

THESE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

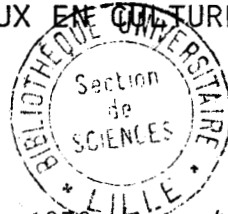
pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE TROISIEME CYCLE

par

Colette FOURNIER

MICROHÉTÉROGÉNÉITÉ DE L'ALPHA-FOETOPROTÉINE DE RAT
PRODUITE IN VIVO PAR L'EMBRYON ET IN VITRO PAR DES
HEPATOCYTES FOETAUX EN CULTURE PRIMAIRE



Soutenue le 11 Décembre 1979, devant la Commission d'Examen

Membres du Jury :

Président : M. J. MONTREUIL

Rapporteur : M. G. BISERTE

Examineurs : Mlle G. SPIK

M. B. BAYARD

M. J.P. KERCKAERT

DOYENS HONORAIRES De l'Ancienne Faculté des Sciences

MM. R.DEFRETIN, H.LEFEBVRE, M.PARREAU.

PROFESSEURS HONORAIRES des Anciennes Facultés de Droit
et Sciences Economiques, des Sciences et des Lettres

MM. ARNOULT, Mme BEAUJEU, BONTE, BROCHARD, CHAPPELON, CHAUDRON, CORDONNIER, CORSIN, DECUYPER, DEHEUVELS, DEHORS, DION, FAUVEL, FLEURY, P.GERMAIN, GLACET, GONTIER, HEIM DE BALSAC, HOCQUETTE, KAMPE DE FERIET, KOUGANOFF, LAMOTTE, LASSERRE, LELONG, Mme LELONG, LHOMME, LIEBAERT, MARTINOT-LAGARDE, MAZET, MICHEL, PEREZ, ROIG, ROSEAU, ROUELLE, SAVARO, SCHILTZ, WATERLOT, WIEMAN, ZAMANSKI.

ANCIENS PRESIDENTS DE L'UNIVERSITE
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

MM. R.DEFRETIN, M.PARREAU, J.LOMBARD.

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

M. M.MIGEON.

PROFESSEURS TITULAIRES

M. BACCHUS Pierre	Astronomie
M. BEAUFILS Jean-Pierre	Chimie Physique
M. BILLARD Jean	Physique du Solide
M. BIAYS Pierre	Géographie
M. BONNOT Ernest	Biologie Végétale
M. BOUGHON Pierre	Algèbre
M. BOURIQUET Robert	Biologie Végétale
M. CELET Paul	Géologie Générale
M. COEURE Gérard	Analyse
M. CONSTANT Eugène	Electronique
M. CORDONNIER Vincent	Informatique
M. DEBOURSE Jean-Pierre	Gestion des Entreprises
M. DELATTRE Charles	Géologie Générale
M. DELHAYE Michel	Chimie Physique
M. DERCOURT Jean	Géologie Générale
M. DURCHON Maurice	Biologie Expérimentale
M. FAURE Robert	Mécanique
M. FOURET René	Physique du Solide
M. GABILLARD Robert	Electronique
M. GRANELLE Jean-Jacques	Sciences Economiques
M. GRUSON Laurent	Algèbre
M. GUILLAUME Jean	Microbiologie
M. HECTOR Joseph	Géométrie
M. HEUBEL Joseph	Chimie Minérale
M. LABLACHE-COMBIER Alain	Chimie Organique

M. LACOSTE Louis	Biologie Végétale
M. LANSRAUX Guy	Physique Atomique et Moléculaire
M. LAVEINE Jean-Pierre	Paléontologie
M. LEBRUN André	Electronique
M. LEHMANN Daniel	Géométrie
Mme LENOBLE Jacqueline	Physique Atomique et Moléculaire
M. LHOMME Jean	Chimie
M. LINDER Robert	Biologie et Physiologie Végétales
M. LOMBARD Jacques	Sociologie
M. LOUCHEUX Claude	Chimie Physique
M. LUCQUIN Michel	Chimie Physique
M. MAILLET Pierre	Sciences Economiques
M. MONTREUIL Jean	Biochimie
M. PARREAU Michel	Analyse
M. PAQUET Jacques	Géologie Générale
M. PROUVOST Jean	Minéralogie
M. SALMER Georges	Electronique
Mme SCHWARTZ Marie-Hélène	Géométrie
M. SEGUIER Guy	Electrotechnique
M. STANKIEWICZ François	Sciences Economiques
M. TILLIEU Jacques	Physique Théorique
M. TRIDOT Gabriel	Chimie Appliquée
M. VIDAL Pierre	Automatique
M. VIVIER Emile	Biologie Cellulaire
M. WERTHEIMER Raymond	Physique Atomique et Moléculaire
M. ZEYTOUNIAN Radyadour	Mécanique

PROFESSEURS SANS CHAIRE

M. BELLET Jean	Physique Atomique et Moléculaire
M. BKOUCHE Rudolphe	Algèbre
M. BODARD Marcel	Biologie Végétale
M. BOILLY Bénoni	Biologie Animale
M. CAPURON Alfred	Biologie Animale
M. CARREZ Christian	Informatique
M. CORTOIS Jean	Physique Nucléaire et Corpusculaire
Mme DACHARRY Monique	Géographie
M. DEVRAINNE Pierre	Chimie Minérale
M. GOSSELIN Gabriel	Sociologie
M. GOUDMAND Pierre	Chimie Physique
M. GUILBAULT Pierre	Physiologie Animale
M. HERMAN Maurice	Physique Spatiale
M. JOURNEL Gérard	Physique Atomique et Moléculaire
Mme LEHMANN Josiane	Analyse
M. LENTACKER Firmin	Géographie
M. LOUAGE Francis	Electronique
M. MAIZIERES Christian	Automatique
Mlle MARQUET Simone	Probabilités
M. MESSELYN Jean	Physique Atomique et Moléculaire
M. MIGEON Michel	Chimie Physique
M. MONTEL Marc	Physique du Solide
M. RACZY Ladislas	Electronique
M. ROUSSEAU Jean-Paul	Physiologie Animale
M. SLIWA Henri	Chimie Organique
M. WATERLOT Michel	Géologie Générale

