrée en acide acétique 1 M a un débit de 5 cm/h (10 ml/h). L'absorbance est suivie à 280 nm et des fractions de 1 ml sont collectées. Les fleches indiquent la position d'éluion des protéines marqueurs de poids moléculaire : **BSA**, 68 kDa ; chymotrypsinogène A, **CHY**, 27 kDa ; cytochrome c, **CYT**, 12,5 kDa ; insuline, **INS**, 6 kDa. La position d'éluion du TGF- β 1 (18 kDa) a été déterminée par analyse SDS-PAGE avec coloration argentique sur échantillon de fractions lyophilisé ou par test biologique d'inhibition d'incorporation de thymidine tritiée par les cellules CCL64 (micro-test en plaque quatre vingt seize puits, voir encadré, radioactivité exprimée en cpm). Les fractions TGF- β 1 réunies sont indiquées par la barre

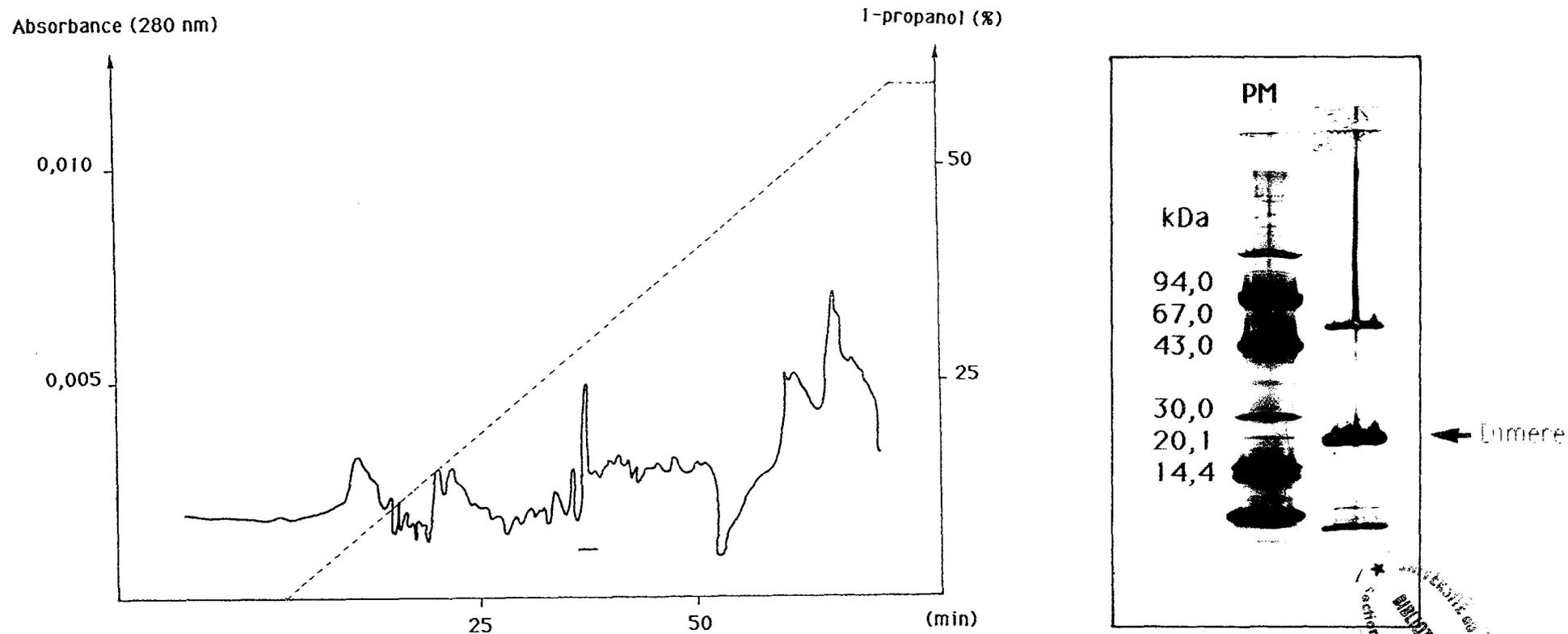


Figure 28 : Chromatographie en phase inversée. Un échantillon des fractions réunies (étape précédente) lyophilisé, reconstitué dans 2 ml de TFA 0,1% et filtré 0,45 μ m est injecté sur la colonne Pro RPC HR 5/10 équilibrée en TFA 0,1% à un débit de 306 cm/h (60 ml/h). Après lavage, un gradient linéaire (--) de 0 à 50% de 1-propanol en TFA 0,1% est développé en 70 min. L'absorbance est suivie à 280 nm et des fractions de 1 ml sont collectées. La position d'elution du TGF- β 1 (32-33% de 1-propanol, barre) a été déterminée par analyse SDS-PAGE (gradient 8-25%) avec coloration argentique d'échantillon de fractions lyophilisé (encadré, flèche).

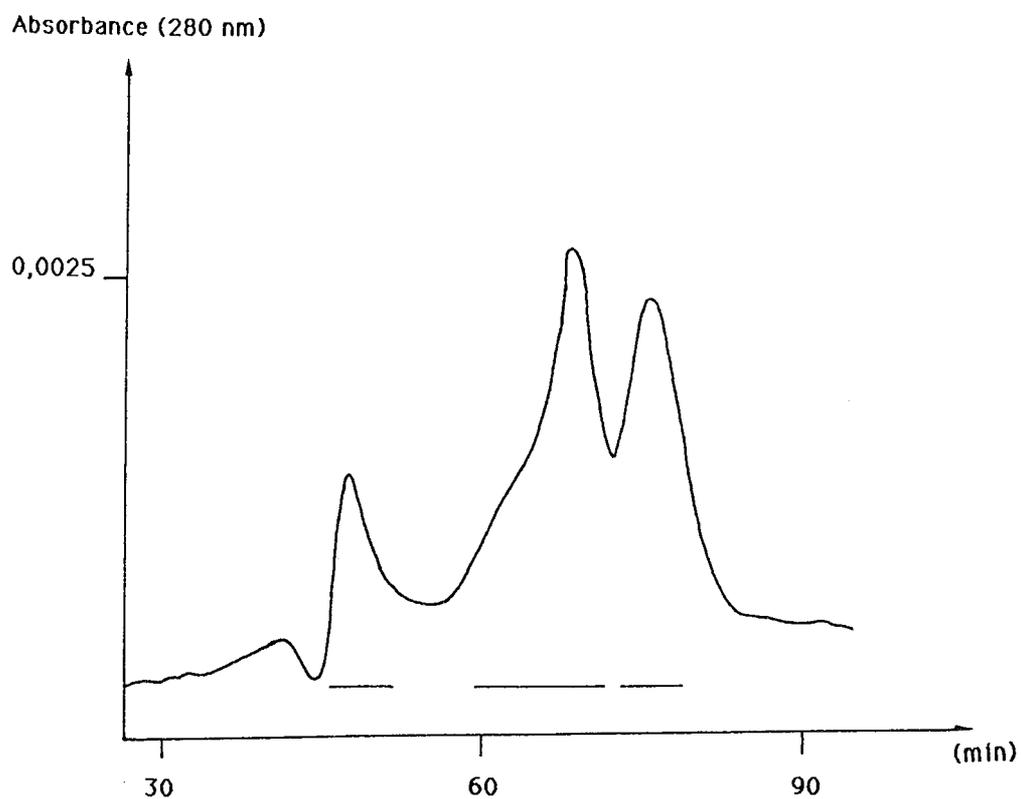


Figure 29 : Filtration FPLC sur gel HPLC Lichrospher Si DIOL. Environ 4,6 μg de protéines (25 μl) provenant de l'étape de filtration sur gel sont injectés sur la colonne 100 DIOL (0,4 x 25 cm, 3,14 ml) équilibrée en acide acétique 1 M à un débit de 48 cm/h (6 ml/h). L'absorbance est suivie à 280 nm et la totalité des pics (barres) est collectée. La position d'éluion du TGF- β 1 n'a pu être déterminée par analyse SDS-PAGE (gradient 8-25%) avec coloration argentique (application de la totalité des pics lyophilisée).

interactions en plus du poids moléculaire apparent et du "volume" des protéines), il n'a pas été possible d'évaluer le PM d'élution des trois composés.

3.4.8 Chromatographie HPLC en phase inversée narrow-bore C4

Comme précédemment, cette méthode n'a pas été réalisée systématiquement mais durant un second séjour pré-doctoral. Une séparation très effective du TGF- β 1 de ses contaminants (présentée sur la figure 30) a été obtenue comme le démontre l'analyse SDS-PAGE (gradient 8-25% en encadré) avec coloration argentique. Le (s) contaminant (s) de petit PM est (sont) d'abord élué (s) à environ 30% de 1-propanol (C1) puis le TGF- β 1 à environ 32% (T) et enfin le contaminant à environ 35,5-40% de 1-propanol (C2).

3.4.9 Bilan de purification

Le tableau VI présente la moyenne des résultats de trois cycles de purification portant sur deux cent concentrés chacun. Une perte très importante est à noter au niveau de l'étape de précipitation/activation. Il n'a pas été possible d'évaluer la concentration protéique dans la fraction filtration sur gel. La fraction d'élution AlAc, lors de l'étape de chromatographie d'échange de cations, contient 2,7% du TGF- β 1 injecté sur cette colonne. Le rendement final de purification a été estimé à 1,7%.

3.4.10 Caractérisation du TGF- β 1 purifié

L'analyse SDS-PAGE (gradient 8-25%) avec coloration argentique de la fraction filtration sur gel (présentée sur la figure 31) permet d'observer la présence de deux bandes contaminantes à 56 et surtout 13 kDa.

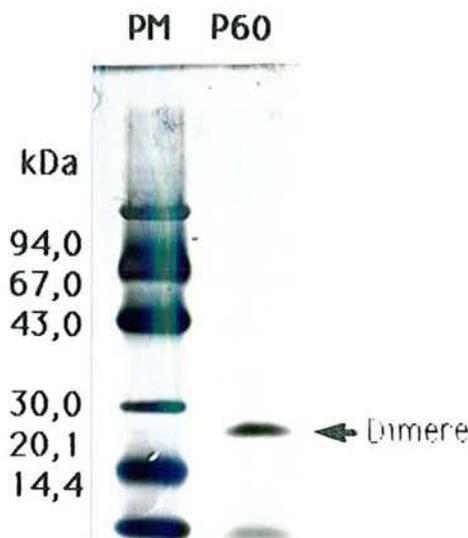


Figure 31 : Analyse SDS-PAGE (gradient 8-25%) avec coloration argentique du TGF- β 1 purifié par la méthode neutre. Echantillon appliqué après filtration sur gel, P60.

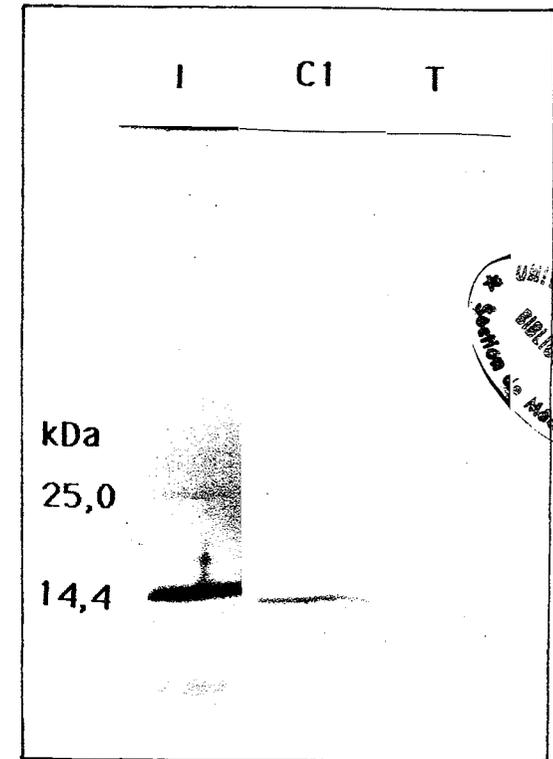
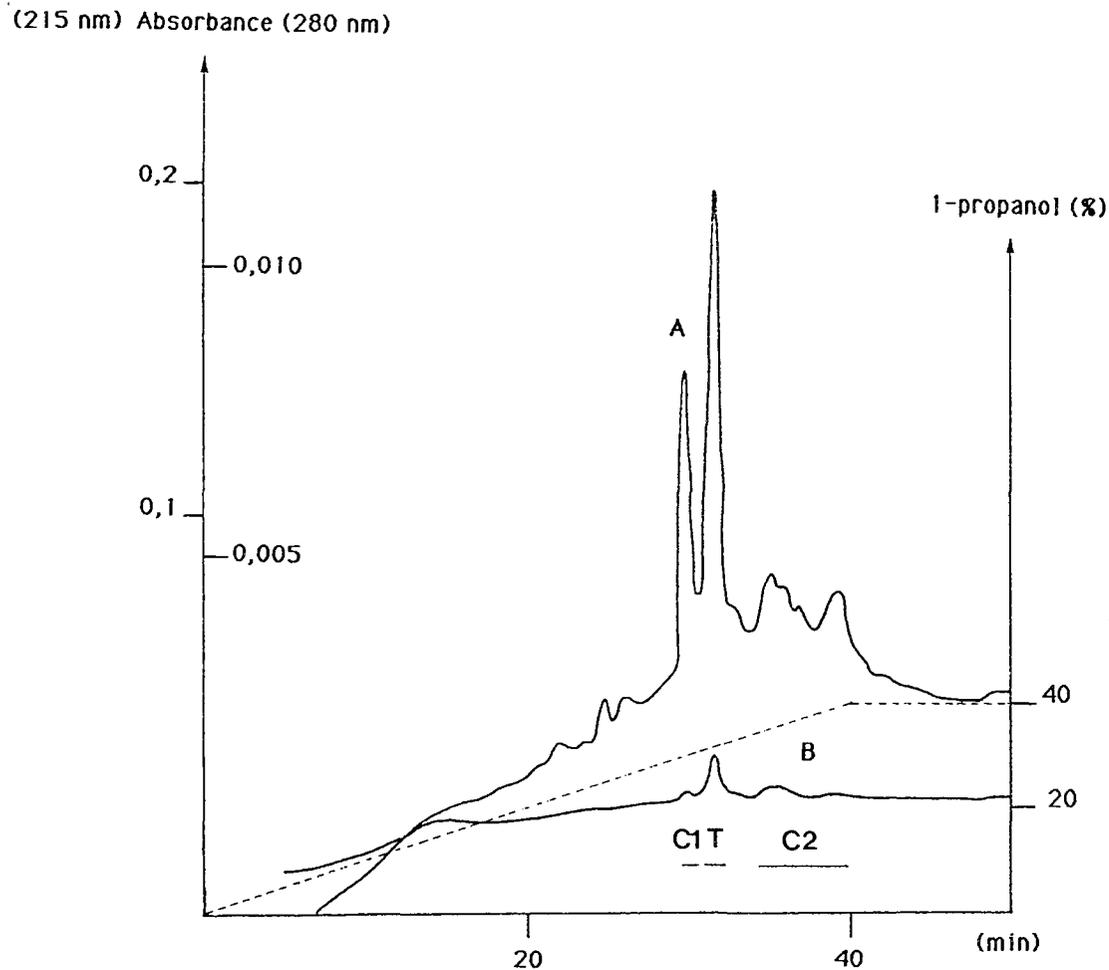


Figure 30 : Chromatographie HPLC en phase inversée narrow-bore C4. Un échantillon de TGF- β 1 (1 ml) provenant de l'étape de filtration sur Biogel P-60 est injecté sur la colonne (tour à colonne à 45°C) Aquapore butyl EU-300 (cartouche 0,21 X 3 cm) équilibré en TFA 0,15% à un débit de 173 cm³/h (6 ml/h). Après lavage, un gradient linéaire (---) de 0 à 40% de 1-propanol en TFA 0,15-0,1% est développé. L'absorbance est suivie simultanément à 215 (A) et 280 (B) nm avec collecte de la totalité des pics (barres). La position d'éluion du TGF- β 1 (32% de 1-propanol) a été réalisée par analyse SDS-PAGE (gradient 8-25%) avec coloration argentique sur échantillon de fractions concentré par centrifugation sous vide : I, injection ; C1, contaminant 1 ; T, TGF- β 1 ; C2, contaminant 2 (non représenté)

Tableau VI : Bilan de purification selon la méthode neutre (deux cent concentrés).

Etape	Volume (ml)	Concentration en protéines ($\mu\text{g/ml}$)	Quantité de protéines (mg)	Concentration en TGF- β 1 (ng/ml)	Quantité de TGF- β 1 (ng)	Activité spécifique (mg/mg. 10^{-6})	Facteur de purification	Rendement de purification (%)
Extrait	790	5349	4226	122	96380	23	1	100,0
Echange de cations	914	4300	3930	105	95970	24	1	99,6
Echange d'anions	343	688	236	90	30870	131	5	32,2
Précipitation /activation	6	1903	11	822	4932	432	3	16,0
Filtration sur gel	11			146	1606			32,6
Rendement final de purification : 1,7								
AlAc	288	196	56	9	2592	46	2	

Un immunoblotting a confirmé l'identité TGF- β 1 de la bande se situant à 25 kDa (flèche). Une révélation discrète et pas toujours visible est à noter au niveau de ces bandes contaminantes.

3.5 Immunopurification du TGF- β 1

3.5.1 Préparation de l'immuno-adsorbant

Une quantité de 25 mg d'anticorps immunopurifiés a été soumise à couplage avec un rendement de fixation de 73% et un taux de couplage de 3,6 mg/ml de gel, le volume de la colonne étant de 4,6 ml.

3.5.2 Immunopurification du TGF- β 1

L'immunopurification du TGF- β 1 a porté sur différentes préparations plus ou moins purifiées.

3.5.2.1 Extrait neutre activé

Après injection d'un extrait neutre, activé (cinquante concentrés plaquettaires, chromatogramme présenté en figure 32) et lavage avec du tampon PBS, un lavage à forte force ionique (NaCl 1 M en PBS) a été réalisé pour éliminer de possibles adsorptions non spécifiques. Deux types d'élution de force croissante ont été effectuées pour définir la plus satisfaisante : solution acide de glycine et solution chaotrope de thiocyanate de sodium. Le tableau VII décrit les résultats obtenus. Une efficacité d'immuno-adsorption de 83% et un rendement final d'immunopurification (fraction glycine) de 7% sont obtenus. Il est à noter que le lavage NaCl 1 M entraîne une desorption de TGF- β 1, que l'élution glycine est efficace mais que l'élution thiocyanate de sodium semble la compléter

3.5.2.2 Extrait de Cone

Lors de l'utilisation de ce type d'extrait (plus drastique), il a été possible de démontrer des adsorptions non spécifiques à la matrice activée, sans anticorps, simplement saturée par la glycine. Une même préparation a été injectée sur la colonne d'immunopurification et sur une colonne (de volume identique) de support saturé par la glycine puis sur la colonne d'immunopurification. Le tableau VIII résume les résultats obtenus. L'extrait injecté directement sur la colonne d'immunopurification (extrait 1) permet une efficacité d'immuno-adsorption de 72% avec un rendement d'immunopurification de 1%. L'injection de l'extrait 1 sur une colonne "glycine" entraîne une efficacité d'adsorption de 70% et un rendement de "purification" de 1%. Si l'effluent de cette colonne (lavage 2) est alors injecté sur la colonne d'immunopurification, une efficacité d'immuno-adsorption de 96% et un rendement d'immunopurification de 14% sont alors observés.