MAITRES DE CONFERENCES (et Chargés d'Enseignement)

M. AL FAKIR Sabah	Algèbre
M. ANTOINE Philippe	Analyse
M. BART André	Biologie Animale
Mme BATTIAU Yvonne	Géographie
M. BEGUIN Paul	Mécanique
M. BOBE Bernard	Sciences Economiques
M. BONNELLE Jean-Pierre	Chimie
M. BOSCOQ Denis	Probabilités
M. BREZINSKI Claude	Analyse Numérique
M. BRUYELLE Pierre	Géographie
M. CHAMLEY Hervé	Géotechnique
M. COQUERY Jean-Marie	Psychophysologie
M. COURBIS Bernard	Sciences Economiques
M. COUTURIER Daniel	Chimie Organique
M. DEBRABANT Pierre	Géologie Appliquée
M. DEGAUQUE Pierre	Electronique
M. DELORME Pierre	Physiologie Animale
M. DE PARIS Jean-Claude	Mathématiques
M. DHAINAUT André	Biologie Animale
M. DOUKHAN Jean-Claude	Physique du Solide
M. DUBOIS Henri	Physique
M. DUBRULLE Alain	Physique
M. DUEE Gérard	Géologie
M. DYMENT Arthur	Mécanique
M. ESCAIG Bertrand	Physique du Solide
M. FLAMME Jean-Marie	Technologie de Construction
M. FONTAINE Hubert	Physique
M. GAMBLIN André	Géographie
M. GOBLOT Rémi	Algèbre
M. GREVET Patrick	Sciences Economiques
M. JACOB Gérard	Informatique
M. KREMBEL Jean	Biochimie
M. LAURENT François	Automatique
Mlle LEGRAND Denise	Algèbre
Mlle LEGRAND Solange	Algèbre
M. LEVASSEUR Michel	Sciences Economiques
M. LHENAFF René	Géographie
M. LOCQUENEUX Robert	Physique Théorique
M. LOSFELD Joseph	Informatique
M. MACKE Bruno	Physique
M. MIGNOT Fulbert	Analyse Numérique
M. N'GUYEN VAN CHI Régine	Géographie
M. PARSY Fernand	Mécanique
Mlle PAUPARDIN Colette	Biologie Physiologie Végétales
M. PERROT Pierre	Chimie Appliquée
M. PERTUZON Emile	Physiologie Animale
M. PONSOLLE Louis	Chimie Physique
M. POVY Lucien	Automatique
M. RICHARD Alain	Biologie
M. RIETSCH François	Chimie
M. ROGALSKI Marc	Analyse
M. ROY Jean-Claude	Psychophysologie
M. SALAMA Pierre	Sciences Economiques
Mme SCHWARZBACH Yvette	Mathématiques
M. SIMON Michel	Sociologie
M. SOMME Jean	Géographie

M^{lle} SPIK Geneviève
M. STERBOUL François
M. TAILLIEZ Roger
M. TOULOTTE Jean-Marc
M. TREANTON Jean-René
M. VANDORPE Bernard
M. WALLART Francis
M^{me} ZINN-JUSTIN Nicole

Biochimie
Informatique
Biologie
Automatique
Sociologie
Chimie Minérale
Chimie
Algèbre

Ce travail a été réalisé sous la direction
de Messieurs Bernard Bayard et Jean-Pierre Kerckaert
à l'Institut de Recherches sur le Cancer de Lille
(Institut Jules Driessens) et Unité 124 de l'INSERM
(Directeur : Professeur Gérard Biserte).

Monsieur le Professeur J. MONTREUIL m'a fait l'honneur de présider le jury de cette thèse. Qu'il veuille bien accepter mes remerciements respectueux.

Monsieur le Professeur G. BISERTE a bien voulu m'accueillir à l'Institut de Recherches sur le Cancer de Lille où il m'a permis d'effectuer ce travail dans de bonnes conditions. Qu'il trouve ici l'expression de ma sincère gratitude et de mon profond respect.

Messieurs B. BAYARD et J.P. KERCKAERT m'ont proposé le sujet de cette thèse et m'ont guidée dans ce travail. Depuis mon arrivée au laboratoire, j'ai pu apprécier leurs qualités scientifiques, leur enthousiasme pour la Recherche et leur dynamisme. Qu'il me soit permis ici de leur témoigner ma plus sincère reconnaissance.

Je remercie Mademoiselle G. SPIK d'avoir accepté de juger ce travail.

Madame Maud COLLYN m'a permis d'effectuer dans son laboratoire la mise en culture des foies foetaux de rat. Je la remercie vivement pour son aide efficace et sa gentillesse. J'associe à ces remerciements Mesdames J. GOUTTAS et D. LANTOINE pour la réalisation technique des cultures de cellules.

Je tiens à remercier tout particulièrement Mesdames Sabine QUIEF et Danièle ROUX pour leur grande compétence et la bonne humeur qu'elles font constamment régner au laboratoire. Madame QUIEF a, en outre, réalisé la technique d'immuno-affino-électrophorèse bidimensionnelle.

Je ne saurais terminer sans remercier mes camarades de l'I.R.C.L. pour l'ambiance chaleureuse et détendue dans laquelle nous avons travaillé.

Je tiens également à remercier Mademoiselle M.C. LECOUTRE ainsi que Madame M. BLANQUET qui m'ont aidée dans la réalisation dactylographique de cette thèse. Madame GARET en a assuré la réalisation photographique et Madame SAINLEGER l'impression ; qu'elles en soient ici remerciées.

ABREVIATIONS

AAF	:	Acétylaminofluorène
AFP	:	Alpha-foetoprotéine
AMPc	:	3',5'-Adénosine monophosphate cyclique
Con A	:	Concanavoline A
DMFA	:	N,N-Diméthylformamide
DMSO	:	Diméthylsulfoxyde
DNA	:	Acide desoxyribonucléique
LCA	:	<u>Lens culinaris</u>
MC	:	Milieu de culture
3'Me 4 DAB	:	4-Diméthylamino-3'-méthylazobenzène
PBS	:	Phosphate buffered saline Tampon phosphate : Phosphate 0,1 M ; NaCl 0,15 M pH 7,2.

T A B L E d e s M A T I E R E S

	Pages
<u>INTRODUCTION</u>	1
<u>GENERALITES</u>	3
1 - DEFINITION DES ONCOFOETOPROTEINES	4
2 - L'ALPHA-FOETOPROTEINE : DECOUVERTE ET INTERET	5
3 - L'ALPHA-FOETOPROTEINE EN OBSTETRIQUE	6
3.1. L'alpha-foetoprotéine au cours de la gestation normale	6
3.2. Pathologie du foetus	7
4 - L'ALPHA-FOETOPROTEINE EN CANCEROLOGIE	8
5 - PROPRIETES BIOCHIMIQUES	10
5.1. Purification	10
5.2. Propriétés physicochimiques et immunolo- giques	11
5.3. Hétérogénéité protéique	11
5.4. Hétérogénéité glycanique	13
6 - PROPRIETES BIOLOGIQUES DE L'ALPHA-FOETOPROTEINE	16
6.1. L'AFP est-elle une albumine foetale ? ...	16
6.2. Rôle de fixation des oestrogènes	18
6.3. Action sur la croissance cellulaire	20
6.4. Rôle immunosuppresseur	21
7 - METABOLISME DE L'ALPHA-FOETOPROTEINE	22
7.1. Sites de synthèse	22
7.2. Phase de synthèse durant le cycle cellulaire	24
7.3. L'alpha-foetoprotéine et la prolifération cellulaire	24
7.4. Catabolisme	25
<u>TRAVAUX PERSONNELS</u>	26
<u>INTRODUCTION</u>	27
<u>MATERIEL ET METHODES</u>	29

	Pages
1 - FRACTIONNEMENT DE L'ALPHA-FOETOPROTEINE	29
1.1. Purification de l'AFP	29
Isolement de l'anti-AFP	29
Isolement de l'AFP	29
1.2. Chromatographie d'affinité sur colonne de lectine de <u>Ricinus communis</u>	31
Préparation et couplage de la lectine	31
Chromatographie d'affinité sur la colonne de RCA _I -Sepharose	31
1.3. Chromatographie d'affinité sur colonne de Concanavaline A	31
1.4. Immuno-affino-électrophorèse bidimensionnelle	32
2 - CULTURES PRIMAIRES D'HEPATOCYTES FOETAUX DE RAT	32
2.1. Mise en culture des hépatocytes	32
2.2. Détermination du nombre de cellules	34
2.3. Dosage de l'AFP et de l'albumine	34
Principe du dosage	34
Préparation des immunosérums mono- spécifiques	34
Electroimmunodiffusion	35
<u>RESULTATS</u>	36
1 - <u>ETUDE BIOCHIMIQUE COMPAREE DES ISOAFP SYNTHETISEES</u> <u>IN VIVO ET IN VITRO</u>	36
1.1. Hétérogénéité protéique	36
1.2. Hétérogénéité glycanique	37
a) Etude des isoAFP par chromatographie d'affinité sur colonne de lectines immo- bilisées	37
b) Etude des isoAFP en immuno-affino-électro- phorèse bidimensionnelle	39
c) Origine tissulaire de l'AFP	43
d) Recherche de modifications biochimiques des isoAFP produites <u>in vivo</u> et <u>in vitro</u>	45
e) Synthèse des isoAFP en culture primaire de cellules de foie foetal	48
2 - <u>ETUDE DE L'INFLUENCE DE CERTAINS FACTEURS SUR LA</u> <u>PRODUCTION ET LA QUALITE DES ISOAFP SECRETEES</u> <u>IN VITRO EN CULTURE PRIMAIRE D'HEPATOCYTES FOETAUX</u>	51
2.1. Etude de l'action d'agents chimiques modifiant le cycle cellulaire	53
2.2. Influence de l'AMPc et de la Théophylline sur la production d'AFP	55
2.3. Influence d'un cancérogène : l'acétylamino- fluorène sur la production d'AFP	58

	Pages
<u>DISCUSSION</u>	64
1 - ETUDE BIOCHIMIQUE COMPAREE DES ISOAFP SYNTHETISEES <u>IN VIVO ET IN VITRO</u>	64
2 - ETUDE DE LA PRODUCTION D'AFP PAR DES CULTURES PRIMAIRES D'HEPATOCYTES FOETAUX	68
2.1. Action d'agents chimiques modifiant la cycle cellulaire	68
2.2. Influence de l'AMPc et de la Théophylline sur la production d'AFP	70
2.3. Influence d'un cancérogène : l'acétylamino- fluorène sur la production d'AFP	71
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	72

INTRODUCTION

Actuellement, la compréhension du phénomène du cancer pose encore de nombreux problèmes, or de cette connaissance, dépendent la prévention et le traitement de la maladie.