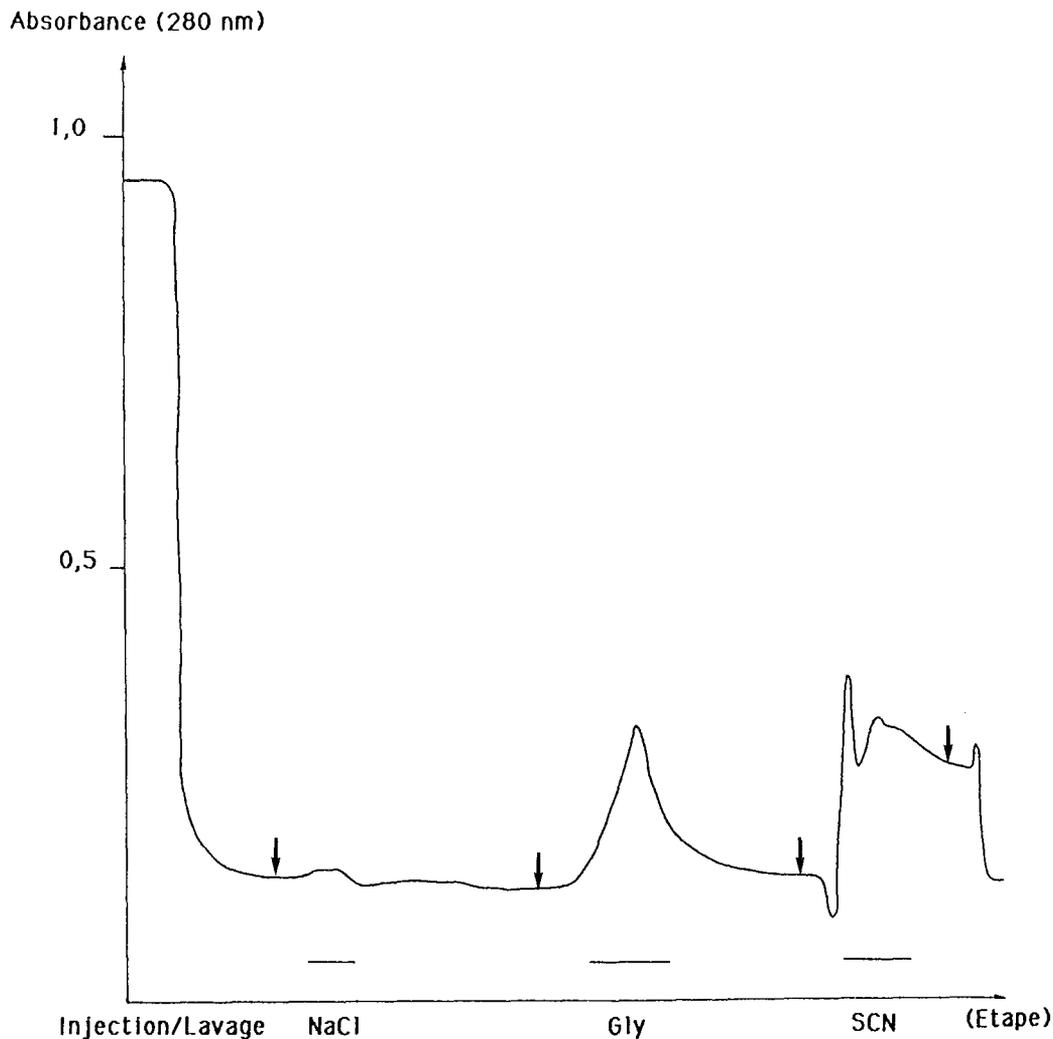


Figure 32 : Immunopurification du TGF- β 1 à partir d'un extrait plaquettaire neutre activé. L'extrait activé est injecté sur la colonne d'anticorps anti-C-91-106-OVA - Sepharose (0,9 X 7,2 cm) équilibrée en tampon PBS à un débit de 15,7 cm³/h (10 ml/h). L'absorbance est suivie à 280 nm et la totalité des pics est collectée (barre). Après lavage avec le tampon PBS, un lavage à forte force ionique (NaCl 1 M en PBS) est réalisé puis elutions avec une solution glycine 0,05 M, NaCl 0,15 M, pH 2,3 et une solution de thiocyanate de sodium 3 M en acetate de sodium 0,1 M, pH 6. La totalité des pics (barres) est collectée. Le dosage du TGF- β 1 a été effectué par dosage biologique (inhibition de l'incorporation de thymidine tritiée par les cellules CCL64) sur échantillon de fractions dialysé contre une solution d'acide acétique 1 M en présence de BSA 1 mg/ml et lyophilisé.

Tableau VII : Bilan d'immunopurification du TGF- β 1 à partir d'un extrait plaquettaire neutre activé.

Etape	Volume (ml)	Concentration en protéines (μ g/ml)	Quantité de protéines (mg)	Concentration en TGF- β 1 (ng/ml)	Quantité de TGF- β 1 (ng)	Activité spécifique (mg/mg. 10^{-6})	Facteur de purification	Rendement de purification (%)
Extrait	240	2461	591,64	353	84720	143	1	100
Lavage	250	2185	546,25	57	14250	26		
NaCl	5	19	0,10	159	795	8368	58	1,0
Gly	8	62	0,50	773	6006	12468	87	7,0
SCN	7	45	0,32	9	63	200	1	0,1

Rendement final de purification (gly) : 7,0

Tableau VIII : Bilan d'immunopurification du TGF- β 1 à partir d'un extrait plaquettaire de Cone et adsorptions non spécifiques.

	Volume	Concentration en protéines	Quantité de protéines	Concentration en TGF- β 1	Quantité de TGF- β 1	Activité spécifique	Facteur de purification	Rendement de purification
Etape	(ml)	(μ g/ml)	(mg)	(ng/ml)	(ng)	(mg/mg. 10 ⁻⁶)		(%)
Extrait 1	10,0	4127	41,3	4602	46020	1115	1,0	100
Lavage 1	10,0	3346	33,5	1284	12840			
Elution 1	7,0	39	0,3	73	511	1872	1,7	1
Extrait 1	10,0	4127	41,3	4602	46020	1115	1,0	100
Lavage 2	11,0	3040	33,4	1247	13717			
Elution 2	6,8	110	0,7	67	452	622	1,5	1
Lavage 2	10,0	3040	30,4	1247	12470	410	1,0	100
Lavage 2'	14,0	1874	26,2	32	448			
Elution 2'	11,5	53	0,6	157	1806	2961	7,2	14

La première partie de ce tableau concerne l'immunopurification d'un extrait plaquettaire de Cone (extrait 1). Dans la seconde partie, ce même extrait est injecté, tout d'abord, sur une colonne de glycine-Sepharose pour étude des adsorptions non spécifiques. L'effluent de cette colonne (Lavage 2) est alors soumis à une étape d'immunopurification dont les résultats figurent dans la troisième partie du tableau (lavage et elution 2').

Chromatographie en phase inversée

Ce type de chromatographie a été expérimentée ponctuellement dans le but d'améliorer la qualité du TGF- β 1 immunopurifié. Deux ml de TGF- β 1 immunopurifié à partir d'un extrait de Cone (6094 ng de TGF- β 1, activité déterminée par inhibition de l'incorporation de thymidine tritiée par les cellules CCL64) ont été injectés (chromatogramme présenté sur la figure 33) avec une efficacité d'adsorption de 81%. Le TGF- β 1 est élué à environ 38% d'acétonitrile. Le rendement de cette étape est de 27%. L'analyse SDS-PAGE avec coloration argentique (en encadré) permet de constater que la préparation, après cette étape additionnelle, est de meilleure qualité que l'échantillon injecté mais il est à noter la persistance de contaminants de faible PM.

3.5.2.3 Fractions dérivées de la purification du TGF- β 1 selon la méthode neutre

- après précipitation au sulfate d'ammonium : fraction NH₄
- après chromatographie de filtration sur Biogel : fraction P60

Les tableaux IX et X décrivent les résultats obtenus.

L'immunopurification appliquée à la fraction de la méthode neutre, après précipitation au sulfate d'ammonium (et activation) entraîne une efficacité d'immuno-adsorption de 92% avec un rendement d'immunopurification de 64%

L'injection de la fraction P60 de la méthode neutre, après filtration sur gel et en présence de BSA, permet une efficacité d'immuno-adsorption de 90% avec un rendement d'immunopurification de 75%. Il est à noter qu'une étude ponctuelle de l'adsorption non spécifique de la BSA (solution PBS - BSA 1 mg/ml) au support d'immunopurification et à la matrice activée (volumes identiques) saturée par la glycine, a démontré des fixations non spécifiques, respectivement de 15 et 10%.

3.5.3 Caractérisation du TGF- β 1 immunopurifié

La figure 34 permet de comparer les différentes préparations de TGF- β 1 immunopurifié. Deux types de protéines contaminantes ont été mises en évidence. Les plus hauts PM correspondent probablement à des anticorps "décrochés" ou fragments (un immunoblotting positif sans anticorps primaire anti-C-91-106-OVA le confirmant). Les autres bandes majeures ont des PM d'environ 55, 30 et < 14,4 kDa. L'identité TGF- β 1 de la bande 25 kDa est confirmée par un immunoblotting.

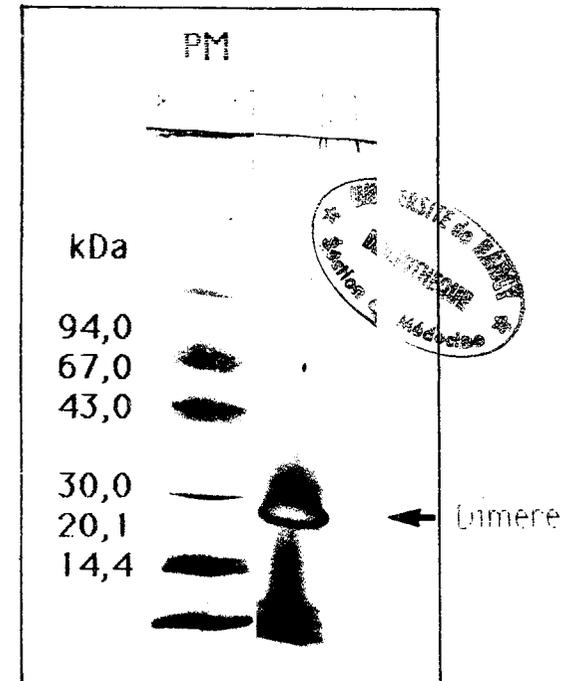
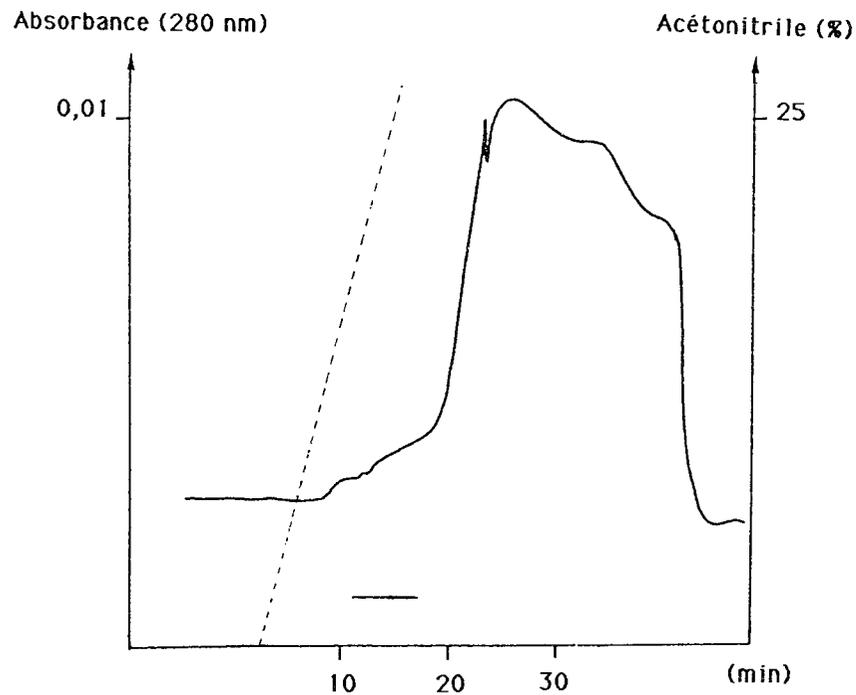


Figure 33 : Chromatographie en phase inversée de TGF- β 1 immunopurifié. Un échantillon (6094 ng) de TGF- β 1 immunopurifié (après dialyse contre une solution d'acide acétique 1M, lyophilisation, reconstitution dans 2 ml d'acétonitrile 25% - TFA 0,1% et filtration 0,45 μ m) à partir d'un extrait plaquettaire de Cone est injecté sur la colonne FPLC Pro RPC HR 5/10 équilibrée en solution d'acétonitrile 25% - TFA 0,1% à 92 cm/h (18 ml/h). Après un lavage, un gradient linéaire (--) de 25 à 50% d'acétonitrile en TFA 0,1% est développé pendant 25 min. L'absorbance est suivie à 280 nm et des fractions de 0,6 ml sont collectées. La position d'élution du TGF- β 1 (environ 38% d'acétonitrile) a été déterminée par dosage biologique (inhibition de l'incorporation de thymidine tritiée par les cellules CCL64) sur échantillon de fractions lyophilisé en présence de BSA 1 ng/ml. Les fractions réunies sont indiquées par la barre. Une analyse SDS-PAGE (gradient 8-25%) avec coloration argentique du TGF- β 1 (flèche) ainsi purifié (PI) est présentée en encadré.

Tableau IX : Bilan d'immunopurification du TGF- β 1 à partir d'une fraction de la méthode neutre : après précipitation au sulfate d'ammonium et activation.

	Volume	Concentration en protéines	Quantité de protéines	Concentration en TGF- β 1	Quantité de TGF- β 1	Activité spécifique	Facteur de purification	Rendement de purification
Etape	(ml)	(μ g/ml)	(mg)	(ng/ml)	(ng)	(mg/mg. 10^{-6})		(%)
Fraction NH ₄	10	872	9,0	31635	316350	36279	1,0	100
Lavage	15	460	0,7	1699	25485			
Elution	6	50	0,3	33615	201690	650613	18,0	64

Tableau X : Bilan d'immunopurification du TGF- β 1 à partir d'une fraction de la méthode neutre : après filtration sur Biogel P-60.

	Volume	Concentration	Quantité	Rendement
Etape	(ml)	en TGF- β 1 (ng/ml)	de TGF- β 1 (ng)	de purification (%)
Fraction P60	10,5	606	6060	100
Lavage	11,5	52	598	
Elution	9,5	480	4560	75

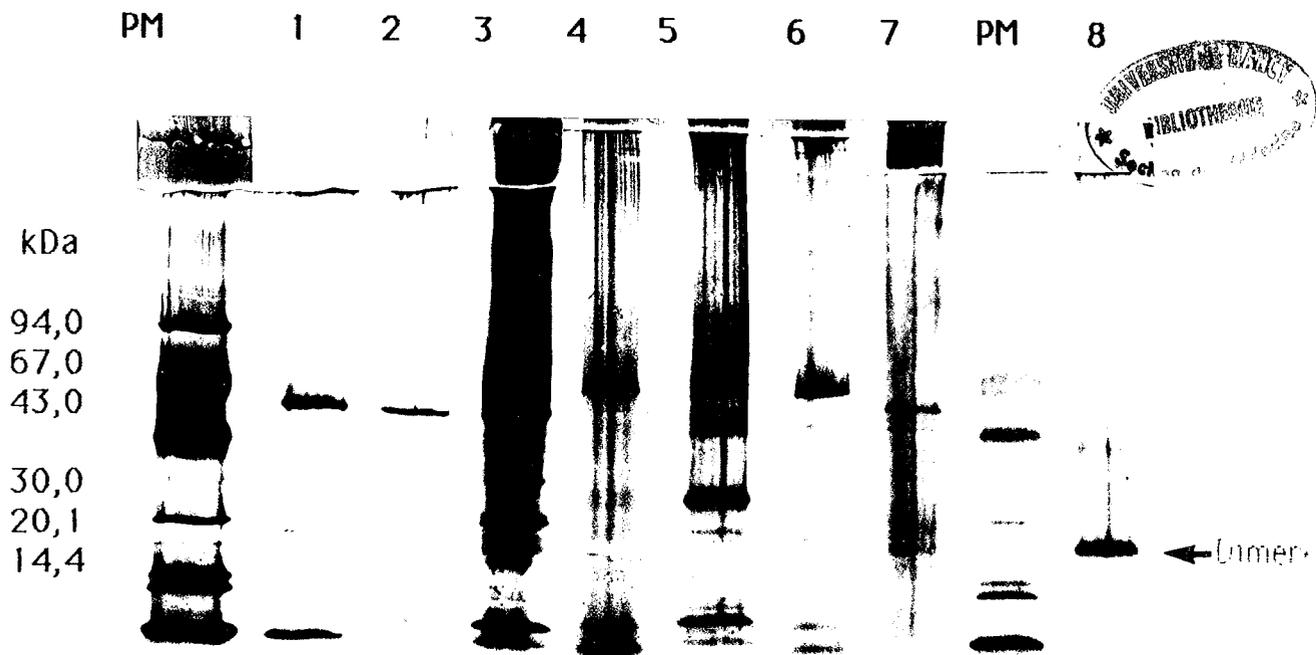


Figure 34 : Analyse SDS-PAGE (gradient 8-25%) avec coloration argentique de différentes préparations de TGF- β 1 immunopurifié. Les échantillons des fractions testées ont été dialysés contre une solution d'acide acétique 1 M et lyophilisés. Ces fractions correspondent à l'immunopurification de TGF- β 1 à partir de .

- Extrait neutre activé . **1** : élution NaCl 1 M en PBS ; **2** : élution glycine 0,05 M, NaCl 0,15 M, pH 2,3 ; **3** : élution thiocyanate de sodium 3 M en acétate de sodium 0,1 M, pH 6
- Extrait de Cone : **4** : élution classique ; **5** : élution des protéines non spécifiquement adsorbées ; **6** : élution après pré-adsorption non spécifique
- Elution de la fraction après précipitation au sulfate d'ammonium et activation . **7**
- Fraction TGF- β 1 (flèche) après filtration sur Biogel P-60 fine . **8** (fraction sans BSA et avant immunopurification)

DISCUSSION

I Méthodes de dosage du TGF- β 1

L'importance du dosage du TGF- β au cours d'une purification a déjà été évoquée dans l'introduction, au chapitre 3.2.1 "Essais biologiques".

Le dosage biologique, type stimulation de croissance cellulaire (incorporation de thymidine tritiée, donc radio-activité modérée) est courant du fait qu'il ne nécessite pas l'emploi de protéine-réactif purifiée (de coût souvent élevé et de conservation plus ou moins aisée) et en quantité non négligeable comme dans le cas de dosage par fixation au récepteur cellulaire avec compétition vis à vis d'une molécule radiomarquée ou dosage immunologique type RIA (utilisation de matériel fortement radio-actif et onéreux).

La signification de ces divers types de dosage est **différente et complémentaire**. Une méthode type RIA permet donc le dosage de l'antigène. Le dosage par fixation compétitive au récepteur permet d'évaluer la fonctionnalité structurale de la molécule. Le dosage biologique quantifie la fonctionnalité biologique de la molécule mais il représente l'évaluation d'un ensemble de processus. L'incorporation de thymidine tritiée, par exemple, est l'aboutissement d'une cascade d'évènements ayant lieu à partir de la fixation du facteur de croissance à son récepteur.

Il est à noter qu'un ensemble de facteurs intervient au cours de ces processus durant l'incubation des cellules avec l'échantillon. Il peut y avoir une toxicité de l'échantillon, protéolyse, sécrétion propre du facteur dosé et d'autres facteurs de croissance, potentialisation ou antagonisme d'effets ... Jullien et coll. (1989, 88) ont montré que l'exposition d'échantillons TGF- β latent à pH 5 pendant 2 h entraîne une certaine activation du TGF- β ainsi qu'une augmentation de sensibilité des cellules à l'EGF dans un essai de croissance en agar semi-solide. Une protéine sérique (2-4 mg/ml) et plaquettaire (333 μ g/10. 11 plaquettes ; Schmaier 1985, 163), l' α 2-macroglobuline, pourrait jouer un rôle important dans la modulation des effets de facteurs de croissance. En effet, cet inhibiteur de protéases peut "fixer" des peptides bio-actifs (tels les facteurs de croissance) et servirait d'agent de clearance à partir de la circulation, via son endocytose par des cellules cibles à récepteur α 2-macroglobuline. La fixation de TGF- β 1 radiomarqué au récepteur cellulaire est inhibée avec une ED50 de 200 μ g/ml d' α 2-macroglobuline tandis qu'il n'y a pas influence sur l'inhibition d'incorporation de thymidine tritiée par les cellules CCL64 à une concentration de 200 μ g/ml (Danielpour et Sporn 1990, 40).

La spécificité des dosages par fixation compétitive au récepteur cellulaire ou type immunologique est bien supérieure à celle d'un dosage biologique.