Les différences entre les cellules normales et les cellules cancéreuses sont très nombreuses. Entre autres, les cellules tumorales produisent souvent des substances que ne synthétisent pas les cellules normales chez l'adulte, mais qui peuvent être produites par l'embryon. Ces substances sont appelées antigènes carcino-embryonnaires ou onco-foetaux. Parmi les plus connues, il faut citer le carcino-embryonic Antigen (CEA) et l'alpha-foetoprotéine (AFP).

L'alpha-foetoprotéine, d'abord mise en évidence dans le sérum embryonnaire, a ensuite été retrouvée dans le sérum de sujets porteurs de cancer primitif du foie. L'étude de cette protéine onco-foetale comporte de nombreux aspects: biochimique, biologique et clinique. Ce dernier aspect est sans doute le plus important par le fait que, d'une part, la présence de l'alpha-foetoprotéine dans le sérum de l'adulte est caractéristique d'un certain nombre de maladies dont certains cancers par exemple ; et que d'autre part, la détection d'un taux élevé ou trop bas chez le fœtus ou dans le sérum maternel peut être d'une aide précieuse pour le dépistage précoce de certaines maladies de l'embryon.

L'étude au niveau cellulaire et in vitro de l'alpha-foetoprotéine, que l'on peut considérer comme un marqueur de la prolifération cellulaire hépatique, devrait permettre une meilleure compréhension de certains phénomènes et mécanismes de la différenciation et de la dédifférenciation cellulaire. C'est dans ce sens que nous avons abordé l'étude de la production de l'alpha-foetoprotéine au cours du cycle cellulaire d'hépatocytes foetaux de Rat en culture et sous l'action de drogues et de divers effecteurs. Ceci nous a permis d'établir une comparaison biochimique de l'alpha-foetoprotéine

produite in vivo et in vitro.

Une partie des résultats que nous exposons dans ce mémoire a fait l'objet de la publication suivante :

- C. FOURNIER, J. P. KERCKAERT, B. BAYARD, M. COLLYN & G. BISERTE
Crossed lectin-immuno-electrophoresis of in vivo and in vitro
produced rat alphafetoprotein.

In : Protides of Biological Fluids, Vol. 27, Peeters ed., Brussels
(sous presse)

Nous avons en outre collaboré à d'autres travaux ne figurant pas dans le cadre de ce mémoire :

- J. P. KERCKAERT, B. BAYARD, C. FOURNIER, S. QUIEF & G. BISERTE
Carbohydrate variations in alphafetoprotein of fetal and hepatoma-bearing rat, mouse and human sera, evidenced by crossed immuno-affino-electrophoresis.

In : Carcino-embryonic Proteins, Vol. 2, Lehmann F. G. ed.,
Elsevier/North-Holland Biomedical Press, p. 271-276 (1979).

- B. BAYARD, J. P. KERCKAERT, C. FOURNIER, D. ROUX & G. BISERTE
Copper binding properties of human alphafetoprotein.

In : Carcino-embryonic Proteins, Vol. 2, Lehmann F. G. ed,
Elsevier/North-Holland Biomedical Press, p. 291-296 (1979).

GENERALITES

1 - DEFINITION DES ONCOFOETOPROTEINES

L'un des phénomènes ayant suscité le plus vif intérêt depuis 15 ans est probablement les analogies observées entre le tissu embryonnaire et le tissu cancéreux. Des études sur la composition du sérum ont permis de mettre en évidence des protéines particulières du sérum foetal ou du sérum nouveau-né qui sont absentes dans le sérum de l'adulte normal.

C'est Pedersen qui, en 1944 (128), a identifié la première protéine de ce groupe, la fétuine, dans le sérum de veau. En 1956, Bergstrand et Czar (32) mettent en évidence chez l'Homme, dans le sérum du cordon, une α -globuline non détectable dans le sérum adulte. En 1932, Hirzfeld et al (68) avaient déjà suggéré que des protéines embryo-spécifiques pouvaient être synthétisées par des cellules tumorales, mais c'est seulement en 1963 que Abelev démontre la présence, dans le sérum foetal, ainsi que dans le sérum de Souris porteuses de tumeurs transplantables du foie (1,4), d'un même antigène : l'alpha-foetoprotéine (AFP).

L'AFP est retrouvée ensuite par Tatarinov, en 1964 (173), chez un malade porteur d'un carcinome hépatocellulaire.

D'autres protéines de ce groupe ont été découvertes depuis et, en particulier, le carcino-embryonic Antigen (CEA), en 1965, par Gold et Freedman (57). Ces protéines, encore appelées antigènes cellulaires transitoires (187), se classent en trois catégories comme le montre le tableau suivant (d'après Fishman et al) (49).

TABLEAU I.- Classification des protéines carcinoembryonnaires d'après Fishman et al. (49).

PROTEINES CARCINOEMBRYONNAIRES		
ANTIGENES EMBRYONNAIRES		
CARCINOFOETALES	CARCINOFOETOPLAGENTALES	CARCINOPLACENTALES
<ul style="list-style-type: none"> - CEA - α-Foetoprotéine - Isoenzymes foetales - Hexokinase - Aldolase 	<ul style="list-style-type: none"> - Isoferritines acides - Pyruvate kinase 	<ul style="list-style-type: none"> - Isoenzymes <ul style="list-style-type: none"> Regan isoenzyme Nagao isoenzyme Regan variant-Warnock - Hormones polypeptides <ul style="list-style-type: none"> Gonadotrophine chorionique Lactogène placental - Autres protéines <ul style="list-style-type: none"> Activateurs de plasminogène Facteur d'angiogénèse

Il faut noter que l'alpha-foetoprotéine est différente de la fétuine de Pedersen (77), ces deux protéines ont été confondues pendant un certain temps.

2 - L'ALPHA-FOETOPROTEINE : DECOUVERTE ET INTERET

L' AFP, largement étudiée chez le Rat (166,167) et chez l'Homme (3, 191), a été retrouvée dans de nombreux cas d'hépatomes, tératomes et lésions hépatiques (2). L'introduction des méthodes de dosages telles que l'immunoradioautographie (5) et le dosage radio immunologique (RIA : radioimmunoassay) (140) a permis d'augmenter considérablement la sensibilité de la détection de l'alpha-foetoprotéine dans le sérum.

L'AFP a d'abord été retrouvée dans le sérum de sujet hépatomateux, dans le sérum foetal et le sérum de nouveau-né, dans le sérum de la femme enceinte (2). Par la technique de RIA, de

nombreux auteurs (39, 66, 120, 132, 133, 141, 146) ont prouvé qu'elle était présente chez tous les sujets adultes sains à des taux extrêmement faibles. La concentration sérique normale se situe, en général, en-dessous de 10 ng/ml. Les valeurs moyennes normales sont : 2,6 ng/ml pour Masseyeff et al (102) (sensibilité 0,1 ng/ml) ; 7,6 ng/ml pour Ruoslahti et Seppälä (140) (sensibilité 0,25 ng/ml). Cependant, la majorité des auteurs s'accorde pour admettre que des concentrations supérieures à 20 ng/ml sont anormales (36, 66, 123, 139). La présence de traces d'alpha-foetoprotéine dans le sérum adulte indique donc que la répression de la synthèse de l'AFP après la naissance n'est pas totale. Les taux d'AFP ne sont pas influencés par le sexe ; ils décroissent considérablement au cours de la première année (de plus 10 000 ng/ml à 6 ng/ml) et varient peu avec l'âge. Chayvialle et Ganguli (39) ont cependant souligné l'existence d'une relation entre l'âge et le taux d'alpha-foetoprotéine, avec une élévation progressive entre vingt et cinquante ans suivie d'un plateau jusqu'à soixante ans, puis d'une décroissance.

3 - L'ALPHA-FOETOPROTEINE EN OBSTETRIQUE

3.1. L'alpha-foetoprotéine au cours de la grossesse normale

L'alpha-foetoprotéine, produite au cours de la grossesse, se retrouve dans les différents compartiments foeto-maternels :

- le sérum foetal,
- le sang du cordon,
- le sérum maternel,
- le liquide amniotique.

Sérum foetal : L'alpha-foetoprotéine est la protéine la plus importante du sérum embryonnaire dès le premier mois de la gestation. Chez le foetus, la concentration sérique est maximale entre les douzième et quatorzième semaines de la gestation, puis décroît jusqu'à la naissance (53). Cependant, la quantité totale (et non plus la concentration)

présente chez le fœtus augmente jusqu'à la vingt-deuxième semaine, puis diminue au-delà de la trente-deuxième semaine.

Sang du cordon : Cette courbe suit celle de la concentration de l'AFP dans le sang du cordon (54). Chez le nouveau-né à terme, la concentration sérique d'AFP est de 50 à 150 µg/ml (141).

Sérum maternel : Dans le sérum de la femme enceinte, la concentration d'AFP augmente entre les septième et douzième semaines de gestation, les concentrations maximales s'observent entre la vingt-huitième et la trente-sixième semaine (156). On observe donc un décalage entre les concentrations maximales du sérum maternel et du sérum foetal. Au cours d'une grossesse normale, la concentration d'AFP dans le sérum de la mère ne dépasse pas 500 ng/ml. Ce taux chute au moment de la naissance et retrouve une valeur normale, vingt à vingt-cinq jours après la délivrance (156). A la fin de la grossesse, il existe une corrélation entre les concentrations foetale et maternelle, un taux élevé chez la mère correspond à un taux élevé chez le fœtus (154). Cette corrélation ainsi que le fait que la concentration est plus élevée chez la multipare, traduisent l'origine essentiellement foetale de l'AFP transmise à la fois par le système circulatoire maternel et le liquide amniotique (88, 141).

Liquide amniotique : La concentration d'AFP est également élevée, maximale vers la quinzième semaine (154), puis décroît comme celle de l'AFP du sérum foetal.

3.2. Pathologie du fœtus

Le dosage de l'AFP au cours de la grossesse dans le sérum foetal, le sérum maternel ou le liquide amniotique, constitue actuellement une méthode de dépistage de grossesses pathologiques (154). En effet, les concentrations d'AFP s'élèvent dans de nombreux cas de détresse foetale allant jusqu'à la mort foetale intra-utérine. Il existe cependant, des cas de déficience foetale sans variation du taux d'AFP et parfois, ces taux peuvent être plus bas que la normale. Dans les grossesses compliquées d'immunisation maternelle Rhésus ou de diabète, les valeurs sont généralement supé-

rieures à la moyenne (154). Ces taux ont tendance à être inférieurs à la normale pour les foetus de mères toxémiques ou atteintes d'hypertension (157). Dans de nombreux cas de désordres foetaux congénitaux et lors de malformations du tube neural, les taux d'AFP sont élevés dans le liquide amniotique. La détection de ces concentrations élevées associée à un examen ultrasonique peut permettre un diagnostic précoce. Dans les cas ayant des antécédents familiaux (accouchements antérieurs d'enfants atteints de ces maladies, comme l'anencéphalie, le spina bifida et les déficiences du tube neural), on peut être conduit à une interruption prématurée de la grossesse. Dans certains cas de détresse foetale, le taux d'AFP est normal dans le sang du cordon : hydrocéphalie, trisomie E, trisomie 21 (154). Par contre, les concentrations d'AFP augmentent dans le sérum maternel et le liquide amniotique, lors d'une mort foetale intrautérine. Cette élévation serait due à une augmentation de la transfusion foeto-maternelle ou/et à une résorption des éléments foetaux par la mère. Dans les cas d'ataxie télangiectasie, l'augmentation du taux d'AFP dans le sérum foetal proviendrait d'un arrêt ou d'un retard de la différenciation des cellules du foie productrices d'AFP (193).