Il faut donc bien garder à l'esprit ces éléments pour **interpréter la concentration dosée** ou ce qu'il est possible d'appeler la "concentration d'activité TGF- β 1". D'ailleurs, déjà Assoian et coll. (1983, 6) abordent ce point

en soulignant que l'activité biologique TGF- β dosée est modulée par les autres facteurs de croissance présents dans l'essai. Les auteurs indiquent également que le dosage biologique est cent fois plus sensible qu'une électrophorèse avec coloration argentique. Van den Eijnden-Van Raaij et coll. (1988, 186) indiquent qu'un test biologique trop sensible donne lieu à une zone d'activité biologique trop "étalée" sur un chromatogramme

Un autre point important concerne la **protéine étalon**. En effet, les propriétés hydrophobes et les difficultés de quantification du TGF- β amènent à des réserves quant à la validité des étalons commercialisés. Le texte de la notice accompagnant un échantillon de TGF- β 1 humain d'origine plaquettaire délivré par R & D systems (commercialisation par British Bio-technology, reproduite dans les matériels et méthodes au chapitre 1.1 "Les facteurs de croissance") introduit les précautions de reconstitution quantitative, de conservation, mettant en garde l'utilisateur de l'extrême hydrophobicité de la molécule. Ensuite, intervient la protéine en tant qu'activité biologique. Le test biologique d'induction de croissance de cellules (AKR-2B et NRK-49F) en agar semi-solide est cité avec les ED50 des préparations de TGF- β purifiée respectivement de 1 ng/ml (40 pM) et 0,1-0,2 ng/ml (4-8 pM) « Ces valeurs doivent être prises en considération à titre indicatif pour des expériences initiales, puisque les réponses à ce facteur de croissance varieront selon les conditions expérimentales et le type cellulaire étudié ». La validité de l'étalon TGF- β 1 va dépendre :

- de la quantité 1 μ g de protéine TGF- β 1
- de la qualité de la reconstitution et de la conservation
- du dosage pour lequel l'étalon sera utilisé (dosage biologique sous la dépendance des conditions expérimentales et du type cellulaire utilisé)

La quantité 1 μ g de protéine TGF- β 1 doit donc être considérée comme 1 μ g d'activité biologique TGF- β 1. Si cet étalon est utilisé en dosage type fixation compétitive au récepteur cellulaire, la fonctionnalité biologique de la molécule devra se reporter logiquement à sa fonctionnalité structurale. Dans un dosage immunologique, la quantité 1 μ g de protéine TGF- β 1 sera considérée comme 1 μ g d'antigène TGF- β 1. Ces observations portent à réflexion et doivent être gardées à l'esprit dans la quantification du TGF- β 1.

Les précautions de manipulations des échantillons TGF- β 1 (hydrophobicité, présence de BSA, pH acide) étant prises, la levée de la latence (activation, et son maintien) de l'activité TGF- β 1 est un autre point important. L'extraction par la méthode d'Assolan et la dialyse contre une solution d'acide acétique 1 M sont très efficaces mais demandent un matériel, une méthodologie appropriés et un volume d'échantillon suffisant. L'acidification transitoire (HCl

puis NaOH) est la méthode la plus utilisée avec quelquefois une précipitation gênante des protéines. La possibilité de réversibilité (temps et concentration dépendante) de l'activation a clairement été démontrée pour du TGF- β 1 recombinant (SLC) mais pour ce qui concerne le L-TGF- β 1, seule une réversibilité partielle a été observée (Wakefield et coll. 1989, 192). La chaleur (5 min à 80°C) a été utilisée par Brown et coll. (1990, 18) sur les TGF- β 1,2 et 3 recombinants (SLC). Enfin, une méthode originale de co-précipitation (BSA/TGF- β) par le TCA 2,5% des échantillons contenant une concentration protéique inférieure à 1 mg/ml (ou équivalente à 2% de serum) a été décrite par Danielpour et coll. (1989, 39).

Cet ensemble de remarques est à considérer pour une interprétation plus "sereine" et "relative" des résultats de dosage du TGF- β 1 dans un milieu biologique complexe

1.1 Induction de la croissance de cellules NRK-49F en agar semi-solide

Ce test biologique permet le dosage de concentration de TGF- β 1 de 0,03 à 0,3 ng/ml (1,2 à 12 pM). L'ED50 se situe à une concentration de 0,17 ng/ml (6,8 pM) en accord avec la valeur couramment admise pour la lignée utilisée (0,1 à 0,2 ng/ml ou 4 à 8 pM). **La réalisation du test est assez délicate et lourde** (temps et coût matériel). En effet, les cellules doivent être cultivées avec soin (nombre de passage limité pour éviter un vieillissement de la lignée) en milieu additionné de SVFN et ne jamais atteindre l'état de confluence. De même, leur exposition trop prolongée à 43°C peut avoir une influence non négligeable sur l'efficacité de clonage et donc la qualité du dosage. Le lot du SVF utilisé dans le test doit être choisi pour induire, en présence de TGF- β 1 et d'EGF, le maximum de colonies cellulaires par rapport à un essai sans TGF- β 1. Il est souhaitable d'utiliser ce même lot pour la totalité des tests de façon à harmoniser au mieux les dosages. L'addition de SVF 10% est un inconvénient du fait de la complexité induite du milieu biologique, s'ajoutant aux divers éléments de l'échantillon dosé. La durée d'incubation (14 jours) est un autre inconvénient car un titrage est souvent nécessaire avant le dosage proprement dit. Le nombre d'essai est limité du fait de la lourdeur de la mise en oeuvre. Le test en plaque vingt quatre puits est alors une alternative. Le comptage automatique des colonies par analyse d'image est un avantage d'aisance, de rapidité et de qualité de mesure du fait du seuil de comptage précis, du nombre de scrutations et de l'analyse mathématique. Mais l'analyse d'image implique un réglage manuel et artificiel de l'appareil, se repercutant directement sur le comptage, qu'il faut prendre en considération. Les témoins et la gamme d'étalonnage prennent alors toute leur importance.

1.2 Fixation compétitive de TGF- β 1 radiomarqué au récepteur cellulaire

Le radiomarquage efficace et rapide du TGF- β 1 par l'iode 125 selon la méthode de Frolik et coll. (1984, 59) ne pose pas de problème. La préparation des réactifs doit être soigneuse surtout pour ce qui concerne la solution de chloramine T réalisée au dernier moment en tampon phosphate de sodium. La grande radio-activité mise en jeu et la péremption relativement rapide de l'iode 125 sont des inconvénients de cette méthode de dosage **très spécifique**. La préparation des cellules est aisée. Le tapis cellulaire de la lignée NRK-49F a tendance à se décrocher et l'utilisation d'un revêtement de gélatine permet de pallier ce problème. Le dosage est simple, rapide. Des concentrations de TGF- β 1 de 0 à 5 ng/ml (0 à 200 pM) avec une ED₅₀ de 2,6 ng/ml (104 pM) sont quantifiables.

1.3 Inhibition de l'incorporation de thymidine tritiée par les cellules CCL64

Ce test biologique simple est un des plus spécifiques pour le dosage biologique du TGF- β (formes β 1 et β 2). La culture aisée des cellules et la faible proportion de SVF utilisée sont des avantages ainsi que la **rapidité de titrage et de dosage**. Il a été démontré que d'autres facteurs de croissance présents dans les échantillons (IGF-I et II, PDGF, EGF et FGF) n'alteraient pas l'inhibition de synthèse d'ADN induite par le TGF- β (Jennings et Mohan 1990, 87). Des concentrations de TGF- β 1 de 0,1 à 0,6 ng/ml (4 à 24 pM) sont quantifiables avec une ED₅₀ de 0,24 ng/ml (9,6 pM). La dérive de l'ED₅₀ traduit nettement un vieillissement de la culture. Cone et coll. (1988, 36) qualifient cet essai biologique de simple, rapide, reproductible et quantitatif. Leur valeur d'ED₅₀ ($p < 0,01$) se situe à 0,2 ng/ml (8 pM) de TGF- β 1.

2 Obtention d'anticorps polyclonaux anti-TGF- β

Un des buts de ce travail était d'**expérimenter la chromatographie d'immuno-affinité dans la purification de TGF- β 1**. Il était donc essentiel d'obtenir des anticorps poly- ou monoclonaux anti-TGF- β 1. Devant les difficultés d'obtention de TGF- β 1 de haute pureté et en quantité non négligeable, l'alternative de produire des anticorps anti-TGF- β 1 par le biais d'un peptide synthétique fut envisagée. En effet, ces anticorps anti-peptide synthétique ont de nombreuses applications dont la caractérisation de produit de gène, la localisation subcellulaire d'une protéine, l'étude structure/fonction, l'immunopurification, la mise au point d'un test ELISA et les vaccins synthétiques. Il faut savoir que les structures antigéniques ont un nombre restreint de conformations alors que les peptides en possèdent de nombreuses,

nombreuses, en équilibre et que les extrémités des chaînes sont connues comme de bonnes régions antigéniques comparées aux régions internes (Walter 1986, 195). La **difficulté de production d'antisérum à fort titre en anticorps anti-TGF- β** a été rapportée à de nombreuses reprises (Roberts et Sporn 1990, 153). La conservation du TGF- β parmi les différentes espèces doit certainement contribuer à cette difficulté. Dans un premier temps, la simplicité et surtout la rapidité d'obtention désirée nous a orienté vers la production d'anticorps polyclonaux (déjà décrite) par rapport à celle d'anticorps monoclonaux générés par une technique plus pointue et surtout, plus longue.

2.1 Prédiction d'épitopes continus – Choix d'un peptide synthétique

Van Regenmortel et de Marcillac (1988, 189) ont réalisé une évaluation des méthodes de prédiction des épitopes continus des protéines à partir de leur structure primaire. Un **épitope continu** (environ six à neuf résidus) est défini comme une séquence d'acides aminés reliés directement par liaison peptidique. En pratique, il correspond plutôt à un fragment peptidique linéaire d'une protéine réagissant avec des anticorps dirigés contre cette protéine native. Les liaisons entre peptide "épitope continu" et ces anticorps sont faibles, ce qui signifie qu'en réalité, un épitope continu représente certainement une partie d'un épitope discontinu. Les épitopes les plus fréquents sont les épitopes discontinus. Il faut également noter que la séquence dite épitope ne représente qu'une appréciation correspondant assez mal à la structure tridimensionnelle de l'épitope moléculaire. Cette observation est encore plus marquée lorsque la protéine est polymérique (structure quaternaire). Les différentes méthodes de prédiction antigénique sont surtout basées sur des notions d'**hydrophilicité/hydrophobicité**. Une des règles en ce domaine est que les acides aminés hydrophobes ont tendance à être enfouis à l'intérieur des protéines globulaires tandis que les chaînes latérales hydrophiles ont tendance à se trouver à l'extérieur où elles peuvent interagir avec l'eau. Pour ce qui concerne les structures hélice α /feuillet β , les centres des grandes hélices et des feuillets correspondent à des coeurs hydrophobes compacts, en opposition aux boucles de surface hydrophiles. La notion d'**accessibilité de surface** est appelée **acrophilicité**. La **mobilité de segment** correspond à des informations obtenues par RMN : les facteurs de température atomique (facteurs B ou de Debye-Waller). Il s'agit du degré de mobilité existant le long de la chaîne polypeptidique (Van Regenmortel 1986, 187 ; 188 ; 1988, 189). Les huit méthodes étudiées par Van Regenmortel et de Marcillac (1988, 189) ont été appliquées au TGF- β 1 tout en prenant en compte, plus particulièrement, trois échelles dont les auteurs concluent à la plus grande efficacité, en appliquant un seuil de +0,7 fois l'écart type de l'étude statistique :

- l'hydrophilicité de Parker et coll. (1986, 137)
- la mobilité de segment de Karplus et Schulz (1985, 91)
- le feuillet β inversé de Garnier et coll. (1978, 60)

Les résultats de cette étude de prédiction d'épitopes continus nous a indiqué que la **région C terminale** était très favorable, en particulier les résidus N° 95 à 99. La lysine est prédominante parmi les acides aminés trouvés "épitopes continus". A la même période que cette étude, Flanders et coll. (1988, 54) publiaient des résultats concernant l'utilisation de plusieurs peptides correspondant à diverses régions du TGF- β dans la production d'anticorps polyclonaux. Ceux-ci confortaient le choix de la région C terminale, à savoir que pour le peptide P 78-109, les résultats indiquaient que :

- **la première moitié C terminale du monomère est plus exposée dans la forme native et contribue directement ou non à la fixation au récepteur**
- **la partie C terminale est l'épitope majeur impliqué dans la genèse d'antisérum bloquant contre le TGF- β natif**

Encadrant l'épitope continu des résidus N° 95-99, la séquence acides aminés N° 91-106 fut choisie. Une cystéine en position N°90 (en place d'une tyrosine) permet d'avoir deux sites de couplage différents : cystéine N°90 et tyrosine N°91. Le peptide utilisé (**C-91-106**) pour l'immunisation a été couplé à l'ovalbumine par la tyrosine (C-91-106-OVA).

La recherche d'homologie de séquence primaire du peptide C-91-106 parmi les différentes protéines dont la séquence connue est enregistrée dans la banque de données SwissPROT n'a démontré que des homologies notables (compte tenu de la taille du peptide > 40%) avec les différentes formes (1-5) de TGF- β mais pas de résultats positifs pour les différentes formes d'actine et de myosine.

2.2 Immunisation - Production des antisérums

Différentes doses de peptide conjugué à l'ovalbumine ont été injectées aux lapins par voie intradermique ou intramusculaire. Le protocole d'immunisation a été établi selon l'expérience du laboratoire en ce domaine. Le suivi de l'état d'immunisation des animaux a été effectué par test ELISA vis à vis du peptide en raison de la simplicité et la rapidité du test. Il est intéressant de constater, tout d'abord, une réactivité significativement décroissante des anticorps respectivement pour le peptide, le TGF- β 1 réduit et le TGF- β 1 natif (ED₅₀ correspondantes : $1/1,6 \cdot 10^5$; $1/7 \cdot 10^2$; $1/4 \cdot 10^2$). La réactivité plus prononcée des anticorps pour la protéine monomérique démontre, peut être, une meilleure accessibilité de l'épitope après réduction.

Le titrage des antisérums de la première saignée montre que l'injection intramusculaire de 500 μ g de conjugué permet d'obtenir le meilleur résultat d'immunisation (ED₅₀ et absorbance maximale). L'étude du "pool" de vingt trois saignées (correspondant au "pic" d'immunisation) permet de constater que des doses de 100-500 μ g de conjugué (voie ID ou IM) correspondent à des

absorbances maximales mais qu'une première injection de 1000 μg de conjugué permet d'obtenir une valeur d'ED₅₀ maximale. Il ne s'agit cependant pas de conclure à une dose plus efficace qu'une autre car l'expérience a porté sur un lapin par dose et l'échelle des doses est réduite, la réponse immunitaire étant particulière à chaque animal. Les ED₅₀ maximales observées (ELISA vis à vis du peptide) pour les dix premières saignées sont assez élevées et satisfaisantes pour les quatre lapins. Il est à noter que l'injection de TGF- β 1 purifié au laboratoire (méthode de Cone) entraîne une faible "ré-immunisation" peut être due à la dose trop faible ou à la qualité de la préparation.

2.3 Caractérisation des antisérums

2.3.1 ELISA

La méthode ELISA choisie est une détection immunologique de l'antigène sur phase solide. Les protéines de revêtement se trouvent donc adsorbées sur le support et cela entraîne des modifications de conformation qu'il ne faut pas ignorer.

Les anticorps montrent une réactivité très différente vis à vis du peptide couplé à l'ovalbumine ou à la BSA. Les ED₅₀ correspondantes sont de $1/8,3 \cdot 10^5$ et $1/4,1 \cdot 10^4$ (peptide : $1/7,3 \cdot 10^3$). Cette observation est à prendre en considération pour ce qui concerne l'immunopurification des anticorps mais la différence de réactivité des anticorps vis à vis des deux conjugués peut s'expliquer par le fait qu'il existe des anticorps anti-ovalbumine puisque c'est ce conjugué qui a servi à l'immunisation.

2.3.2 Immunoblotting

L'immunoblotting est une autre méthode de détection immunologique de l'antigène sur phase solide. L'utilisation d'antisérum est plus aisée que celle d'anticorps purifiés. Le seuil de détection du TGF- β 1 natif a été estimé (pour un antisérum dilué au 1/10) à 5-10 ng. Cela est satisfaisant au regard des résultats de la littérature. Les tests de blocage des anticorps avec un excès d'antigène (peptide ou TGF- β 1 natif) permet de confirmer la spécificité de détection. Le blocage est total avec le peptide mais partiel avec le TGF- β 1 natif. Or, l'étape de blocage est une réaction antigène/anticorps en phase liquide. Il est possible que les conditions de réalisation ne soient pas optimales à cette réaction anticorps/TGF- β 1 : phase liquide, dilution de l'antisérum au 1/10, excès d'antigène natif, incubation 1 h à température ambiante puis une nuit à 4°C.

2.4 Purification des anticorps

La purification des anticorps est utile pour plusieurs de leurs utilisations où la présence d'autres protéines sériques est gênante (tests biologiques, bruit

de fond en IED et Immunohistochimie) ou n'est pas possible (immunopurification).

La chromatographie d'affinité, lorsqu'elle est possible, représente la méthode de choix. La chromatographie d'affinité sur protéine A permet la purification rapide et très spécifique des IgG de lapin mais il ne s'agit pas que d'anticorps spécifiques. La chromatographie d'immuno-affinité est alors la plus adaptée par sa spécificité.

Dans notre cas, le ligand de choix aurait été l'antigène natif, c'est à dire le TGF- β 1. Il est bien évident que les quantités nécessaires sont trop importantes. Le problème a été contourné par utilisation du peptide synthétique ayant généré les anticorps (conjugué ovalbumine) mais couplé à une autre protéine (BSA). L'immuno-affinité sur peptide couplé a été préférée à celle sur peptide libre de façon à "reconstituer" au mieux l'antigène synthétique pour purifier les anticorps spécifiques du peptide (du TGF- β 1) en conformation aussi proche que possible de celle d'immunisation mais pas les anticorps anti-protéine conjuguante. Il est à noter que la réaction antigène/anticorps se déroule, ici encore, sur phase solide.

Une notion de sélection des anticorps spécifiques doit alors être prise en considération. En effet, il n'est pas certain que les anticorps anti-peptide conjugué à l'ovalbumine vont "reconnaître" qualitativement et quantitativement le peptide conjugué à la BSA (voir les résultats au chapitre 2.3.1 "ELISA"). Cette remarque serait également valable pour le ligand TGF- β 1. Le problème de la sélection d'anticorps est mis en évidence pour la chromatographie d'affinité sur protéine A - Sepharose. L'ED₅₀ (ELISA vis à vis du peptide) de l'effluent d'une injection d'antisérum (peu conséquente par rapport à la capacité théorique du support) est relativement élevée en comparaison de l'ED₅₀ de cet antisérum et de l'éluat. Ceci pourrait signifier qu'il existe une fraction anticorps spécifiques non IgG. Ce problème n'a pas été mis en évidence pour la chromatographie d'immuno-affinité. Pourtant, l'absence ou la faible capacité d'inhibition des activités biologiques TGF- β 1 par les anticorps immunopurifiés pourrait en constituer le reflet.

Le rendement de fixation du peptide conjugué à la BSA sur Sepharose est assez faible (49%) par rapport aux rendements habituels observés pour cette méthode d'activation au bromure de cyanogène (supérieurs à 90%). Le support d'immunopurification obtenu permet de purifier des quantités d'environ 2,4 mg d'anticorps par injection de 30 ml d'antisérum. L'analyse SDS-PAGE avec coloration argentique de ces anticorps permet d'en apprécier la pureté satisfaisante et de supposer leur identité IgG (PM évalué à 125 kDa sur un gradient peut être mal approprié).

2.5 Inhibition des activités biologiques du TGF- β 1 *in vitro* par les antisérums et les anticorps

La même remarque concernant la réaction antigène/anticorps en phase liquide peut être faite à ce niveau. Mais il est à noter que la gamme de dilution

des anticorps (antisérum et anticorps immunopurifiés) par rapport à la gamme de concentration du TGF- β 1 des différents essais est tout de même plus étendue.

L'utilisation d'antisérum est gênante du fait de la complexité (induite) du milieu et de son influence sur les tests biologiques (présence d'autres facteurs de croissance, d' α 2-macroglobuline ...). Un effet stimulateur sur la croissance en agar semi-solide des cellules NRK-49F est observé malgré la proportion de 10% de SVF déjà utilisée. La présence d' α 2-macroglobuline peut gêner la fixation du TGF- β 1 radiomarqué au récepteur. L'addition d'antisérum peut être tout aussi gênante dans le test d'inhibition d'incorporation de thymidine tritiée par les cellules CCL64 du fait, cette fois, de la faible proportion de SVF utilisée.

D'ailleurs, la réalisation de témoins négatifs antisérum ou anticorps immunopurifiés a été préférée aux témoins habituels sérum pré-immun ou anticorps purifiés et aspécifiques pour mieux cerner l'influence directe de ces anticorps spécifiques sur les tests (sauf pour la fixation de TGF- β 1 radiomarqué). Une gamme très large d'anticorps immunopurifiés a été expérimentée du fait de l'utilisation d'anticorps spécifiques (immunopurifiés) en place d'IgG.