Cet aspect de l'étude de l'AFP dans le diagnostic précoce de grossesse pathologique revêt un caractère clinique très important et a été abordé par de nombreux auteurs (7, 35, 155).

4 - L'ALPHA-FOETOPROTEINE EN CANCEROLOGIE

Pendant de nombreuses années, l'intérêt de l'AFP a résidé dans le fait qu'elle pouvait être synthétisée en quantité élevée pendant la vie adulte, en association avec le processus de régénération et de cancérisation hépatique. La mesure des taux sériques d'AFP a constitué une méthode de diagnostic de l'hépatome (et du tératoblastome). Des données, plus récentes, ont montré que des taux élevés d'AFP pouvaient être trouvés en association avec des tumeurs du tractus gastro-intestinal. De ce fait, le test diagnostique de l'AFP n'apparaît pas aussi spécifique que l'on pouvait l'espérer à

l'origine, mais il constitue toujours une méthode de choix très employée dans le diagnostic et la surveillance thérapeutique des tumeurs.

Chez l'Homme, la plupart des lésions hépatiques sont accompagnées d'une production d'AFP. L'augmentation de la sensibilité des dosages et l'étendue des études a permis d'observer une production d'AFP dans de nombreux cas de cirrhoses (46, 94, 95), tyrosinémies (27), hépatites (46, 94), et dans de nombreuses tumeurs (1). La production d'AFP, chez l'adulte, est liée :

- 1°) au développement d'une tumeur ;
- 2°) à la prolifération de cellules normales lors d'une régénération hépatique, par exemple ;
- 3°) elle est consécutive à une exposition à des cancérigènes chimiques (150). Les tumeurs productrices d'AFP sont, pour la plupart, des hépatomes (ou carcinomes hépatocellulaires) (2), des tératomes (ou tératocarcinomes), moins fréquemment des tumeurs pancréatiques ou gastrointestinales. En outre, il existe quelques rares cas de tumeurs non endodermes liées à la sécrétion d'AFP telles que certaines leucémies et myélomes (105). Dans les tumeurs testiculaires ou ovariennes (tératomes), de nombreux auteurs observent la présence d'éléments analogues à l'endoderme du sac vitellin (150, 177, 178, 186) Il faut donc noter que les tumeurs productrices d'AFP sont des tumeurs associées à des tissus de type embryonnaire synthétisant l'AFP : le foie, le sac vitellin et le tractus gastrointestinal (150, 181) Environ 80 % des hépatomes (7) et 62 % des tératomes (181) sont associés à des sécrétions d'AFP. Chez les hépatiques, des taux supérieurs à 400 ng/ ml sont très suggestifs d'hépatome dans les cas où cette élévation est permanente (46). Chez les cirrhotiques, elle peut également être très importante, mais elle est toujours transitoire (46, 94). Il semble, d'autre part, que la mortalité soit plus importante chez les patients portant des tumeurs sécrétant de l'AFP (95). L'intérêt clinique de l'AFP réside dans la possibilité de détection d'hépatome à un stade précoce ; or, la cirrhose du foie est considérée comme un état "précancéreux" (46, 94). Un certain nombre de cirrhoses développe par la suite un hépatome primaire (4,7 % des

cas pour Lehmann (94)) et certaines sont accompagnées de sécrétion d'AFP. L'AFP est, en outre décelée dans certaines hépatites virales, transitoirement. Cette sécrétion serait due à une régénération des cellules du foie après destruction massive (46, 94). La production d'AFP serait en relation avec le degré de gravité de destruction du tissu hépatique.

La production d'AFP est liée à la prolifération cellulaire induite par une hépatectomie partielle (2, 129, 149, 172) ou chimiquement par exposition au tétrachlorure de carbone (45, 48, 172). L'élévation du taux d'AFP dans le sang est transitoire. A près une hépatectomie partielle de 70 %, les hépatocytes prolifèrent et produisent de l'AFP dans les quarante-huit heures qui suivent l'opération, le taux d'AFP dans le sang est fonction de l'âge, elle est plus importante chez les jeunes Rats que chez les Rats âgés (149). Dans les cas de cancérisation expérimentale, chez l'animal, le Rat en particulier, par des hépatocancérogènes : 3' Me-4 DAB (25, 44, 81, 124, 162, 194) ou AAF (26, 80), la production d'AFP est observée dans la plupart des cas.

5 - PROPRIETES BIOCHIMIQUES

5.1. Purification

L'AFP a été isolée chez la plupart des animaux. Le fait que cette protéine possède une mobilité électrophorétique et un poids moléculaire proches de ceux de l'albumine a rendu la purification délicate. Les méthodes de purification font appel à : la chromatographie d'échange d'ions sur QAE-Sephadex (96), l'électrophorèse (60) ou l'électrofocalisation (8, 148, 168). Cependant, les méthodes immunochimiques sont les plus utilisées actuellement telles que la précipitation antigène-anticorps puis dissociation à bas pH

(113, 195) ou la chromatographie d'affinité sur antiAFP (40, 74, 114). L'électrophorèse préparative en gel de polyacrylamide est également très utilisée et permet d'obtenir une AFP pure (60, 86), et combinée à la chromatographie d'affinité des quantités importantes d'AFP très pure (10 à 15 mg à partir de 10 ml de liquide amniotique) ont pu être obtenues (74).

5.2. Propriétés physicochimiques et immunologiques

Les propriétés physicochimiques de l'AFP sont maintenant bien connues ; c'est une glycoprotéine formée d'une seule chaîne polypeptidique, d'un poids moléculaire d'environ 73 000 daltons chez le Rat et chez la Souris (67, 115, 140, 148, 195) et de 70 000 daltons chez l'Homme (10, 53). Une étude de structure par dichroïsme circulaire a montré un taux d'hélice de 60% pour l'AFP de Rat (12), taux inhabituel pour une protéine sérique. Le coefficient de sédimentation est de 4,5 S, le pHi est égal à 4,9 (148), le coefficient d'extinction 1 % a une valeur de 4,3 (27, 113). Cette glycoprotéine contient 4 à 5 % de sucres (96, 140, 179). En électrophorèse, elle migre au niveau des α_1 -globulines chez l'Homme, le Rat et la Souris, au niveau des α_2 ou β -globulines chez le Chien et le Lapin (67).

Watabe, Hiraï et Nishi (67, 115, 195) ont mis en évidence des réactions de précipitation croisée entre les AFP de différentes espèces (par exemple, l'AFP de Souris réagit fortement avec l'anticorps dirigé contre l'AFP de Rat, l'anti AFP de Poulet réagit avec l'AFP des autres espèces (2)). Le tableau II réunit et compare les diverses propriétés de l'albumine et de l'AFP de Rat, de Souris et de l'AFP humaine.

5.3. Hétérogénéité protéique

Alors que l'AFP se présente de façon homogène en gel à 5 % de polyacrylamide, on la trouve sous forme de deux ou plusieurs bandes distinctes pour des concentrations d'acrylamide de 10 à 12 %

TABLEAU II.- Propriétés physico-chimiques comparées de l'AFP de Rat (A et B), de l'AFP de Souris, de l'AFP humaine et de l'albumine.

	Albumine*	AFP _A de Rat	AFP _B de Rat	AFP de Souris	AFP humaine
Poids moléculaire	69 000	74 000	72 000	72 000 73 000	70 000
Point isoélectrique	4,9	4,9	4,9	ND	4,7
Coefficient d'extinction à 278 nm	5,8	4,3	4,3	ND	5,3
Coefficient de sédimentation	4,6	4,5	4,5	ND	4,5
Hélice α	37 %	60 %	60 %	ND	ND
Pourcentage de sucres	0	6-7 %	6-7 %	ND	4-5 %
Variants électrophorétiques	1	1	1	2	1
Variants RCA _I	0	2	1	plusieurs variants	1
Variants Con A	0	6	3	3	2

ND : non déterminé.

*D'après Schultze & Heremans (145).



chez de nombreuses espèces (8, 28, 40, 67, 195, 197). Deux formes électrophorétiques A et B (lente et rapide) chez le Rat ont été purifiées (76) et comparées physicochimiquement et immunochimiquement : elles ont la même antigénicité (19, 40, 76, 195) et l'analyse globale de la composition en sucres et en acides aminés ne montre pas de différence entre les deux variants électrophorétiques. Les seules différences observées entre A et B sont au niveau des poids moléculaires, en électrophorèse sur gel SDS : les valeurs obtenues sont de 74 000 daltons pour AFP_A et 72 000 daltons pour AFP_B. D'autre part, on note également de légères différences dans les fragments séparés par électrophorèse en gel SDS après coupure par le bromure de cyanogène (CNBr). Ces deux types de différences pourraient correspondre à un fragment peptidique supplémentaire de 2 000 daltons composé d'environ 20 acides aminés sur le variant A (74).

5.4. Hétérogénéité glycanique

L'hétérogénéité dont nous venons de parler affecte la chaîne polypeptidique de la molécule. De nombreux auteurs (23, 74, 87, 138, 159, 161, 164, 192) ont mis en évidence une microhétérogénéité touchant la partie glycanique de l'AFP. La microhétérogénéité glycanique de l'AFP a été mise en évidence grâce à l'utilisation des lectines, principalement la Concanavalline A (Con A) (23, 73), mais aussi la lectine de Ricinus communis (22).