2.6 Utilisation des antisérums en immuno-électrodiffusion

Cette méthode de détection et de quantification potentielle du TGF- β 1 a été développée en raison de sa rapidité de réalisation et du besoin de quantification antigénique du facteur de croissance. La microtechnique a d'emblée été privilégiée du fait de la faible consommation d'antisérum et d'échantillon. La mise au point des conditions opératoires de cette technique a été longue puisque des proportions d'antisérum de 1 à 25% dans le gel ont été expérimentées ainsi que diverses combinaisons des paramètres d'électrophorèse. Finalement, une proportion de 25% d'antisérum est nécessaire et les conditions d'électrophorèse sont celles décrites par le fabricant, à savoir 20 V/cm et à 15°C. Des extraits plaquettaires neutres (témoin négatif) et activés (essai) ont été appliqués à différentes dilutions décimales. La mise en évidence de trois fusées superposées pour les échantillons neutres (dont les hauteurs sont proportionnelles à la dilution de l'échantillon) et d'une seule pour les échantillons activés souleva la possibilité de mise en évidence d'un antigène hétérogène décrit par Laurell (1972, 103). Une hypothèse séduisante serait de se référer à la structure du complexe latent de haut PM (décrite dans l'introduction au chapitre 3.5 "Les formes latentes"). Les trois immunoprécipités pourraient correspondre au LLC, au SLC et au TGF- β 1. En effet, ces trois éléments TGF- β 1 pourraient être présents ou produits dans l'extrait neutre. Le fait que le L-TGF- β 1 n'est pas "reconnu" en immunoblotting paraît alors contradictoire. Des échantillons de SLC recombinant et L-TGF- β 1 purifié n'ont pas vraiment aidé à la compréhension du phénomène. Deux précipités sont visibles pour les échantillons activés. Il est à noter que le TGF- β 1 (en présence ou non de BSA, PEG) et le peptide ne donnent pas naissance à un immunoprécipité visible. Le

peptide conjugué à l'ovalbumine ou la BSA peut être considéré comme un antigène hétérogène artificiel. Seul, le conjugué ovalbumine permet l'obtention de plusieurs fusees (quatre) dont un immunoprécipité intense correspondant certainement à des anticorps anti-ovalbumine.

L'interprétation de ce phénomène est vraiment délicate et de nouveaux éléments expérimentaux n'ont pu être produits. La notion de quantification peut être exprimée dans le cas d'un extrait neutre après définition d'une échelle étalon arbitraire. Mais la nature exacte et la signification de la hauteur des trois immunoprécipités observés restent une question.

Une autre difficulté d'interprétation a été l'important bruit de fond observé dû à la forte proportion d'antisérum. Les immunoprécipités sont fins et la projection des gels est réellement utile. L'enrichissement et la purification des anticorps par différentes méthodes n'a pas amélioré le résultat. Les anticorps immunopurifiés permettent une certaine diminution de ce bruit de fond mais les immunoprécipités obtenus sont flous. Un "lavage" prolongé du gel semble bien plus efficace.

2.7 Utilisation des anticorps spécifiques en immunohisto- ou -cytochimie

L'utilisation des anticorps anti-C-91-106 permet de mettre en évidence un marquage reproductible, observé dans le cas du tissu musculaire lisse ou plutôt dans le cas de "cellules à actine". En effet, les cellules musculaires lisses de la prostate et des vaisseaux, les péricytes vasculaires, les cellules myo-épithéliales des glandes mammaires sont des cellules contractiles et dont un des éléments de structure est l'actine (ou la myosine). Le marquage ponctiforme, ordonné, observé pour les cellules musculaires lisses en culture laisse entrevoir la possibilité de la détection de TGF- β ou d'une protéine associée à des structures fibrillaires de ces cellules. Le tissu musculaire lisse "cancéreux" (leiomyosarcome) n'est pas révélé ainsi que le tissu musculaire strié. Les témoins négatifs (sans anticorps primaire anti-C-91-106-OVA ou avec IgG de lapin) sont de bonne qualité. La recherche d'homologie de séquence du peptide C-91-106 n'a pas révélé de résultats en rapport avec ces deux protéines, actine et myosine. Le test d'immunoblotting sur milieu conditionné et extrait cellulaire de cellules musculaires lisses en culture n'a pas mis en évidence de reconnaissance antigénique non spécifique. Ces résultats amènent à se poser des questions sur ce marquage qui ne semble pas être non spécifique. Bien sûr, il s'agit de résultats préliminaires demandant des investigations plus poussées (une étude immunohistochimique par microscopie électronique est envisagée ainsi que l'utilisation d'autres anticorps). D'ailleurs, le marquage intracellulaire TGF- β des mégakaryocytes médullaires n'a pu être démontré que dans un cas de PBO (le processus de décalcification pourrait être trop agressif). De même, les frottis plaquettaires n'ont pas permis de démontrer un immunomarquage significatif de ces éléments alors qu'ils représentent la source la plus concentrée de TGF- β 1. La qualité des frottis n'est pas

satisfaisante ainsi que les résultats immunocytochimiques vraiment médiocres. Ici aussi, la microscopie électronique serait utile

Plusieurs publications font état de la production d'anticorps (essentiellement polyclonaux) anti-TGF- β par immunisation avec un peptide synthétique ou la molécule native.

Roberts et coll. (1986, 150) ont immunisé des lapins par injections de 100 μ g de TGF- β 1 humain d'origine plaquettaire (pureté > 98%) couplé à la KLH. Les IgG ont été purifiées par chromatographie d'affinité sur protéine A - Sepharose. Ces anticorps ont démontré leur effet inhibiteur sur la fixation du TGF- β 1 au récepteur et sur l'induction de croissance de cellules NRK en agar semi-solide. De même, une concentration de 40 μ g/ml en IgG bloque 89 et 59% de l'activité TGF- β (1,25 ng/ml ou 50 pM) plaquettaire et d'un milieu conditionné de lymphocytes T tonsillaires dans un essai de synthèse de collagène *in vitro* (incorporation de proline tritiée).

Cheifetz et coll. (1987, 29) décrivent la préparation d'antisérum de lapin anti-peptides synthétiques (résidus N terminaux N°21-38 et C terminaux N°64-91) après couplage à la KLH (300 μ g en injections sous-cutanées) et leur utilisation pour une détection sélective de TGF- β 1 (négative pour le TGF- β 2) en immunoblotting.

Une étude très complète de Keski-Oja et coll. (1987, 95) a été réalisée sur des anticorps polyclonaux de lapin obtenus après immunisation avec du TGF- β porcin ou humain, natif ou dénaturé (chaleur, réduction, polymérisation ou inclusion en gel de polyacrylamide ; rappels de 2-5 μ g de TGF- β en PBS). Un immunoblotting a permis de démontrer une réaction positive chez tous les animaux à une dilution de 1/500 ou plus. Trois lapins /douze ont produit des anticorps d'une assez haute affinité pour leur utilisation en immunoprécipitation. Tous les lapins producteurs d'anticorps précipitants (bloquants) ont été immunisés avec du TGF- β natif. Un dosage RIA a été développé. Les anticorps ont été purifiés par chromatographie d'affinité sur protéine A - Sepharose. La fixation de TGF- β radiomarqué est inhibée par les IgG purifiées, de même que l'inhibition par le TGF- β de la prolifération de cellules AKR-2B induite par la combinaison insuline/EGF. Les auteurs pensent que cet effet inhibiteur des anticorps peut être dû à leur fixation au TGF- β cellulaire puisqu'il se produit également lorsque les anticorps sont utilisés seuls. Cette remarque est en relation avec l'effet antagoniste des anticorps sur l'inhibition d'induction de croissance de cellules A549 en agar semi-solide. Des concentrations élevées (30 μ g/ml) en anticorps se sont même révélées stimulatrices. Pour démontrer que le TGF- β cellulaire (endogène) pouvait stimuler (stimulation autocrine) la croissance des cellules AKR-MCA en agar semi-solide, des IgG anti-TGF- β (porcin) ont été incorporées à l'essai. Cela se vérifia et l'addition de TGF- β exogène a démontré son effet antagoniste sur ces

mêmes anticorps. Il est également signalé que ces anticorps ont inhibé les propriétés chimiotactiques du TGF- β .

Ellingsworth et coll. (1988, 52) ont utilisé avec succès des anticorps polyclonaux de lapin anti-TGF- β 1 (Injection intramusculaire de 100 μ g de TGF- β 1) dans plusieurs tests d'activité TGF- β . Le titrage des antisérums a été effectuée par ELISA vis à vis du TGF- β 1 (1/8,1. 10⁴). Un effet inhibiteur des anticorps a été observé dans le test d'inhibition par le TGF- β 1 de la prolifération de thymocytes stimulés par la combinaison IL-1/PHA. Des concentrations de 25 à 300 μ g/ml en IgG ont été efficaces pour inhiber une concentration de 5 ng/ml (200 pM) de TGF- β 1. La croissance de cellules NRK en agar semi-solide induite par 2 ng/ml (80 pM) de TGF- β 1 a été inhibée à 90% (et plus) par 30 et 300 μ g/ml d'IgG. De même, une inhibition de la fixation de TGF- β 1 iodiné aux cellules NRK et aux thymocytes a été rapportée.

Des anticorps polyclonaux de dindon anti-TGF- β 1 et 2, spécifiques de chaque forme, ont été obtenus par Danielpour et coll. (1989, 38) après immunisation par injections sous-cutanées et intra-musculaires (100 μ g de protéine native porcine). Après trois mois, les antisérums de trois animaux sur douze démontraient un titre (ELISA) suffisant pour bloquer l'inhibition d'incorporation de thymidine tritiée par les cellules CCL64 (2 μ g/ml d'anticorps purifiés par précipitations séquentielles au sulfate de sodium bloquent 50% de l'action de 0,25 ng/ml ou 10 pM de TGF- β 1 ; 15 μ g/ml, 100%). Immunoprécipitation et dosage RIA ont été développés. Le test d'immunoblotting (antisérum) permet la détection de 1 ng de TGF- β 1. La fixation au récepteur de 2,5 ng/ml (100 pM) de TGF- β 1 radiomarqué est complètement bloquée par l'antisérum dilué au 1/10³.

Par la suite, la même équipe a développé une méthode ELISA type sandwich (SELISA) en utilisant des anticorps polyclonaux neutralisants de dindon et de lapin (Danielpour et coll. 1989, 39). L'immunisation des lapins a été réalisée par co-injections sous-cutanées et intra-dermiques de 20 μ g de TGF- β 1 (ou β 2) porcine et d'ovalbumine, de STI et de KLH. Les antisérums ont été caractérisés pour leur capacité d'inhibition de la fixation de TGF- β iodiné (cellules A549), d'antagonisme de l'inhibition d'incorporation de thymidine tritiée par les cellules CCL64. Les anticorps ont été purifiés par chromatographie d'affinité sur protéine A - Sepharose ou TGF- β 1 - Sepharose. Des techniques d'immunoprécipitation, d'immunoblotting et de dosage RIA ont été développées. Rapidité, spécificité et précision caractérisent la technique SELISA qui permet la détection de 0,025-0,050 ng/ml (1-2 pM) de TGF- β . Ce qui en fait un dosage antigénique dix fois plus sensible que le RIA mais quatre fois moins sensible que l'inhibition de l'incorporation de thymidine tritiée par les cellules CCL64 (dosage biologique).

Enfin, l'étude de Flanders et coll. (1988, 54) a consisté en la production d'antisérum par immunisation (injections intradermiques) de lapins avec différents peptides (séquences centrales, N et C terminales) cyclisés et couplés

ou non (1-2 mg). Les anticorps ont été purifiés par chromatographie d'affinité sur protéine A - Sepharose ou sur peptide - Affi-Gel 10 (Biorad). Des techniques ELISA ($ED_{50} = 1/1,4 \cdot 10^3$ vis à vis du peptide ; $1/2 \cdot 10^3$ vis à vis du TGF- β 1), RIA, immunoblotting (détection de 10 ng de TGF- β 1), immunoprécipitation, inhibition de fixation au récepteur des cellules A549 (250 μ g/ml en IgG inhibent à 80% la fixation de 2,5 ng/ml ou 100 pM de TGF- β 1) et inhibition de la synthèse de collagène par les cellules NRK ont été expérimentées. Cette étude a permis de cerner l'importance de la région C terminale du TGF- β pour la fixation au récepteur et en tant qu'épitope majeur de la molécule native.

Les anticorps polyclonaux anti-TGF- β produits contre la molécule native sont visiblement les plus répandus et les anticorps neutralisants (bloquants) les plus performants. Il est difficile de comparer nos résultats à ceux de la littérature du fait qu'il s'agit d'anticorps anti-peptide synthétique (séquence C terminale du TGF- β 1). Malgré tout, si on se réfère au travail de Flanders et Coll. (1988, 54), les anticorps anti-C-91-106-OVA sont plutôt performants en immunoblotting. La détection par ELISA de l'antigène TGF- β 1 natif ou réduit ainsi que les effets inhibiteurs sur les propriétés biologiques du TGF- β 1 sont moins satisfaisants. A ce propos, des témoins négatifs sérum pré-immun/antisérum (seul) et anticorps non spécifiques/anticorps spécifiques (seuls) devraient être réalisés en parallèle. Il faut cependant rappeler, ici, que notre but était d'utiliser principalement ces anticorps en immunopurification du TGF- β 1. La possibilité d'une sélection d'anticorps par immunopurification sur C-91-106-BSA - Sepharose devrait être discutée après essai par rapport à des IgG purifiées par chromatographie d'affinité sur protéine A - Sepharose et des anticorps immunopurifiés sur TGF- β 1 - Sepharose.

La première étude immunohistochimique portant sur le TGF- β a été réalisée sur des tissus bovins, foetaux par Ellingsworth et Coll. (1986, 51). Des IgG dirigées contre un peptide synthétique dont la séquence correspond aux trente premiers acides aminés N terminaux du TGF- β ont permis de mettre en évidence un marquage des ostéocytes osseux ainsi que des chondrocytes du cartilage articulaire. Un marquage a également été démontré pour les mégakaryocytes et quelques cellules mononuclées de la moelle osseuse, les cellules souches, hématopoiétiques du foie foetal, les thymocytes des corpuscules de Hassall et quelques thymocytes médullaires du thymus, les cellules épithéliales en bordure des calices du rein. Par contre, un test négatif a été obtenu pour les cellules des glandes thyroïdes, adrénales et salivaires ainsi que pour l'aorte.

Flanders et Coll. (1989, 55) ont démontré que des anticorps dirigés contre un même peptide synthétique (N terminal du TGF- β 1) mais dont la synthèse correspond à deux préparations différentes permettent d'observer des

marquages différents. Un marquage principalement extracellulaire, similaire au marquage anti-fibronectine, suggère que le TGF- β extracellulaire pourrait être fixé aux protéines de la matrice. L'autre marquage, intracellulaire, similaire aux résultats obtenus avec d'autres anticorps dirigés contre un peptide C terminal du précurseur TGF- β 1 et contre un peptide C terminal du TGF- β 1, pourrait révéler les sites de biosynthèse.

Thompson et Coll. (1989, 181) ont utilisé ces mêmes anticorps (Flanders et Coll. 1989, 55) pour étudier divers tissus murins à l'état néonatal ou adulte. Un fort marquage intracellulaire a été observé dans le cortex adrénal, les mégakaryocytes et autres cellules de la moelle osseuse, les myocytes cardiaques, les chondrocytes, les tubules rénales distales, les cellules glandulaires ovariennes et les cellules du chorion placentaire. Pour ce qui concerne les mégakaryocytes, un marquage intracellulaire mais nucléaire est à noter. Il s'agit des noyaux multilobés des mégakaryocytes à un stade où les plaquettes ne sont pas encore visibles dans le cytoplasme. Un marquage de la matrice extracellulaire a été démontré pour le cartilage, le cœur, le pancréas, la peau et l'utérus. Le marquage est particulièrement intense dans les cellules spécialisées d'un tissu donné, suggérant que le TGF- β aurait un rôle bien précis dans ce tissu. Les auteurs ont également effectué une étude parallèle par Northern blotting, démontrant une faible corrélation entre l'expression d'ARNm TGF- β 1 et la présence de la protéine.

La même équipe (Thompson et Coll. 1988, 180) a souligné le rôle du TGF- β 1 lors d'infarctus du myocarde (expérimental chez le rat) en utilisant les anticorps "anti-TGF- β intracellulaire". Le marquage disparaît lentement après l'infarctus puis s'intensifie en bordure de la zone lésée. Une autre partie de l'étude a démontré un marquage intense des neurones des ganglions vagues et des cellules dans le nodule atrio-ventriculaire. Ces éléments semblent indiquer un rôle important du TGF- β dans la physiologie cardiaque et dans la réparation tissulaire.

L'association du TGF- β avec les glioblastomes est bien connue. Samuels et Coll. (1989, 162) ont rapporté la détection immunocytochimique de TGF- β pour les tumeurs bénignes et malignes mais pas pour le tissu normal, correspondant.

Ici encore, la comparaison de nos résultats (préliminaires) avec ceux de la littérature est assez délicate car les anticorps "habituellement" utilisés sont plutôt des anticorps anti-peptide synthétique de la région N terminale du TGF- β . De plus, Flanders et Coll. (1989, 55) ont démontré que des peptides de séquence identique mais dont la synthèse a fait l'objet de deux préparations différentes génèrent la production d'anticorps polyclonaux qui donnent des résultats totalement différents en immunohistochimie. Il peut s'agir d'un problème de conformations différentes du peptide. Néanmoins, ceci suggère que les résultats obtenus avec des anticorps donnés sont des résultats originaux qu'il faut interpréter et comparer en tant que tels. Cette remarque s'applique au cas des mégakaryocytes dont le marquage est décrit intracytoplasmique chez le fœtus

de boeuf par Ellingsworth et Coll. (1986, 51) et nucléaire chez la souris neonatale ou adulte pour Thompson et Coll (1989, 181). Ces mêmes auteurs (Thompson et Coll. 1989, 181) décrivent le marquage des myocytes cardiaques. Une étude plus complète (Thompson et Coll. 1988, 180) démontre un marquage TGF- β au niveau du myocarde chez le rat. Le tissu musculaire est donc étudié et révèle positif dans ces deux cas. L'association d'un marquage "TGF- β extracellulaire" avec un marquage de la fibronectine est décrite par Flanders et Coll (1989, 55). Ces mêmes auteurs pensent que des anticorps dirigés contre un peptide synthétique de la partie C terminale du TGF- β 1 pourraient mettre en évidence le "TGF- β intracellulaire" aux sites de biosynthèse. Ceci est intéressant par rapport à une association possible du marquage que nous observons pour les cellules musculaires lisses avec une protéine structurale de ces cellules : l'actine (ou la myosine).

3 Purification du TGF- β 1 humain d'origine plaquettaire

3.1 La source de TGF- β 1

Environ quatre à cinq mille concentrés standards de plaquettes humaines périmés seraient disponibles par an (relations privilégiées avec le C.R.T.S. de Nancy) pour la purification potentielle de facteurs de croissance. Il est à noter que **les plaquettes représentent la source de TGF- β 1 la plus concentrée de l'organisme.**

Les modifications morphologiques et biochimiques des plaquettes au cours de leur isolement et leur stockage entraînent, notamment, un relargage du contenu des granules alpha (Bode 1990, 13) contenant le PDGF et le TGF- β 1 ainsi que la β -TG, un des marqueurs de l'activation (sécrétion) plaquettaire (Steen et Holmsen 1987, 176). Compte tenu que sa concentration plasmatique est de 50 ng/ml, que les plaquettes humaines en renferment 17,7 mg/10⁹ plaquettes (Yardumian et coll. 1986, 202) et qu'un concentré standard contient environ 5 10¹⁰ plaquettes dans environ 50 ml de plasma, la concentration plasmatique, maximale, potentielle après activation totale, pourrait être de 17,7 mg/ml. Un dosage ponctuel a révélé une concentration de 13300 ng/ml. Donc, une faible activation faisant penser que la qualité des plaquettes, après conservation durant cinq jours, est tout à fait satisfaisante. Après une congélation/décongélation du concentré, la concentration est augmentée de 80% (24000 ng/ml) alors qu'un dosage de l'activité TGF- β 1 (inhibition de l'incorporation de thymidine tritiée par les cellules CCL64) démontre une augmentation de 11,5% (89 → 99 ng/ml). Cette remarque indicative permet d'introduire la **notion de qualité et de quantité pour la source utilisée** dans la purification de TGF- β 1 et autres facteurs de croissance plaquettaires.

Raines et Ross (1985, 142) ont rapporté que 90% de l'activité stimulatrice de la croissance et 70 à 90% du PDGF sont relargués dans le plasma des concentrés plaquettaires, humains, périmes, traités 24 à 72 h après leur collecte. Sekido et coll (1987, 165) ont démontré que l'activité PDGF est bien maintenue dans les concentrés plaquettaires conservés durant cinq jours. Assolian (1987, 7), comparant le nombre et la qualité des concentrés plaquettaires (culots lavés) mis en jeu dans sa méthode de purification du TGF- β 1, a souligné l'importance de la source (qualité et quantité) sur la quantité de TGF- β 1 purifié :

- 10 μ g/25 poches périmées
- 100 μ g/100 poches périmées
- 200 μ g/100 poches "fraîches"

Une purification sur un grand nombre de concentrés est donc souhaitable du fait d'un retentissement aussi important sur les quantités purifiées. Une des explications possibles à ce phénomène serait que les pertes de TGF- β , molécule très hydrophobe, au cours de sa purification se répercutent proportionnellement moins dans le cas d'un fractionnement plus important.

L'utilisation des culots plaquettaires, outre la diminution de volume et le gain de place pour stockage, présente l'avantage d'éliminer la dilution du facteur de croissance dans le plasma, milieu très riche en protéines (et notamment en α 2-macroglobuline), et donc une purification facilitée. Il est à noter que l' α 2-macroglobuline est considérée comme protéine de capture de l'excès de TGF- β au site d'action de ce facteur de croissance pour en limiter la zone d'action ainsi que sa forme de clearance probable. Sa présence est donc gênante ainsi que celle d'une proportion non négligeable de globules rouges dans les culots, du fait de la contamination en hémoglobine induite. L'hétérogénéité, la qualité et le volume des lots de concentrés sont à prendre en considération car leur influence sur les rendements de purification et la qualité des facteurs de croissance purifiés a été plusieurs fois décrite : Heldin et coll. (1987, 73) ; Cone et coll. (1988, 36) ; Strassman et coll. (1989, 177).

Les plaquettes sont des éléments très difficiles à "casser". Le choc osmotique en eau distillée ou la congélation/décongélation ne sont pas considérés comme satisfaisants (Baenziger et Majerus 1974, 10) mais du fait des volumes mis en jeu dans les méthodes de purification employées, l'utilisation d'autres techniques jugées plus efficaces (décompression dans une bombe à l'azote, sonication, homogénéisation, gradient de glycérol) n'est pas possible. Il est à noter que Assolian (1987, 7) décrit la congélation de culots plaquettaires dans l'azote liquide, sous forme de billes pour une homogénéisation rapide et efficace lors de l'extraction.

3.2 Purification du TGF- β 1 selon la méthode d'Assoian

Parmi les premières méthodes de purification du TGF- β 1 (forme active) publiées, la méthode (TGF- β 1 humain d'origine plaquettaire) décrite par Assoian et coll. (1983, 6) a constitué une base de travail pour ce projet. Celle-ci consiste en une extraction éthanol acide de culots plaquettaires lavés puis précipitation à l'éthanol/éther et deux étapes de filtration sur gel sur support de polyacrylamide tirant partie des interactions hydrophobes du TGF- β 1 (différentes en présence d'urée 8 M) vis à vis de ce support. Une étape additionnelle de dessalage-purification HPLC (Assoian 1987, 7) permet la purification finale du TGF- β 1 (pureté > 95%)

Pour ce qui nous concerne, la méthode a été appliquée avec un essai de chromatographie en phase inversée sur support FPLC C8/C1 (ProRPC, Pharmacia LKB Biotechnology)

Les lavages des culots plaquettaires ont parfois conduit à une activation (supposée) des plaquettes entraînant leur élimination et la remise en question de ces lavages lourds à mettre en oeuvre. La procédure de lyse - extraction n'a pas posé de problème, mise à part la manipulation délicate de gros volumes de solvants volatils, onéreux et nécessitant l'utilisation de matériels protégés non disponibles (éthanol et éther). Une alternative à la centrifugation (non protégée) de solvants serait la filtration sous vide, sur filtre papier, proposée par l'auteur. La première étape de filtration sur gel permet l'élimination de 95% des protéines injectées. Une forte contamination par des protéines de petit PM est à noter (SDS-PAGE). Cette première étape a été réalisée à 4°C pour limiter les phénomènes de diffusion. La position d'éluion du TGF- β 1 se situe à 18 kDa (la méthode originale la situe à 17 kDa). La seconde étape de filtration sur gel, en présence d'urée 8 M pour prévenir l'éluion retardée du TGF- β 1 et ainsi séparer le facteur de croissance des protéines de plus petit PM, permet d'améliorer significativement la qualité de la préparation (position d'éluion à 20 kDa alors que la méthode originale la situe à 25 kDa). Mais la nécessité d'une étape de purification finale est évidente. L'essai de chromatographie en phase inversée sur ProRPC HR 5/10 n'est pas concluant puisqu'une contamination par des protéines de petit PM persiste et une forte perte d'activité TGF- β 1 est à noter. Le bilan de purification est incomplet du fait de l'impossibilité de mesure de la concentration protéique dans la fraction phase inversée. Les quantités de TGF- β 1 évaluées dans l'extrait et la fraction filtration sur gel sont faibles (purification réalisée à partir de vingt cinq concentrés) et discordantes (rendement de 875%). Ceci est probablement lié au dosage de l'activité TGF- β 1 par induction de la croissance de cellules NRK-49F en agar semi-solide. La quantité de protéines obtenue à l'extraction (84 mg/vingt cinq poches) est plus faible que les résultats décrits (100 mg/25 g de plaquettes lavées). Il en va de même pour la quantité de TGF- β 1 dans la fraction filtration sur gel 1 (0,04 mg/100 mg de protéines contre 2,6 mg/100 mg de protéines. Les auteurs concluent à l'obtention de 10 μ g de TGF- β 1/vingt cinq poches en comparaison

avec 1,7 μg /vingt cinq poches dans notre travail. Le rendement final de purification a été évalué à 10,8%

3.3 Purification du TGF- β 1 selon la méthode de Cone

Après extraction à l'alcool acide des culots plaquettaires non lavés, la méthode de purification du TGF- β 1 (forme active) plaquettaire, humain, décrite par Cone et coll. (1988, 36) est basée sur une chromatographie d'échange de cations puis une chromatographie HPLC en phase inversée.

Cette méthode a été adaptée à une chromatographie d'échange de cations sur un support d'utilisation aisée et disponible au laboratoire : le COOH-Spheredex. La technique d'extraction alcool acide est tout à fait similaire à l'extraction de la méthode d'Assoian. Le fait que les culots ne soient pas lavés est un avantage ainsi que l'absence de la précipitation à l'éthanol/éther. Les auteurs soulignent le fait que la concentration en protéines de l'extrait dépend de l'importance de la contamination en globules rouges des culots. Une grande partie de l'hémoglobine est éliminée par ajustement du pH à une valeur de 5,5. L'évaporation rotative de l'éthanol n'a pas posé de problème et permet une diminution appréciable de volume ainsi que l'élimination des protéines alcoolo-solubles. Une étape additionnelle de dialyse contre le tampon d'équilibrage de la colonne d'échange de cations permet d'ajuster la force ionique de l'extrait ainsi que l'élimination d'éthanol résiduel. La chromatographie d'échange de cations a facilement été réalisée, à débit relativement élevé. L'élution du TGF- β 1 est effectuée dans la méthode originale par gradient de NaCl (jusqu'à 1 M). Devant l'absence d'un tel résultat, dans notre cas, malgré un gradient de NaCl jusqu'à une concentration 3 M, l'activité TGF- β 1 a été démontrée dans la fraction de régénération AIAc. Malgré l'hydrophilicité du support, il est vraisemblable que l'adsorption du TGF- β 1 sur cet échangeur de cations n'est pas de type interactions ioniques. Il est à noter la lactescence de la préparation, témoin probable de la présence de nombreux lipides et lipoprotéines désorbés par la forte proportion d'éthanol. Considérée comme un avantage, cette observation nous a conduit à poursuivre la purification vers la chromatographie en phase inversée après élimination de l'éthanol. L'utilisation du support FPLC ProRPC n'a permis qu'une amélioration limitée de la qualité de la préparation. L'analyse SDS-PAGE avec coloration argentique démontre la présence de contaminants de petit PM. La faible concentration protéique de la fraction phase inversée, non quantifiable par la technique de Lowry, fait que le bilan de purification est incomplet. Il est à noter la discordance des quantités de TGF- β 1 dans l'extrait et la fraction AIAc ainsi que la forte perte d'activité TGF- β 1 au cours de l'étape de chromatographie en phase inversée. Nos résultats (2,8 $\mu\text{g}/\text{ml}$) sont satisfaisants puisque les auteurs décrivent une concentration de TGF- β 1 de 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ dans l'extrait. Le rendement final de purification a été estimé à 11% contre 30% annoncés par les auteurs.

3.4 Purification du TGF- β 1 selon la méthode neutre

Les deux méthodes de purification précédemment décrites sont orientées vers la purification particulière de TGF- β 1 (forme active car réalisées en condition acide). Or, le travail entrepris est basé sur la purification de plusieurs facteurs de croissance humains d'origine plaquettaire. Une **association** voire une **harmonisation de purification** d'au moins deux facteurs de croissance cibles : **PDGF et TGF- β 1** est souhaitable. C'est pourquoi nous avons penser à un **schéma de purification plus global des facteurs de croissance humains d'origine plaquettaire**. Les purifications du PDGF (Heldin et coll. 1987, 73), du PD-ECGF (Miyazono et coll. 1987, 124) et du L-TGF- β 1 (Miyazono et coll. 1988, 125) associés permettent la vision d'un tel schéma global pouvant être orienté vers la purification du TGF- β 1. Il s'agit du travail appelé méthode neutre.

Après une étape de lyse - extraction à pH neutre, l'extrait plaquettaire neutre (pH 7,4) contient :

- le PDGF et des traces de TGF- β 1, fortement cationiques
- le PD-ECGF, anionique
- le L-TGF- β 1, fortement anionique

L'étape de chromatographie d'échange de cations permet l'adsorption du PDGF et de traces de TGF- β 1, fortement cationiques. Une purification potentielle du PDGF peut alors être envisagée. Le PD-ECGF et le L-TGF- β 1 anioniques, présents dans l'effluent de cette première étape chromatographique sont adsorbés par chromatographie d'échange d'anions. L'élution différentielle du PD-ECGF et du L-TGF- β 1 débouche sur leur purification individuelle, potentielle. L'orientation de la purification vers le L-TGF- β 1 ou le TGF- β 1 peut être déterminée à ce stade.

Le protocole de lyse - extraction à pH neutre, décrit par Heldin et coll. (1987, 73) dans le cas de la purification du PDGF, a été appliqué après comparaison de la combinaison choc osmotique - congélations/décongélations dans le cas de culots plaquettaires non lavés pour la purification de TGF- β 1. Il est à noter que la totalité des manipulations est réalisée à 4°C pour limiter les pertes d'activité par dénaturation, protéolyse, développement microbien ...) Le choix des ions phosphate dans le tampon de lyse - extraction/équilibre (phosphate de sodium 10 mM, pH 7,4) est lié à leur propriété protectrice des protéines en même temps qu'un bon pouvoir tampon à faible concentration. La première étape chromatographique d'échange de cations sur COOH-Spherodex est basée sur des résultats de travaux précédemment réalisés au laboratoire. Une évaluation antérieure de capacité du support a démontré une injection possible de 57 l de PRP (plasma et plaquettes)/l de support, soit environ trois cent concentrés plaquettaires pour la colonne utilisée. Une faible proportion de

TGF- β 1 (2,7% de l'activité TGF- β 1 injectée, élution AlAc) est retenue sur le support. La seconde étape chromatographique d'échange d'anions est réalisée sur QAE-Sephadex (Pharmacia LKB Biotechnology) dans la méthode originale de purification du PD-ECGF/L-TGF- β 1. Du fait de l'utilisation de Q Sepharose Fast Flow, une étude des conditions d'élution (concentration en NaCl) du L-TGF- β 1 a démontré que celle-ci est maximale à 300-400 mM de NaCl en tampon phosphate de sodium 10 mM, pH 7,4. En conséquence, une première élution a été réalisée à concentration de NaCl 200 mM permettant la désorption présumée du PD-ECGF. Le L-TGF- β 1 est élué à une concentration de NaCl 500 mM. Une concentration du L-TGF- β 1 est effectuée par précipitation au sulfate d'ammonium à pH neutre ouvrant la voie à une chromatographie d'interaction hydrophobe (en milieu sulfate d'ammonium) dans la méthode de purification originale du L-TGF- β 1. Orientant le schéma vers la purification de TGF- β 1, une activation du L-TGF- β 1 (dialyse contre une solution d'acide acétique 1 M) intervient à ce stade. Il s'agit d'une étape très importante et critique (le TGF- β 1 est libéré de son complexe donc hydrophobicité à prendre en compte) dont le rendement est le plus faible de toutes les autres étapes. L'activation par différentes techniques (dialyse acétique, acidification/neutralisation, addition directe d'acide acétique et extrait de Cone), en présence ou non de BSA 1 mg/ml, a démontré que l'addition directe d'acide acétique jusqu'à une concentration de 1M ou la dialyse contre une solution d'acide acétique 1M (sans BSA) sont les méthodes les plus performantes. Mais la dialyse présente l'avantage d'éliminer les sels résiduels (lyophilisation) ainsi que les petits peptides générés (parmi les contaminants potentiels). Une étape de filtration sur gel termine le schéma de purification du TGF- β 1. Le bilan de purification est incomplet (concentration protéique trop faible dans la fraction filtration sur gel) et le rendement final de purification est estimé à seulement 1,7%. La qualité (SDS-PAGE) de la préparation est satisfaisante compte tenu de la simplicité et de la rapidité de la méthode. Ici encore, des contaminants (surtout de petit PM) sont en cause. Une tentative d'amélioration de la qualité de la préparation par chromatographie en phase inversée sur support Pro RPC n'a pas donné de résultat significatif. Etant donné la distribution des PM (SDS-PAGE) des différents éléments de la fraction filtration sur Biogel P-60, une filtration sur gel type HPLC a été envisagée. Disposant au laboratoire du support 100 DIOL, un essai de filtration sur gel FPLC a été ponctuellement effectuée. Trois pics ont été observés mais leur analyse (SDS-PAGE) n'a pu être effectuée du fait de leur faible concentration protéique. Compte tenu de la quantité non négligeable de protéines mise en jeu, il est certain qu'une bonne partie de celle-ci s'est adsorbée par interaction hydrophobe sur le support. Un second essai de chromatographie en phase inversée a été tenté. Une séparation très effective du TGF- β 1 de ses contaminants a été observée conduisant à une préparation de très haute qualité.

3.5 Immunopurification du TGF- β 1

L'immunopurification du TGF- β 1 était un des objectifs de ce travail. Il est à noter que la concentration des anticorps immunopurifiés pour la préparation de l'immuno-adsorbant a conduit à une précipitation non négligeable des IgG dont il faut tenir compte pour envisager le taux de couplage. Un rendement de fixation moyen de 73% a été obtenu avec un taux de couplage satisfaisant de 3,6 mg/ml de gel. L'utilisation de glycine comme agent de saturation des sites libres (après couplage des anticorps) présente l'avantage d'une molécule relativement plus hydrophile que l'éthanolamine mais implique la fixation de charges négatives par le groupement -COOH de cet acide aminé. Différentes préparations de TGF- β 1 plus ou moins purifiées ont été expérimentées. Un extrait neutre, activé a permis de choisir les conditions d'élution. Un extrait de Cone (plus drastique) a permis de démontrer des adsorptions non spécifiques à la matrice saturée. La connexion possible d'une étape d'immunopurification au cours d'une purification du TGF- β 1 a été vérifiée en utilisant des fractions purifiées, dérivées de la méthode neutre. Une telle étape trouve sa place non pas en amont d'une purification mais à partir d'une préparation pré-purifiée. En effet, l'immuno-adsorption semble "genée" lors de l'utilisation d'un extrait encore trop brut.

Un extrait neutre activé a été préparé à partir d'un grand nombre de concentrés pour disposer d'une quantité potentielle, suffisante de TGF- β 1. L'efficacité d'adsorption de 83% n'a pas semblé démontrer une saturation de la colonne. Un lavage à forte force ionique a été effectué pour éliminer des adsorptions non spécifiques (type ionique) toujours possibles. Une faible quantité de TGF- β 1 a été désorbée (1% du TGF- β 1 adsorbé). Les éluions glycine acide et thiocyanate de sodium chaotrope démontrent l'efficacité de l'élution glycine acide (8,5% du TGF- β 1 adsorbé) mais celle-ci est complétée par le thiocyanate de sodium (0,09% du TGF- β 1 adsorbé). En conséquence, cette dernière a été appliquée par la suite. Au total, seuls 9,7% du TGF- β 1 adsorbé a été élué. Le rendement final d'immunopurification (fraction glycine) a été estimé à 7%. Les éluions glycine acide et thiocyanate de sodium (molarité conséquente et caractère chaotrope) possèdent l'avantage de placer d'emblée le TGF- β 1 dans un environnement favorable à ce facteur de croissance.

Une matrice activée, saturée par la glycine, a permis de démontrer des adsorptions non spécifiques de protéines, par application d'un extrait de Cone, dont l'élimination lève une certaine gêne dans l'immunopurification (ou la quantification de l'activité TGF- β 1) dont l'efficacité d'immuno-adsorption et le rendement d'immunopurification passent de 72 à 96% et de 1 à 14%, la proportion de TGF- β 1 élue par rapport à celle adsorbée passant de 1,5 à 15%. La

perte de TGF- β 1 entraînée par cette pré-adsorption non spécifique n'est pas trop importante (estimée à 1%).

Des fractions dérivées de la purification du TGF- β 1 selon la méthode neutre ont également été utilisées. L'efficacité d'immuno-adsorption, le rendement d'immunopurification et la proportion de TGF- β 1 éluée semblent augmenter avec le degré de purification de la préparation injectée. En effet, La fraction précipitation au sulfate d'ammonium conduit à des valeurs respectives de 92, 64 et 69% alors que pour la fraction filtration sur Biogel P-60 (en présence de BSA), il s'agit de 90, 75 et 83,5%. Cette dernière fraction a permis de démontrer une adsorption non spécifique de la BSA au support d'immuno-affinité (15%) mais surtout à la matrice activée, saturée par la glycine, (10%). Cela est peut être dû à la capacité de fixation de petites molécules par la BSA (dont les acides aminés comme la glycine).

L'analyse SDS-PAGE avec coloration argentique et le test d'immunoblotting permettent de constater un certain relargage des anticorps (et/ou fragments) dans les préparations de TGF- β 1 immunopurifié. Les autres protéines contaminantes, majeures se situent à des PM d'environ 55 et 30 kDa mais surtout au niveau de petits PM. Il est certain que la qualité des préparations de TGF- β 1 est améliorée par l'étape de chromatographie d'immunopurification mais qu'au moins une étape postérieure est nécessaire. Un essai ponctuel de chromatographie en phase inversée sur support ProRPC amène à penser qu'une telle étape additionnelle ne posera pas grand problème quant à son efficacité. Dans notre cas, une efficacité d'adsorption de 81% mais un faible rendement de 27% ont été évalués. Bien que la qualité de la préparation soit améliorée, des contaminants de petit PM sont encore présents

Les efficacités d'immuno-adsorption, rendements d'immunopurification ont été évalués par dosage biologique du TGF- β 1 et les remarques concernant la validité des "concentrations d'activité TGF- β 1" mesurées, faites au début de cette discussion, sont bien sûr valables pour cette partie. Néanmoins, un aspect différent s'y ajoute. En effet, les anticorps (et/ou fragments) relargués au cours de la chromatographie d'immunopurification pourraient amener des inhibitions ou modulations d'activité additionnelles. Les faibles proportions de TGF- β 1 éluées par rapport au TGF- β 1 adsorbé appuient ces remarques. De même, l'étape de pré-adsorption non spécifique d'un extrait de Cone semble lever de telles inhibitions ou modulations et ceci d'une façon tout à fait significative.

L'immunopurification des facteurs de croissance n'est, semble-t-il, pas très présente dans la littérature. Harper et coll. (1987, 67) ont rapporté l'utilisation de la chromatographie d'immuno-affinité (anticorps monoclonal) pour la purification d'EGF urinaire, humain. La préparation d'EGF soumise à immunopurification a été réalisée par chromatographie d'échange d'anions (en batch), précipitation à l'éthanol et une nouvelle chromatographie d'échange d'anions. Il est à noter qu'il n'a pas été possible d'adsorber l'EGF sur le support d'immuno-affinité après la première chromatographie d'échange d'anions car il a été nécessaire d'éliminer, au préalable, les sels insolubles, les protéines dénaturées et pigments. L'éluion a été effectuée par une solution d'acide acétique 1 M, conduisant à un rendement d'immunopurification d'environ 57%.

Ce même type d'éluion, plutôt drastique, a été également appliquée par Nishikawa et coll. (1987, 133) pour une purification similaire d'EGF urinaire, humain. Les auteurs signalent que la colonne peut être réutilisée cinq fois sans altérer la capacité d'immuno-adsorption.

Un autre exemple d'immunopurification (anticorps monoclonaux) de facteurs de croissance est celui de la purification sélective de deux des trois dimères de PDGF (AB et BB) humain d'origine plaquettaire décrite par Hart et coll. (1990, 69). Un extrait neutre, défibriné (trois congélations/décongélations) de concentrés plaquettaires périmés a été réalisé avant une chromatographie d'échange de cations. Puis, l'étape de chromatographie d'immuno-affinité a été entreprise avec une éluion type glycine acide. La purification est terminée par une étape finale de chromatographie HPLC en phase inversée.

Dasch et coll. (1989, 41) ont rapporté l'immunopurification (anticorps monoclonaux) de TGF- β 2 à partir d'un extrait d'os bovin purifié par filtration sur gel et chromatographie d'échange de cations. L'éluion a été effectuée par une solution de glycine acide et le TGF- β 2 élué, soumis à une étape finale de chromatographie HPLC en phase inversée. Les auteurs soulignent qu'en utilisant une telle immunopurification, il a été possible d'éliminer un contaminant de petit PM co-éluant avec le TGF- β 2 lors de l'étape de chromatographie HPLC en phase inversée.

Les méthodes de purification du TGF- β 1 humain d'origine plaquettaire publiées dans la littérature sont essentiellement les méthodes décrites par :

- Assoian et coll. (1983, 6) ; Assoian (1987, 7)
- Cone et coll. (1988, 36)
- Van den Eijnden-Van Raaij et coll. (1988, 186)

Les trois méthodes font appel à une **extraction acide** donc d'emblée à une **purification de TGF- β 1** (forme active) ainsi qu'à une **technique chromatographique performante mais sophistiquée : la chromatographie HPLC en phase inversée**. Il est à noter que Assoian (1987, 7) décrit une adaptation de sa méthode à une purification importante portant sur

portant sur deux cent cinquante concentrés. Van den Eijnden-Van Raaij et coll (1988, 186) adoptent une démarche intéressante tout en se référant à la méthode d'Assoian (extrait alcool acide, précipitation éthanol/éther, filtration sur gel et chromatographie en phase inversée HPLC). Après l'étape de filtration sur gel, une chromatographie HPLC d'échange de cations en milieu salin volatil (acétate d'ammonium) permet l'élimination de protéines contaminatrices de petit PM par élution retardée du TGF- β 1. Ce type de sel volatil est appréciable vis à vis de l'urée 8 M utilisée par Assoian dans la seconde étape de filtration sur gel. Une concentration sur cartouche phase inversée et une chromatographie en phase inversée terminent la purification. L'originalité de la méthode réside dans le fait qu'elle est réalisée à pH acide, en utilisant des solvants ou sels volatils (concentration par/et lyophilisation aisées) en conditions stériles (tests biologiques). Les rendements sont décrits comme dix à vingt fois meilleurs que pour les autres méthodes : 800 μ g de TGF- β 1/quarante concentrés plaquettaires lavés.

Pour ce qui concerne la source, l'utilisation des **culots plaquettaires** est certainement préférable au PRP (sans retentissement notable sur les quantités de facteurs de croissance par pertes dues à une activation plaquettaire) pour une **purification plus aisée** (volume moins important, pas de dilution dans le plasma très riche en protéines). Par contre, le nombre de concentrés mis en jeu a son importance et de grands fractionnements sont préférables. Lorsque les trois méthodes d'extraction utilisées durant la réalisation de ce travail (Assoian, Cone et extraction neutre) sont comparées, il apparaît que l'**extraction éthanol acide de Cone** est la plus efficace (7 10^5 ng de TGF- β 1/deux cents poches) tout en démontrant la meilleure activité spécifique (4000 10^{-6} mg/mg). La précipitation éthanol/éther y faisant suite dans la méthode d'Assoian présente l'inconvénient d'utilisation d'éther (solvent onéreux) qui demanderait un matériel adapté et protégé. Ces deux techniques d'extraction acide placent d'emblée la purification dans l'optique de la préparation de TGF- β 1 (forme active). Il serait, peut être, alors possible d'envisager un schéma de purification des deux facteurs de croissance cationiques : PDGF et TGF- β 1 mais cela impliquerait une certaine **co-purification**. L'utilisation du support COOH Spherodex (IBF-Biotechnics) serait une alternative du fait de l'élution différentielle du PDGF dans la solution de régénération NaCl 1 M et de celle du TGF- β 1 dans la solution de régénération finale AlAc. La qualité du TGF- β 1 ainsi obtenu demande (au moins) une étape de purification additionnelle. La chromatographie en phase inversée s'avère être la plus utilisée et performante. Il nous a été possible de juger les performances d'un système de chromatographie HPLC en phase inversée C4 et il semble qu'un tel matériel soit un **passage obligé pour la production et l'analyse de protéines hautement purifiées tels les facteurs de croissance, qui plus est, à forte valeur ajoutée**. Une autre optique de purification est démontrée par la méthode neutre. La trame d'un schéma de purification plus global des facteurs de croissance humains d'origine plaquettaire permettrait la

plaquettaire permettrait la purification de PDGF, de PD-ECGF et de L-TGF- β 1 et/ou TGF- β 1. L'extraction des plaquettes en milieu neutre conserve les caractéristiques biochimiques différentes du PDGF (cationique) et du L-TGF- β 1 (anionique) ainsi que la possibilité de préparation d'un troisième facteur de croissance, le PD-ECGF. Il est alors possible de connecter les résultats des travaux du laboratoire sur la purification du PDGF par l'introduction du support COOH-Spheredex en amont de purification. L'étape suivante de chromatographie d'échange d'anions entraîne la purification différentielle du PD-ECGF et du L-TGF- β 1. Il reste, cependant, un travail d'amélioration d'efficacité de cette étape car le rendement (L-TGF- β 1) en est faible (32%). La précipitation au sulfate d'ammonium est une technique de concentration efficace du L-TGF- β 1. A ce stade, deux orientations s'offrent au purificateur : L-TGF- β 1 ou TGF- β 1. Le choix de la purification du TGF- β 1 pose le problème de son **activation**. Il s'agit, pour le moment, du **point faible** du schéma de purification en raison de son rendement très faible. Le rendement de l'étape de filtration sur gel est également assez faible. Une collecte plus large permettrait, peut être, une amélioration (mais avec une baisse de la qualité de la fraction). Ici, encore, les performances d'une chromatographie HPLC seraient fort utiles. Une filtration sur gel ou une chromatographie en phase inversée conclurait cette préparation de TGF- β 1. Une autre possibilité intéressante serait d'inclure une étape de chromatographie d'échange de cations en milieu acide et sels volatils comme le décrivent Van den Eijnden-Van Raaij et coll. après l'activation. Les contaminants de petit PM pourraient être ainsi éliminés.

Conclusion générale - Perspectives

Cette étude doctorale nous a permis d'assimiler des techniques de base (et d'autres plus pointues) du travail de recherche ainsi que des éléments d'exploitation et de discussion des résultats obtenus. L'aspect collaboration scientifique a été très important. La découverte du "monde" des facteurs de croissance s'est avérée délicate mais ô combien passionnante. Les résultats produits peuvent être considérés comme une **base de travail** pour la mise au point finale d'une méthode de purification du TGF- β 1 et/ou, mieux encore, d'un **schéma de purification plus global de facteurs de croissance humains d'origine plaquettaire**. Cette purification pourrait englober aussi bien :

- la protéine-réactif TGF- β 1 (malgré une concurrence avec la recombinaison génétique)
- le complexe protéique L-TGF- β 1 à visées recherche fondamentale et thérapeutique potentielle
- la production d'anticorps poly- et/ou monoclonaux correspondants

La compréhension des mécanismes d'activation et d'action du TGF- β sont des objectifs très importants qui déboucheront certainement vers la connaissance des phénomènes de régulation de la croissance et de la différenciation normales et pathologiques des cellules. Le génie biologique fournirait donc des "outils" en ce sens. La poursuite de l'étude de la **localisation immunohistochimique du TGF- β** serait une des applications de ces outils. Pour ce qui concerne les autres applications du TGF- β 1, ou plus généralement des facteurs de croissance plaquettaire, il semble qu'il apparaisse une nouvelle voie vers leur utilisation, sous forme d'association multiple de molécules plus ou moins purifiées, dans les milieux de culture à composition dite définie et dans l'aide à la cicatrisation.





BIBLIOGRAPHIE

- 1 ALLEN (J.B.), MANTHEY (C.L.), HAND (A.R.), OHURA (K.), ELLINGSWORTH (L.), WAHL (S.M.).
Rapid onset synovial inflammation and hyperplasia induced by transforming growth factor β .
J. Exp. Med. 1990, 171, 231-247
2. ANTONIADES (H.N.), SCHER (C.D.), STILES (C.D.).
Purification of human platelet-derived growth factor.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1979, 76, 1809-1813.
- 3 ANTONIADES (H.N.), HUNKAPILLER (M.W.)
Human platelet-derived growth factor (PDGF); amino-terminal amino acid sequence.
Science 1983, 220, 963-965.
4. ANZANO (M.A.), ROBERTS (A.B.), MEYERS (C.A.), KOMORIYA (A.), LAMB (L.C.), SMITH (J.M.), SPORN (M.B.).
Synergistic interaction between two classes of transforming growth factors from murine sarcoma cells
Cancer Res. 1982, 42, 4776-4778.
5. ANZANO (M.A.), ROBERTS (A.B.), SMITH (J.M.), SPORN (M.B.), DE LARCO (J.E.).
Sarcoma growth factor from conditioned medium is composed of both type alpha and type beta transforming growth factors.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1983, 80, 6264-6268.
- 6 ASSOIAN (R.K.), KOMORIYA (A.), MEYERS (D.M.), MILLER (C.A.), SPORN (M.B.)
Transforming growth factor- β in human platelets
Identification of a major storage site, purification, and characterization
J. Biol. Chem. 1983, 258, 7155-7160.
7. ASSOIAN (R.K.).
Purification of type- β transforming growth factor from human platelets.
Methods Enzymol. 1987, 146, 153-163.
8. AVALLET (O.), VIGIER (M.), PERRARD-SAPORI (M.H.), SAEZ (J.M.).
Transforming growth factor β inhibits Leydig cell functions.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 1987, 146, 575-581.
- 9 BALK (S.D.)
Calcium as a regulator of the proliferation of normal, but not of transformed, chicken fibroblasts in a plasma-containing medium.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1971, 68, 271-275.

10. BAENZIGER (N.L.), MAJERUS (P.W.).
Isolation of human platelets and platelet surface membranes
Methods Enzymol 1974, 31, 149-155
11. BARRITAUULT (D.).
Les facteurs de croissance cellulaire
Perspectives d'application en biologie et en pharmacologie.
S.T.P. Pharma 1989, 5, 567-575.
12. BLAKE (A.G.), FALANGA (V.).
Serum modulates the effects of transforming growth factor beta
on endothelial cells.
J. Invest. Dermatol. 1988, 90, 547-547.
13. BODE (A.P.).
Platelet activation may explain the storage lesion in platelet
concentrates.
Blood Cells 1990, 16, 109-126.
14. BÖRDER (W.A.), OKUDA (S.), LANGUINO (L.R.), SPORN (M.B.), RUOSLAHTI (E.).
Suppression of experimental glomerulonephritis by antiserum against
transforming growth factor $\beta 1$.
Nature 1990, 346, 371-374.
15. BOS (E.S.), VAN DER DEELEN (A.A.), VAN ROOY (N.), SCHUURS (A.H.W.M.).
3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine as an ames test negative chromogen for
horse-radish peroxidase in enzyme-immunoassay.
J. Immunoassay 1981, 2, 187-204.
16. BRONCHUD (M.H.), DEXTER (T.M.).
Clinical use of growth factors.
British Medical Bulletin 1989, 45, 590-599.
17. BROWN (G.L.), CURTSINGER (L.J.), WHITE (M.), MITCHELL (R.O.), PIETSCH (J.),
NORQUIST (R.), VON FRAUNHOFER (A.), SCHULTZ (G.S.).
Acceleration of tensile strength of incisions treated with EGF and TGF- β .
Ann. Surg. 1988, 208, 788-794.
18. BROWN (P.D.), WAKEFIELD (L.M.), LEVINSON (A.D.), SPORN (M.B.)
Recombinant latent transforming growth factor beta 1, 2, and 3.
Growth Factors 1990, 3, 33-41.
19. BURGESS (A.W.).
Growth factors: the beginnings.
Growth Factors 1988, 1, 1-6.

20. BURGOS (H.), HERD (A.), BENNETT (J.P.)
Placental angiogenic and growth factors in the treatment of chronic varicose ulcers : preliminary communication
J. Royal Soc. Med. 1989, 82, 598-599.
21. CARR (B.I.), HAYASHI (I.), BRANUM (E.L.), MOSES (H.L.)
Inhibition of DNA synthesis in rat hepatocytes by platelet-derived type β transforming growth factor.
Cancer Res. 1986, 46, 2330-2334.
22. CARREL (A.)
Artificial activation of the growth *in vitro* of connective tissue.
J Exp Med 1913, 17, 14-19
23. CARREL (A.)
Modern techniques of tissue culture and results.
Arch. F. Exp. Zellforsch 1928, 6, 70-81.
24. CARREL (A.), BAKER (L.E.)
The chemical nature of substances required for cell multiplication.
J Exp Med 1926, 44, 503-521
25. CARRINGTON (J.L.), ROBERTS (A.B.), FLANDERS (K.C.), ROCHE (N.S.), REDDI (A.H.)
Accumulation, localization, and compartmentation of transforming growth factor β during endochondral bone development.
J. Cell Biol. 1988, 107, 1969-1975.
26. CATE (R.L.), MATTALIANO (R.J.), HESSION (C.), TIZARD (R.), FARBER (N.M.), CHEUNG (A.), NINFA (E.G.), FREY (A.Z.), GASH (D.J.), CHOW (E.P.), FISHER (R.A.), BERTONIS (J.M.), TORRES (G.), WALLNEW (B.P.), RAMACHANDRAN (K.L.), RAGIN (R.C.), MANGANARO (T.F.), MAC LAUGHLIN (D.T.), DONAHÖE (P.K.)
Isolation of the bovine and human genes for mullerian inhibiting substance and expression of the human gene in animal cells.
Cell 1986, 45, 685-698.
27. CENTRELLA (M.), MAC CARTHY (T.L.), CANALIS (E.)
Skeletal tissue and transforming growth factor β
FASEB J. 1988, 2, 3065-3073
28. CHAUDARY (V.K.), FITZGERALD (D.J.), ADHYA (S.), PASTAN (I.)
Activity of a recombinant fusion protein between transforming growth factor type α and Pseudomonas toxin.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1987, 84, 4538-4532.

29. CHEIFETZ (S.), WEATHERBEE (J.A.), TSANG (M.L.S.), ANDERSON (J.K.), MOLE (J.E.), LUCAS (R.), MASSAGUE (J.).
The transforming growth factor- β system, a complex pattern of cross-reactive ligands and receptors
Cell 1987, 48, 409-415
30. CHEIFETZ (S.), ANDRES (J.L.), MASSAGUE (J.).
The transforming growth factor- β receptor type III is a membrane proteoglycan.
J. Biol. Chem. 1988, 263, 16984-16991.
31. CHEIFETZ (S.), BASSOLS (A.), STANLEY (K.), OHTA (M.), GREENBERGER (J.), MASSAGUE (J.).
Heterodimeric transforming growth factor- β
Biological properties and interaction with three types of cell surface receptors
J Biol Chem 1988, 263, 10783-10789
32. CHILDS (C.B.), PROPER (J.A.), TUCKER (R.F.), MOSES (H.L.).
Serum contains a platelet-derived transforming growth factor.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1982, 79, 5312-5316.
33. CIFONE (M.A.), FILDER (I.J.).
Correlation of patterns of anchorage-independent growth with *in vivo* behavior of cells from a murine fibrosarcoma
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1980, 77, 1039-1043.
34. COFFEY (R.J.), KOST (L.J.), LYONS (R.M.), MOSES (H.L.), LARUSSO (N.F.).
Hepatic processing of transforming growth factor β in the rat.
J. Clin. Invest. 1987, 80, 750-757.
35. COFFMAN (R.L.), LEBMAN (D.A.), SHRADER (B.).
Transforming growth factor β specifically enhances IgA production by lipopolysaccharide-stimulated murine B lymphocytes.
J. Exp. Med. 1989, 170, 1039-1044.
36. CONE (J.L.), BROWN (D.R.), DE LARCO (J.E.)
An improved method of purification of transforming growth factor, type β from platelets
Anal. Biochem. 1988, 168, 71-74.
37. CUATRECASAS (P.), WILCHEK (M.), ANFINSEN (C.B.).
Selective enzyme purification by affinity chromatography.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1968, 61, 636-643.

38. DANIELPOUR (D.), DART (L.L.), FLANDERS (K.C.), ROBERTS (A.B.), SPORN (M.B.).
Immunodetection and quantification of the two forms of transforming growth factor-beta (TGF- β 1 and TGF- β 2) secreted by cells in culture
J. Cell Physiol. 1989, 138, 79-86.
39. DANIELPOUR (D.), KIM (K.Y.), DART (L.L.), WATANABE (S.), ROBERTS (A.B.), SPORN (M.B.).
Sandwich enzyme-linked immunosorbent assays (SELISAs) quantitate and distinguish two forms of transforming growth factor-beta (TGF- β 1 and TGF- β 2) in complex biological fluids.
Growth Factors 1989, 2, 61-71.
40. DANIELPOUR (D.), SPORN (M.B.).
Differential inhibition of transforming growth factor β 1 and β 2 activity by α 2-macroglobulin.
J. Biol. Chem. 1990, 265, 6973-6977.
41. DASCH (J.R.), PACE (D.R.), WAEGELL (W.), INENAGA (D.), ELLINGSWORTH (L.).
Monoclonal antibodies recognising transforming growth factor- β
Biactivity neutralization and transforming growth factor β 2 affinity purification.
J. Immunol. 1989, 142, 1536-1541.
42. DE LARCO (J.E.), TODARO (G.J.)
Growth factors from murine sarcoma virus-transformed cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1978, 75, 4001-4005.
43. DE MARTIN (R.), HAENDLER (B.), HOFER-WARBINEK (R.), GAUGITSCH (H.), WRANN (M.), SCHLUSENER (H.), SEIFERT (J.M.), BODMER (S.), FONTANA (A.), HOFER (E.).
Complementary DNA for human glioblastoma-derived T cell suppressor factor, a novel member of the transforming growth factor- β gene family.
EMBO J. 1987, 6, 3673-3677.
44. DE PALMA (R.L.), KRUMMEL (T.M.), NELSON (J.M.).
Fetal wound matrix is composed of proteoglycan rather than collagen.
Surg. Forum 1987, 38, 626-628.
45. DERYNCK (R.), JARRETT (J.A.), CHEN (E.Y.), EATON (D.H.), BELL (J.R.), ASSOIAN (R.K.), ROBERTS (A.B.), SPORN (M.B.), GOEDDEL (D.V.).
Human transforming growth factor- β complementary DNA sequence and expression in normal and transformed cells.
Nature 1985, 316, 701-705.

46. DERYNCK (R.), RHEE (L.), CHEN (E.Y.), VAN TILBURG (A.).
Intron-exon structure of human transforming growth factor- β precursor gene.
Nucleic Acids Res. 1987, 15, 3188-3189
47. DERYNCK (R.), LINDQUIST (P.B.), LEE (A.), WEN (D.), TAMM (J.), GRAYCAR (J.L.), RHEE (L.), MASON (A.J.), MILLER (D.A.), COFFEY (R.J.), MOSES (H.L.), CHEN (E.Y.).
A new type of transforming growth factor- β , TGF- β 3.
EMBO J. 1988, 7, 3737-3743.
48. DOOLITTLE (R.F.), HUNKAPILLER (M.W.), HOOD (L.E.), DEVARE (S.G.), ROBBINS (K.C.), AARONSON (S.A.), ANTONIADES (H.N.).
Simian sarcoma virus oncogene, *v-s/s* is derived from the gene (or genes) encoding a platelet-derived growth factor
Science 1983, 221, 275-277
49. DVORAK (H.F.).
Tumors: wounds that do not heal.
N. Eng. J. Med. 1986, 315, 1650-1659.
50. EISENBERG (D.), WEISS (R.M.), TERWILLIGER (T.C.).
The hydrophobic moment detects periodicity in protein hydrophobicity
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1984, 81, 140-144.
51. ELLINGSWORTH (L.R.), BRENNAN (J.E.), FOK (K.), ROSEN (D.M.), BENTZ (H.), PIEZ (K.A.), SEYEDIN (S.M.).
Antibodies to the N-terminal portion of cartilage-inducing factor A and transforming growth factor β .
J. Biol. Chem. 1986, 261, 12362-12367.
52. ELLINGSWORTH (L.R.), NAKAYAMA (D.), SEGARINI (P.), DASCH (J.), CARRILLO (P.), WAEGELL (W.)
Transforming growth factor- β s are equipotent growth inhibitors of interleukin-1-induced thymocyte proliferation
Cell. Immunol. 1988, 114, 41-54.
53. FEIGE (J.J.), COCHET (C.), RAINEY (W.E.), MADANI (C.), CHAMBAZ (E.M.).
Type β transforming growth factor affects adrenocortical cell-differentiated functions.
J. Biol. Chem. 1987, 262, 13491-13495.

54. FLANDERS (K.C.), ROBERTS (A.B.), LING (N.), FLEURDELYS (B.E.), SPORN (M.B.).
Antibodies to peptide determinants in transforming growth factor- β and their applications.
Biochemistry 1988, 27, 739-746.
55. FLANDERS (K.C.), THOMPSON (N.L.), CISSEL (D.S.), VAN OBBERGHEN-SCHILLING (E.), BAKER (C.C.), KASS (M.E.), ELLINGSWORTH (L.R.), ROBERTS (A.B.), SPORN (M.B.).
Transforming growth factor- β 1: histochemical localization with antibodies to different epitopes.
J. Cell. Biol. 1989, 108, 653-660.
56. FLORINI (J.R.), ROBERTS (A.B.), EWTON (D.Z.), FALEN (S.L.), FLANDERS (K.C.), SPORN (M.B.).
Transforming growth factor-beta
A very potent inhibitor of myoblast differentiation, identical to the differentiation inhibitor secreted by Buffalo rat liver cells.
J. Biol. Chem. 1989, 261, 16509-16513.
57. FORAGE (R.G.), RING (J.M.), BROWN (R.M.), MAC INERNEY (B.V.), COBON (G.S.), GREGSON (R.P.), ROBERTSON (D.M.), MORGAN (F.J.), HEARN (M.T.W.), FINDLAY (J.K.), WETTENHALL (R.E.H.), BURGER (H.G.), DE KRESTER (D.M.).
Cloning and sequence analysis of cDNA species coding for the two subunits of inhibin from bovine follicular fluid
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1986, 83, 3091-3095
58. FROLIK (C.A.), DART (L.L.), MEYERS (C.A.), SMITH (D.M.), SPORN (M.B.).
Purification and initial characterization of a type β transforming growth factor from human placenta.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1983, 80, 3676-3680.
59. FROLIK (C.A.), WAKEFIELD (L.M.), SMITH (D.M.), SPORN (M.B.).
Characterization of a membrane receptor for transforming growth factor- β in normal rat kidney fibroblasts.
J. Biol. Chem. 1984, 259, 10995-11000.
60. GARNIER (J.), OSGUTHORPE (D.J.), ROBSON (B.).
Analysis of the accuracy and implications of simple methods for predicting the secondary structure of globular proteins.
J. Mol. Biol. 1978, 120, 97-120.

61. GENTRY (L.E.), WEBB (N.R.), LIM (G.J.), BRUNNER (A.M.), RANCHALIS (J.E.), TWARDZIK (D.R.), LIOUBIN (M.N.), MARQUARDT (H.), PURCHIO (A.F.).
Type 1 transforming growth factor beta: amplified expression and secretion of mature and precursor polypeptides in chinese hamster ovary cells.
Molec. Cell. Biol. 1987, 7, 3418-3427.
62. GODING (J.W.).
Use of staphylococcal protein A as an immunological reagent.
J. Immunol. Meth. 1978, 20, 241-253.
63. GOSPADOROWICZ (D.), MORAN (J.S.)
Growth factors in mammalian cell culture.
Annu. Rev. Biochem. 1976, 45, 531-558.
64. GOUSTIN (A.S.), LEOF (E.B.), SHIPLEY (G.D.), MOSES (H.L.).
Growth factors and cancer.
Cancer Res. 1986, 46, 1015-1029.
65. HAMPSON (J.), PONTING (I.L.O.), COOK (N.), VODINELICH (L.), REDMON (S.), ROBERTS (A.B.), DEXTER (T.M.).
The effects of TGF β on haemopoietic cells.
Growth Factors 1989, 1, 193-202.
66. HANKS (S.K.), ARMOUR (R.), BALDWIN (J.H.), MALDONADO (F.), SPIESS (J.), HOLLEY (R.W.).
Amino acid sequence of the BSC-1 cell growth inhibitor (polyergin) deduced from the nucleotide sequence of the cDNA.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1988, 85, 79-82.
67. HARPER (R.A.), PIERCE (J.), SAVAGE (C.R.).
Purification of human epidermal growth factor by monoclonal antibody affinity chromatography.
Methods Enzymol. 1987, 146, 3-11.
68. HARRISON (R.G.).
Observations on the living developing nerve fiber.
Proc Soc Exp Biol Med 1907, 4, 140-143
69. HART (C.E.), BAILEY (M.), CURTIS (D.A.), OSBORN (S.), RAINES (E.), ROSS (R.), FORSTROM (J.M.).
Purification of PDGF-AB and PDGF-BB from human platelet extracts and identification of all three PDGF dimers in human platelets.
Biochemistry 1990, 29, 166-172.

70. HAYASHI (I.), SATO (G.).
Replacement of serum by hormones permits growth of cells in a defined medium.
Nature 1976, 259, 132-134
71. HEINE (U.I.), FLANDERS (K.C.), ROBERTS (A.B.), MUNOZ (E.F.), SPORN (M.B.).
Role of transforming growth factor β in the development of the mouse embryo.
J. Cell Biol. 1987, 105, 2861-2876.
72. HELDIN (C.H.), WESTERMARK (B.), WASTESON (A.).
Platelet-derived growth factor: purification and partial characterization
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1979, 76, 3722-3726
73. HELDIN (C.H.), JOHNSON (A.), WENNERGREN (S.), RONNSTRAND (L.),
HAMMACHER (A.), FAULDERS (B.), WASTESON (A.), WESTERMARK (B.).
Purification of human platelet-derived growth factor.
Methods Enzymol. 1987, 147, 3-13.
74. HILL (D.J.), STRAIN (A.J.), ELSTOW (S.F.), SWENNE (I.), MILNER (R.D.G.).
Bi-functional action of transforming growth factor- β on DNA synthesis in
early passage human fetal fibroblasts.
J. Cell. Physiol. 1986, 128, 322-328.
75. HOPP (T.P.), WOODS (K.R.).
Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1981, 78, 3824-3828.
76. HOPP (T.P.).
In: ALITALO (K.), PARTANEN (P.), VAHERI (V.) (eds.)
Synthetic Peptides in Biology and Medicine.
Elsevier Science Publishers B V , North Holland, 1985, 3-11
77. HOTTA (M.), BAIRD (A.).
Differential effects of transforming growth factor type β on the growth
and function of adrenocortical cells *in vitro*
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1986, 83, 7795-7799.
78. HOWE (P.H.), CUNNINGHAM (M.R.), LEOF (E.B.).
Inhibition of mink lung epithelial cell proliferation by transforming
growth factor- β is coupled through a pertussis-toxin-sensitive substrate.
Biochem. J. 1990, 266, 537-543.

79. HUANG (S.S.), O'GRADY (P.), HUANG (J.S.).
Human transforming growth factor- β : α 2-macroglobulin complex is a latent form of transforming growth factor- β .
J. Biol. Chem. 1988, 263, 1535-1541.
80. HUTCHINSON (L.A.), FINDLAY (J.K.), DE VOS (F.L.), ROBERTSON (D.M.).
Effects of bovine inhibin, transforming growth factor- β and bovine activin-A on granulosa cell differentiation.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 1987, 146, 1405-1412.
81. IGNOTZ (R.A.), MASSAGUE (J.).
Type β transforming growth factor controls the adipogenic differentiation of 3T3 fibroblasts.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1985, 82, 8530-8534.
82. IKEDA (T.), LIOUBIN (M.N.), MARQUARDT (H.).
Human transforming growth factor type β 2: production by a prostatic adenocarcinoma cell line, purification, and initial characterization.
Biochemistry 1987, 26, 2406-2410.
83. ISHIBASHI (T.), MILLER (S.L.), BURSTEIN (S.A.).
Type β transforming growth factor is a potent inhibitor of murine megakaryocytopoiesis *in vitro*
Blood 1987, 69, 1737-1741
84. JAKOWLEW (S.B.), DILLARD (P.J.), KONDAIAH (P.), SPORN (M.B.), ROBERTS (A.B.).
Complementary deoxyribonucleic acid cloning of a novel transforming growth factor- β messenger ribonucleic acid from chick embryo chondrocytes.
Mol. Endocrinol. 1988, 2, 747-755.
85. JAKOWLEW (S.B.), DILLARD (P.J.), SPORN (M.B.), ROBERTS (A.B.).
Complementary deoxyribonucleic acid cloning of a messenger ribonucleic acid encoding transforming growth factor β 4 from chicken embryo chondrocytes
Mol. Endocrinol. 1988, 2, 1186-1195.
86. JENNINGS (J.C.), MOHAN (S.), LINKHART (T.A.), WIDSTROM (R.), BAYLINK (D.J.).
Comparison of the biological actions of TGF beta-1 and TGF beta-2: differential activity in endothelial cells.
J. Cell. Physiol. 1988, 137, 167-172.

87. JENNINGS (J.C.), MOHAN (S.).
Heterogeneity of latent transforming growth factor- β isolated from bone matrix proteins.
Endocrinology 1990, 126, 1014-1021.
88. JULLIEN (P.), BERG (T.M.), LAWRENCE (D.A.).
Acidic cellular environments: activation of latent TGF- β and sensitization of cellular responses to TGF- β and EGF
Int. J. Cancer 1989, 43, 886-891.
89. KAHN (P.), SHIN (S.).
Cellular tumorigenicity in nude mice.
J. Cell. Biol. 1979, 82, 1-16.
90. KANZAKI (T.), OLOFSSON (A.), MOREN (A.), WERNSTEDT (C.), HELLMAN (U.), MIYAZONO (K.), CLAESSION-WELSH (L.), HELDIN (C.H.).
TGF- β 1 binding protein: a component of the large latent complex of TGF- β 1 with multiple repeat sequences.
Cell 1990, 61, 1051-1061.
91. KARPLUS (P.A.), SCHULZ (G.E.).
Prediction of chain flexibility in proteins
A tool for the selection of peptide antigens.
Naturwissenschaften 1985, 72, 212-213.
92. KEHRL (J.H.), ROBERTS (A.B.), WAKEFIELD (L.M.), JAKOWLEW (S.), SPORN (M.B.), FAUCI (A.S.).
Transforming growth factor β is an important immunomodulatory protein for human B lymphocytes.
J. Immunol. 1986, 137, 3855-3860.
93. KEHRL (J.H.), TAYLOR (A.S.), DELSING (G.A.), ROBERTS (A.B.), SPORN (M.B.), FAUCI (A.S.).
Further studies of the role of transforming growth factor- β in human B cell function.
J. Immunol. 1989, 143, 1868-1874.
94. KELLER (J.R.), MANTEL (C.), SING (G.K.), ELLINGSWORTH (L.R.), RUSCETTI (S.K.), RUSCETTI (F.W.).
Transforming growth factor β 1 selectively regulates early murine hematopoietic progenitors and inhibits the growth of IL-3-dependent myeloid leukemia cell lines.
J. Exp. Med. 1988, 168, 737-750.

95. KESKI-OJA (J.), LYONS (R.M.), MOSES (H.L.).
Immunodetection and modulation of cellular growth with antibodies
against native transforming growth factor- β .
Cancer Res. 1987, 47, 6451-6458.
96. KIMCHI (A.), WANG (X.F.), WEINBERG (R.A.), CHEIFETZ (S.), MASSAGUE (J.)
Absence of TGF- β receptors and growth inhibitory responses in
retinoblastoma cells
Science 1988, 240, 196-199.
97. KNABBE (C.), LIPPMAN (M.E.), WAKEFIELD (L.M.), FLANDERS (K.C.), KASID
(A.), DERYNCK (R.), DICKSON (R.B.).
Evidence that transforming growth factor- β is a hormonally regulated
negative growth factor in human breast cancer cells.
Cell 1987, 48, 417-428.
98. KOHLER (N.), LIPTON (A.).
Platelets as a source of fibroblast growth-promoting activity
Exp. Cell. Res. 1974, 87, 297-301.
99. KOMM (B.S.), TERPENING (C.M.), BENZ (D.J.), GRAEME (K.A.), GALLEGOS (A.),
KORC (M.), GREENE (G.L.), O'MALLEY (B.W.), HAUSSER (M.R.).
Estrogen binding, receptor mRNA, and biologic response in osteoblast-like
osteosarcoma cells.
Science 1988, 241, 81-84.
100. KONDAIAH (P.), SANDS (M.J.), SMITH (J.M.), FIELDS (A.), ROBERTS (A.B.),
SPORN (M.B.), MELTON (D.A.).
Identification of a novel transforming growth factor- β (TGF- β 5) mRNA in
Xenopus laevis.
J. Biol. Chem. 1990, 265, 1089-1093.
101. KRONKE (M.), LEONARD (W.J.), DEPPER (J.M.), ARYA (S.K.), WONG-STAAAL (F.),
GALLO (R.C.), WALDMAN (T.A.), GREENE (W.C.).
Cyclosporin A inhibits T cell growth factor gene expression at the level
of mRNA transcription
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1984, 81, 5214-5218.
102. KYTE (J.), DOOLITTLE (R.F.).
A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein.
J. Mol. Biol. 1982, 157, 105-132.
103. LAURELL (C.B.).
Electroimmuno assay
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 1972, 29, 21-37.

104. LAWRENCE (D.A.), PIRCHER (R.), KRYCEVE-MARTINERIE (G.), JULLIEN (P.).
Normal embryo fibroblasts release transforming growth factors in a latent form
J Cell Physiol 1984, 121, 184-188
105. LAWRENCE (D.A.), PIRCHER (R.), JULLIEN (P.).
Conversion of a high molecular weight latent β -TGF from chicken embryo fibroblasts into a low molecular weight active β -TGF under acidic conditions.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 1985, 133, 1026-1034.
106. LAWRENCE (W.T.), SPORN (M.B.), GORSCHBOTH (C.), NORTON (J.A.), GROTENDORST (G.R.).
The reversal of an adriamycin induced healing impairment with chemoattractants and growth factors.
Ann Surg. 1986, 203, 142-147
107. LEE (S.J.).
Identification of a novel member (GDF-1) of the transforming growth factor- β superfamily.
Mol. Endocrinol. 1990, 4, 1034-1040.
108. LEFER (A.M.), TSAO (P.), AOKI (N.), PALLADINO (M.A.).
Mediation of cardioprotection by transforming growth factor- β .
Science 1990, 249, 61-64.
109. LIN (T.), BLAISDELL (J.), HASKELL (J.F.).
Transforming growth factor- β inhibits Leydig cell steroidogenesis in primary culture
Biochem. Biophys. Res. Commun. 1987, 146, 387-394
110. LING (N.), YING (S.Y.), UENO (N.), SHIMASAKI (S.), ESCH (F.), HOTTA (M.), GUILLEMIN (R.).
Pituitary FSH is released by a heterodimer of the β -subunit from the two forms of inhibin.
Nature 1986, 321, 779-782.
111. LIZONOVA (A.), BIZIK (J.), GROFOVA (M.), VAHERI (A.).
Coexpression of tumor-associated α_2 -macroglobulin and growth factors in human melanoma cell lines.
J. Cell. Biochem. 1990, 43, 315-325.
112. LOWRY (O.H.), ROSEBROUGH (N.J.), FARR (A.L.), RANDALL (R.J.).
Proteins measurements with the Folin phenol reagent.
J. Biol. Chem. 1951, 193, 265-275.

113. LYONS (R.M.), KESKI-OJA (R.M.), MOSES (H.L.).
Proteolytic activation of latent transforming growth factor- β from fibroblast-conditioned medium.
J. Cell Biol. 1988, 106, 1659-1665.
114. LYONS (K.), GRAYCAR (J.L.), LEE (A.), HASHMI (S.), LINDQUIST (P.B.), CHEN (E.Y.), HOGAN (B.L.M.), DERYNCK (R.).
Vgr-1, a mammalian gene related to Xenopus Vg-1, is a member of the transforming growth factor β gene superfamily.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1989, 86, 4554-4558.
115. MAC MAHON (J.B.), RICHARDS (W.L.), DEL CAMPO (A.A.), SONG (M.K.), THORGIERSSON (S.S.).
Differential effects of transforming growth factor- β on proliferation of normal and malignant rat liver epithelial cells in culture.
Cancer Res. 1986, 46, 4665-5671.
116. MAC KAY (K.), ROBBINS (A.R.), BRUCE (M.D.), DANIELPOUR (D.).
Identification of disulfide-linked transforming growth factor- β 1 specific binding proteins in rat glomeruli.
J. Biol. Chem. 1990, 265, 9351-9356.
117. MADISEN (L.), WEBB (N.R.), ROSE (T.M.), MARQUARDT (H.), IKEDA (T.), TWARDZIK (D.), SEYEDIN (S.M.), PURCHIO (A.F.).
Transforming growth factor- β 2: cDNA cloning and sequence analysis.
DNA 1988, 7, 1-8.
118. MASON (A.J.), HAYFLICK (J.S.), LING (N.), ESCH (F.), UENO (N.), YING (S.Y.), GUILLEMIN (R.), NIALL (H.), SEEBURG (P.H.).
Complementary DNA sequences of ovarian follicular fluid inhibin show precursor structure and homology with transforming growth factor- β .
Nature 1985, 318, 659-663.
119. MASSAGUE (J.), LIKE (B.).
Cellular receptors for type β transforming growth factor
Ligand binding and affinity labelling in human and rodent cell lines.
J. Biol. Chem. 1985, 260, 2636-2645.
120. MASSAGUE (J.), CHEIFETZ (S.), ENDO (T.), NADAL-GINARD (B.).
Type β transforming growth factor is an inhibitor of myogenic differentiation.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1986, 83, 8206-8210.

121. MASSAGUE (J.).
The TGF- β family of growth and differentiation factors.
Cell 1987, 49, 437-438.
122. MASUI (T.), WAKEFIELD (L.M.), LECHNER (J.F.), LAVECK (M.A.), SPORN (M.B.), HARRIS (C.C.)
Type β transforming growth factor is the primary differentiation inducing serum factor for normal human bronchial epithelial cells
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1986, 83, 2438-2442.
123. MITJAVILA (M.T.), VINCI (G.), VILLEVAL (J.L.), KIEFFER (N.), HENRI (A.), TESTA (U.), BRETON-GORIUS (J.), VAINCHENKER (W.).
Human platelet alpha granules contain a nonspecific inhibitor of megakaryocyte colony formation: its relationship to type β transforming growth factor (TGF- β).
J. Cell Physiol. 1988, 134, 93-100.
124. MIYAZONO (K.), OKABE (T.), URABE (A.), TAKAKU (F.), HELDIN (C.H.).
Purification and properties of endothelial cell growth factor from human platelets
J. Biol. Chem. 1987, 262, 4098-4103.
125. MIYAZONO (K.), HELLMAN (U.), WERNSTEDT (C.), HELDIN (C.H.).
Latent high molecular weight complex of transforming growth factor β 1
Purification from human platelets and structural characterization.
J. Biol. Chem. 1988, 263, 13, 6407-6415.
126. MIYAZONO (K.), HELDIN (C.H.).
High yield purification of platelet-derived endothelial cell growth factor: structural characterization and establishment of a specific antiserum.
Biochemistry 1989, 28, 1704-1710.
127. MIYAZONO (K.), TAKAKU (F.).
Platelet-derived growth factors.
Blood Reviews 1989, 3, 269-275.
128. MORERA (A.M.), COCHET (C.), KERAMIDAS (M.), CHAUVIN (M.A.), DE PERETTI (E.), BENHAMED (M.).
Direct regulating effects of transforming growth factor- β on the Leydig cell steroidogenesis in primary culture.
J Steroid. Biochem. 1988, 30, 443-447.

129. MURTHY (U.S.), ANZANO (M.A.), STADEL (J.M.), GRIEG (R.).
Coupling of TGF- β induced mitogenesis to G-protein activation in AKR-2B cells.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 1988, 152, 1228-1235.
130. MUSTOE (T.A.), PIERCE (G.F.), THOMASON (A.), GRAMATES (P.), SPORN (M.B.), DEUEL (T.F.).
Accelerated healing of incisional wounds in rats induced by transforming growth factor- β .
Science 1987, 237, 1333-1336.
131. NAKAMURA (T.), TOMITA (Y.), HIRAI (R.), YAMAOKA (K.), KAJI (K.), ICHIHARA (A.).
Inhibitory effect of transforming growth factor- β on DNA synthesis of adult rat hepatocytes in primary culture.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 1985, 133, 1042-1060.
132. NEWCOM (S.R.), KADIN (M.E.), ANSARI (A.A.), DIEHL (V.).
L-428 nodular sclerosing Hodgkin's cell secretes a unique transforming growth factor-beta active at physiologic pH.
J. Clin. Invest. 1988, 82, 1915-1921.
133. NISHIKAWA (K.), YOSHITAKE (Y.), IKUTA (S.).
Derivation of monoclonal antibody to human epidermal growth factor.
Methods Enzymol. 1987, 146, 11-22.
134. O'CONNOR-MAC COURT (M.D.), WAKEFIELD (L.M.).
Latent transforming growth factor- β in serum
A specific complex with α_2 -macroglobulin.
J Biol Chem 1987, 262, 14090-14099
135. OLSON (E.N.), STERNBERG (E.), HU (J.S.), SPIZZ (G.), WILCOX (C.).
Regulation of myogenic differentiation by type β transforming growth factor.
J. Cell. Biol. 1986, 103, 1799-1805.
136. PADGETT (R.W.), ST. JOHNSTON (R.D.), GELBART (W.M.).
A transcript from a Drosophila pattern gene predicts a protein homologous to the transforming growth factor-beta family.
Nature 1987, 325, 81-84.

137. PARKER (J.M.R.), GUO (D.), HODGES (R.S.).
New hydrophilicity scale derived from high-performance liquid chromatography peptide retention data: correlation of predicted surface residues with antigenicity and X-ray-derived accessible sites
Biochemistry 1986, 25, 5425-5432.
138. PEARSON (W.R.), LIPMAN (D.J.).
Improved tools for biological sequence comparison.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1988, 85, 2444-2448.
139. PIAO (Y.F.), ICHIJO (H.), MIYAGAWA (K.), OHASHI (H.), TAKAKU (F.), MIYAZONO (K.)
Latent form of transforming growth factor- β 1 acts as a potent growth inhibitor on a human erythroleukemia cell line
(Communication personnelle)
140. PIERCE (G.F.), MUSTOE (T.A.), LINGELBACH (J.), MASAKOWSKI (V.R.), GRIFFIN (G.L.), SENIOR (R.M.), DEUEL (T.F.).
Platelet-derived growth factor and transforming growth factor- β enhance tissue repair activities by unique mechanisms.
J. Cell. Biol. 1989, 109, 429-440.
141. PIRCHER (R.), JULLIEN (P.), LAWRENCE (D.A.).
 β -Transforming growth factor is stored in human blood platelets as a latent high molecular weight complex.
Biochem Biophys Res. Commun. 1986, 136, 1, 30-37.
142. RAINES (E.W.), ROSS (R.).
Purification of human platelet-derived growth factor.
Methods Enzymol. 1985, 109, 749-773.
143. RIZZINO (A.).
Transforming growth factor- β : multiple effects on cell differentiation and extracellular matrices.
Developmental Biol. 1988, 130, 411-422.
144. ROBERTS (A.B.), LAMB (L.C.), NEWTON (D.L.), SPORN (M.B.), DE LARCO (J.E.), TODARO (G.J.).
Transforming growth factors: isolation of polypeptides from virally and chemically transformed cells by acid/ethanol extraction.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1980, 77, 3494-3498.
145. ROBERTS (A.B.), ANZANO (M.A.), LAMB (L.C.), SMITH (J.M.), SPORN (M.B.).
New class of transforming growth factors potentiated by epidermal growth factor: isolation from non-neoplastic tissues.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1981, 78, 5339-5343.

146. ROBERTS (A.B.), ANZANO (M.A.), MEYERS (C.A.), WIDEMAN (J.), BLACHER (R.), PAN (Y.C.E.), STEIN (S.), LEHRMAN (S.R.), SMITH (J.M.), LAMB (L.C.), SPORN (M.B.)
Purification and properties of a type β transforming growth factor from bovine kidney
Biochemistry 1983, 22, 5692-5698.
147. ROBERTS (A.B.), FROLIK (C.A.), ANZANO (M.A.), SPORN (M.B.).
Transforming growth factors from neoplastic and non neoplastic tissues.
Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. 1983, 41, 2621-2626.
148. ROBERTS (A.B.), SPORN (M.B.).
Cellular biology and biochemistry of the retinoids.
In: SPORN (M.B.), ROBERTS (A.B.), GOODMAN (D.S.). (Eds.)
The retinoids.
Academic Press, New York, 1984, 2, 205-285.
149. ROBERTS (A.B.), ANZANO (M.A.), WAKEFIELD (L.M.), ROCHE (N.S.), STERN (D.F.), SPORN (M.B.).
Type β transforming growth factor: a bifunctional regulator of cellular growth.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1985, 82, 119-123
150. ROBERTS (A.B.), SPORN (M.B.), ASSOIAN (R.K.), SMITH (J.M.), ROCHE (N.S.), WAKEFIELD (L.M.), HEINE (U.I.), LIOTTA (L.A.), FALANGA (V.), KEHRL (J.H.).
Transforming growth factor type β : rapid induction of fibrosis and angiogenesis *in vivo* and stimulation of collagen formation *in vitro*
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1986, 83, 4167-4171.
151. ROBERTS (A.B.), FLANDERS (K.C.), KONDAIAH (P.), THOMPSON (N.L.), VAN OBBERGHEN-SCHILLING (E.), WAKEFIELD (L.), ROSSI (P.), DE COMBRUGGHE (B.), HEINE (U.I.), SPORN (M.B.).
Transforming growth factor β : biochemistry and roles in embryogenesis, tissue repair and remodeling, and carcinogenesis.
Rec Prog Horm. Res. 1988, 44, 157-197
152. ROBERTS (A.B.), SPORN (M.B.).
Transforming growth factor β .
Advances in cancer research 1988, 51, 107-145.

153. ROBERTS (A.B.), SPORN (M.B.).
The transforming growth factor-betas.
In :SPORN (M.B.), ROBERTS (A.B.). (Eds.)
Peptides growth factors and their receptors
Handbook of experimental pharmacology.
Springer-Verlag, Heidelberg, 1990, 95, 419-472.

154. ROBEY (P.G.), YOUNG (M.F.), FLANDERS (K.C.), ROCHE (N.S.), KONDAIAH (P.),
REDDI (A.H.), TERMINE (J.D.), SPORN (M.B.), ROBERTS (A.B.).
Osteoblasts synthesize and respond to transforming growth factor-beta *in vitro*
J Cell Biol 1987, 105, 457-463

155. RODLAND (K.D.), MULDOON (L.L.), MAGUN (B.E.).
Cellular mechanisms of TGF- β action.
J. Invest. Dermatol. 1990, 94, 335-405.

156. ROSEN (D.M.), STEMPIEN (S.A.), THOMPSON (A.Y.), SEYEDIN (P.R.).
Transforming growth factor-beta modulates the expression of osteoblast
and chondroblast phenotypes *in vitro*
J. Cell Physiol. 1988, 134, 337-346.

157. ROSS (R.), GLOMSET (J.), KARIYA (B.), HARKER (L.).
A platelet-dependent serum factor that stimulate the proliferation of
arterial smooth muscle cells *in vitro*
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1975, 71, 1207-1210.

158. ROUS (P.), JONES (F.S.).
A method for obtaining suspensions of living cells from the fixed tissues
and for plating out of individual cells
J. Exp. Med. 1916, 23, 549-555.

159. RUOSLAHTI (E.), PIERSCHBACHER (M.D.).
Arg-gly-asp: a versatile cell recognition signal.
Cell 1986, 44, 517-518.

160. RUSSELL (W.E.), COFFEY (R.J.), QUELETTE (A.J.), MOSES (H.L.).
Transforming growth factor beta reversibly inhibits the early
proliferative response to partial hepatectomy in the rat.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1988, 85, 5126-5130.

161. SAMPSON (I.A.), HODGEN (A.N.), ARTHUR (J.H.).
The separation of IgM from human serum by FPLC.
J. Immunol. Methods 1984, 69, 9-15.

162. SAMUELS (V.), BARRETT (J.M.), BOCKMAN (S.), PANTAZIS (C.G.), ALLEN (M.B.).
Immunocytochemical study of transforming growth factor expression in benign and malignant gliomas.
Am J Pathol 1989, 134, 895-902
163. SCHMAIER (A.H.).
Platelet forms of plasma proteins. plasma cofactors/substrates and inhibitors contained within platelets.
Seminars in Hematology 1985, 22, 187-202.
164. SEGARINI (P.R.), SEYEDIN (S.M.).
The high molecular weight receptor to transforming growth factor- β contains glycosaminoglycan chains.
J Biol Chem 1988, 17, 8366-8370
165. SEKIDO (Y.), MORISHIMA (Y.), OHYA (K.I.).
Activity of platelet-derived growth factor (PDGF) in platelet concentrates and cryopreserved platelets determined by PDGF bioassay.
Vox Sang. 1987, 52, 27-30.
166. SEYEDIN (S.M.), THOMAS (T.C.), THOMPSON (A.Y.), ROSEN (D.M.), PIEZ (K.A.)
Purification and characterization of two cartilage-inducing factors from bovine demineralized bone.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1985, 82, 2267-2271.
167. SEYEDIN (S.M.), THOMPSON (A.Y.), BENTZ (H.), ROSEN (D.M.), MAC PHERSON (J.M.), CONTI (A.M.), SIEGEL (N.R.), GALLUPPI (G.R.), PIEZ (K.A.).
Cartilage-inducing factor-A
Apparent identity to transforming growth factor- β .
J. Biol. Chem. 1986, 261, 5693-5695.
168. SEYEDIN (S.M.), SEGARINI (P.R.), ROSEN (D.M.), THOMPSON (A.Y.), BENTZ (H.), GRAYCAR (J.).
Cartilage-inducing factor-B is a unique protein structurally and functionally related to transforming growth factor- β .
J. Biol. Chem. 1987, 262, 1946-1949.
169. SILVER (I.A.), MURRILLS (R.J.), ETHERINGTON (D.J.).
Microelectrode studies on the acid microenvironment beneath adherent macrophages and osteoclasts.
Exp. Cell Res. 1988, 175, 266-276.

170. SMIDDY (W.E.), GLASER (B.M.), GREEN (W.R.), CONNOR (T.B.), ROBERTS (A.B.), LUCAS (R.), SPORN (M.B.).
Transforming growth factor beta
A biologic choriorretinal glue
Arch. Ophthalmol. 1989, 107, 577-580.
171. SPORN (M.B.), ROBERTS (A.B.), SHULL (J.H.), SMITH (J.M.), WARD (J.M.), SODECK (J.).
Polypeptide transforming growth factors isolated from bovine sources
and used for wound healing *in vivo*
Science 1983, 219, 1329-1331.
172. SPORN (M.B.), ROBERTS (A.B.).
Autocrine growth factors and cancer.
Nature 1985, 313, 745-747.
173. SPORN (M.B.), ROBERTS (A.B.).
Peptide growth factors and inflammation, tissue repair, and cancer.
J. Clin. Invest. 1986, 78, 329-332.
174. SPORN (M.B.), ROBERTS (A.B.), WAKEFIELD (L.M.), DE COMBRUGGHE (B.).
Some recent advances in the chemistry and biology of transforming
growth factor-beta.
J. Cell Biol. 1987, 105, 1039-1045.
175. SPORN (M.B.), ROBERTS (A.B.).
Peptide growth factors are multifunctional.
Nature 1988, 332, 217-219.
176. STEEN (V.M.), HOLMSEN (H.).
Current aspects on human platelet activation and responses.
Eur. J. Haematol. 1987, 38, 383-399.
177. STRASSMANN (G.), CONE (J.L.), ARTHUR (P.M.), GUERTRIN (M.),
HERRFELDT (J.).
Effects of platelet-derived transforming growth factor (TGF) type $\beta 1$ on
murine inflammatory mononuclear phagocytes: increased fibronectin
production
Cell. Immunol. 1989, 121, 306-316.
178. TEMIN (H.M.).
Studies on carcinogenesis by avian sarcoma viruses. III. The differential
effect of serum and polyanions on multiplication of uninfected and
converted cells.
J. Natl. Cancer Inst. 1966, 37, 167-175.

179. TEN DIJKE (P.), HANSEN (P.), IWATA (K.K.), PIELER (C.), FOULKES (J.G.).
Identification of another member of transforming growth factor type β gene family.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1988, 85, 4715-4719.
180. THOMPSON (N.L.), BAZOBERRY (F.), SPEIR (E.H.), CASSCELLS (W.), FERRANS (V.J.), FLANDERS (K.C.), KONDAIAH (P.), GEISER (A.G.), SPORN (M.B.).
Transforming growth factor beta1 in acute myocardial infarction in rats.
Growth Factors 1988, 1, 91-99.
181. THOMPSON (N.L.), FLANDERS (K.C.), SMITH (J.M.), ELLINGSWORTH (L.R.), ROBERTS (A.B.), SPORN (M.B.).
Expression of transforming growth factor- β 1 in specific cells and tissues of adult and neonatal mice.
J. Cell Biol. 1989, 108, 661-669.
182. TODARO (G.J.), FRYLING (C.), DE LARCO (J.E.).
Transforming growth factors produced by certain human tumor cells: polypeptides that interact with epidermal growth factor receptors.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1980, 77, 5258-5262.
183. TORRE-AMIONE (G.), BEAUCHAMP (R.D.), KOEPPEN (H.), PARK (B.H.), SCHREIBER (H.), MOSES (H.L.), ROWLEY (D.A.).
A highly immunogenic tumor transfected with a murine transforming growth factor type β 1 cDNA escapes immune surveillance
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1990, 87, 1486-1490.
184. TUCKER (R.F.), BRANUM (E.L.), SHIPLEY (G.D.), RYAN (R.J.), MOSES (H.L.).
Specific binding to cultured cells of ^{125}I -labeled type β transforming growth factor from human platelets.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1984, 81, 6757-6761.
185. VALE (W.), RIVIER (J.), VAUGHAN (J.), MAC CLINTOCK (R.), CORRIGAN (A.), WOO (W.), KARR (D.), SPIESS (J.).
Purification and characterization of a FSH releasing protein from porcine ovarian follicular fluids.
Nature 1986, 321, 776-779
186. VAN DEN EIJNDEN-VAN RAIJ (A.J.M.), KOORNNEEF (I.), VAN ZOELLEN (E.J.J.).
A new method for high yield purification of type beta transforming growth factor from human platelets.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 1988, 157, 16-23.

187. VAN REGENMORTEL (M.H.V.).
Definition of antigenicity in proteins and peptides.
In: PEETERS (H.). (Ed.)
Protides of the biological fluids
Pergamon Press, Oxford, 1986, 34, 81-86.
188. VAN REGENMORTEL (M.H.V.).
The molecular basis of cross-reactive antigenicity in proteins and peptides.
In: ALBERTINI (A.), LENFANT (C.), PAOLETTI (R.). (Eds.)
Biotechnology in clinical medicine.
Raven Press, New York, 1987, 197-204
189. VAN REGENMORTEL (M.H.V.), DE MARCILLAC (G.D.).
An assessment of prediction methods for locating continuous epitopes in proteins.
Immunol. Letters 1988, 17, 95-107.
190. WAHL (S.M.), HUNT (D.A.), WAKEFIELD (L.M.), MAC CARTNEY-FRANCIS (N.),
WAHL (L.M.), ROBERTS (A.B.), SPORN (M.B.)
Transforming growth factor type β induces monocyte chemotaxis and
growth factor production
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1987, 84, 5788-5792.
191. WAKEFIELD (L.M.).
An assay for type- β transforming growth factor receptor.
Methods Enzymol. 1987, 146, 167-173.
192. WAKEFIELD (L.M.), SMITH (D.M.), MASUI (T.), HARRIS (C.C.), SPORN (M.B.).
Distribution and modulation of cellular receptor for transforming growth
factor-beta.
J. Cell. Biol. 1987, 105, 965-975.
193. WAKEFIELD (L.M.), SMITH (D.M.), FLANDERS (K.C.), SPORN (M.B.).
Latent transforming growth factor- β from human platelets
A high molecular weight complex containing precursor sequences.
J. Biol. Chem. 1988, 263, 7646-7654.
194. WAKEFIELD (L.M.), SMITH (D.M.), BROZ (S.), JACKSON (M.), LEVINSON (A.D.),
SPORN (M.B.).
Recombinant TGF- β 1 is synthesised as a two-component latent complex
that shares some structural features with the native platelet latent TGF-
 β 1 complex.
Growth Factors 1989, 1, 203-218.



195. WALTER (G.).
Production and use of antibodies against synthetic peptides.
J. Immunol. Methods 1986, 88, 149-161
196. WANG (E.A.), KRIZ (M.), LUXENBERG (D.), SIBLEY (B.), ROSEN (V.),
WOZNEY (J.M.).
Purification and characterization of novel bone-inducing factors (bone
morphogenetic protein/bone formation).
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1988, 85, 9484-9488.
197. WATERFIELD (D.M.), SCRACE (G.T.), WHITTLE (N.), STROOBANT (P.),
JOHNSSON (A.), WASTESON (A.), HELDIN (C.H.), HUANG (J.S.), DEUEL (T.F.).
Platelet-derived growth factor is structurally related to the putative
transforming protein p28 sis of simian sarcoma virus.
Nature 1983, 304, 35-39.
198. WEEKS (D.L.), MELTON (D.A.).
A maternal mRNA localized to the vegetal hemisphere in *Xenopus* eggs
codes for a growth factor related to TGF- β .
Cell 1987, 51, 861-867.
199. WELLING (G.W.), WEIJER (W.J.), VAN DE ZEE (R.), WELLING-WESTER (S.)
Prediction of sequential antigenic regions in proteins.
FEBS Lett. 1985, 188, 215-218.
200. WOZNEY (J.M.), ROSEN (V.), CELESTE (A.S.), MITSOCK (I.M.), WHITTERS (M.J.),
KRIZ (R.W.), HEWICK (R.M.), WANG (E.A.).
Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities.
Science 1988, 242, 1528-1534.
201. WRANN (M.), BODMER (S.), DE MARTIN (R.), SIELP (C.), HOFER-WARBINEK (R.),
FREI (K.), HOFER (E.), FONTANA (A.).
T cell suppressor factor from human glioblastoma cells is a 12.5 kd
protein closely related to transforming growth factor- β .
EMBO J. 1987, 6, 1633-1636.
202. YARDUMIAN (D.A.), MACKIE (I.J.), MACHIN (S.J.).
Laboratory investigation of platelet function: a review of methodology.
J. Clin. Pathol. 1986, 39, 701-712.
203. YING (S.Y.), BECKER (A.), LING (N.), UENO (N.), GUILLEMIN (R.).
Inhibin and beta type transforming growth factor (TGF- β) have opposite
modulating effects on the follicle stimulating hormone (FSH)-induced
aromatase activity of cultured rat granulosa cells.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 1986, 136, 969-975.

Thèse réalisée par REPRO CENTER

*Centre Commercial de BRABOIS
54500 VANDOEUVRE*

Tél: 83.44.05.69

CONTRIBUTION A LA PURIFICATION DE FACTEURS DE CROISSANCE HUMAINS D'ORIGINE PLAQUETTAIRE : LE TRANSFORMING GROWTH FACTOR-BETA 1 (TGF- β 1)

RESUME

Après étude antigénique de la séquence primaire du TGF- β 1 par prédiction d'épitopes continus, un peptide synthétique C terminal (C-91-106) a été utilisé pour la production d'anticorps polyclonaux chez le lapin. Ces anticorps caractérisés par diverses méthodes (ELISA, immunoblotting ...) ont été purifiés par chromatographie d'immuno-affinité et utilisés en immunohistochimie et pour l'immunopurification du TGF- β 1 humain d'origine plaquettaire. D'autres méthodes de purification, principalement chromatographiques, ont été expérimentées pour isoler le TGF- β 1 dans la perspective d'un schéma de purification, plus global, d'autres facteurs de croissance humains d'origine plaquettaire.

MOTS-CLES : Transforming Growth Factor-Beta (TGF- β), anticorps polyclonaux, purification, immunopurification