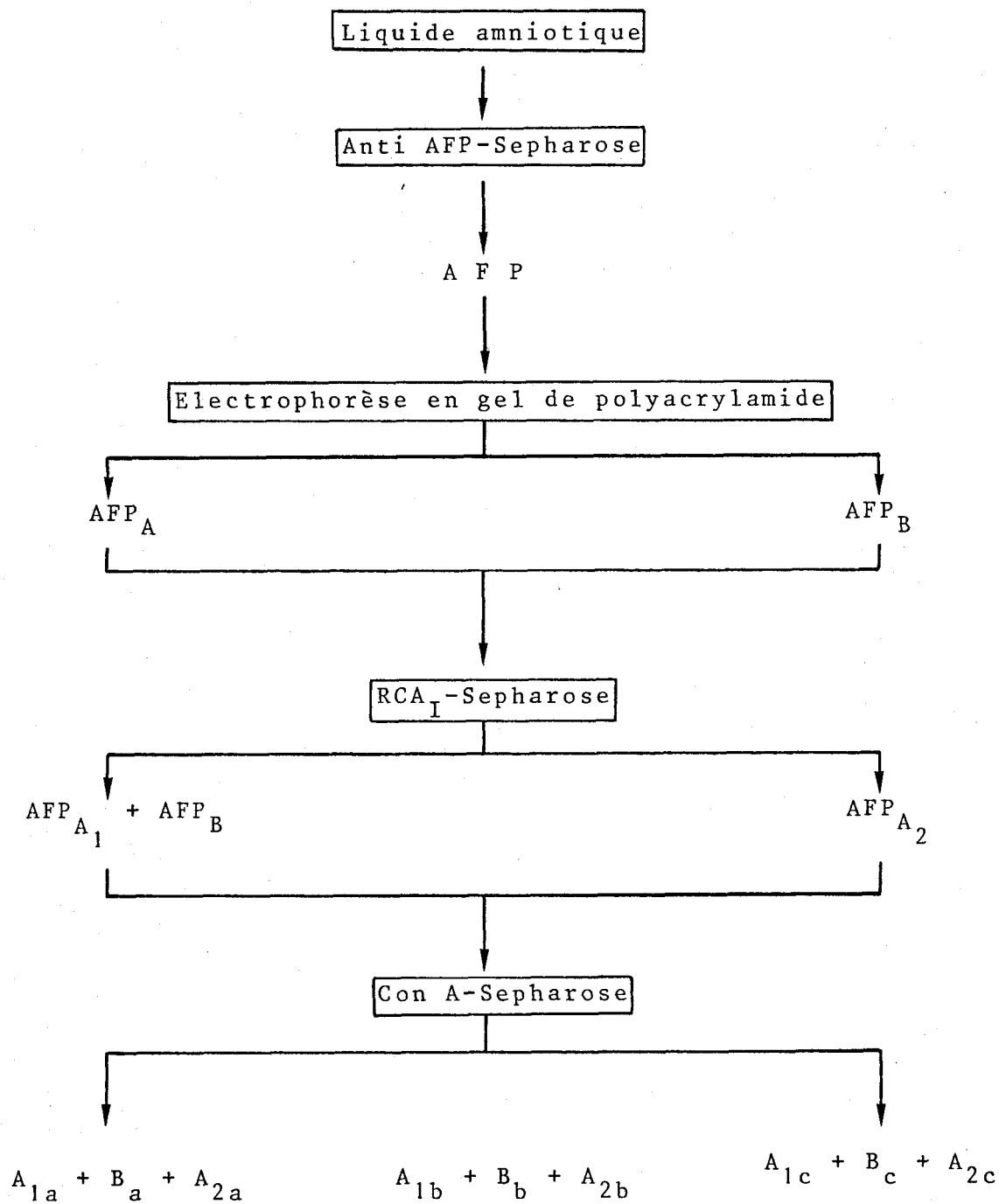
C'est par la chromatographie d'affinité sur colonne de Con A-Sepharose que sont séparées 4 iso-AFP, chaque variant électrophorétique A et B donne deux fractions : l'une est non fixée par la lectine et l'autre retenue. Il faut remarquer que l'AFP montre cette même microhétérogénéité quelle que soit son origine foetale ou hépatomateuse (136, 159, 161), de Rat, de Souris ou humaine (87, 136, 138, 159), synthétisée in vivo ou in vitro (98, 158, 161). La différence de comportement des iso-AFP réactive et non réactive avec la Con A est probablement due à des variations dans la partie glycanique de la molécule au niveau des substitutions sur le noyau trimannosidique. Bien que la spécificité de la Con A ne soit pas

stricte ni très bien définie, on sait qu'elle fait intervenir des résidus de mannose partiellement substitués (83). Kerckaert et Bayard (23), en jouant sur les conditions de chromatographie, ont séparé 3 variants sur une colonne de Con A-Sepharose : un non retenu, un retardé et un troisième retenu et élué par l' α -méthylglucose. Les variants électrophorétiques ne sont cependant pas retenus de la même façon. Des différences conformationnelles dans la zone polypeptidique portant la chaîne glycanique pourraient expliquer de légères différences dans l'affinité pour la Con A (23). Ruoslahti et al (138) ont également mis en évidence la présence de trois variants avec la Con A pour l'AFP humaine, ainsi que des variations dans les taux d'AFP non retenue selon qu'elle provient du foie ou du sac amniotique de l'embryon, ou même au cours du développement embryonnaire.

D'autre part, l'utilisation d'une autre lectine : Ricinus communis (RCA_{I}), a permis de séparer à partir de l'AFP totale deux variants : l'un n'ayant pas d'affinité pour la lectine, l'autre étant fixé. Or, la lectine RCA_{I} a une affinité pour les glycoprotéines contenant un résidu terminal de D-galactose (169). Le fractionnement, par électrophorèse et chromatographie d'affinité sur RCA_{I} , permet donc d'isoler trois iso-AFP, l'AFP_B sans affinité pour la lectine et deux variants A_1 et A_2 non retenu et retenu (22, 74). On sait que la forme A_2 , RCA_{I} -réactive qui représente 8 à 10 % de l'AFP totale, contient moins de résidus d'acides sialiques que la forme A_1 , RCA_{I} -non réactive (quatre acides sialiques par mole pour A_2 et six pour A_1). L'affinité pour la lectine serait due au fait que, les deux résidus d'acide sialique manquant dans le variant A_2 , deux résidus de galactose se trouvent exposés en position terminale et permettent à ce variant d'être fixé par la lectine (22).

La combinaison des trois méthodes de fractionnement : électrophorèse préparative en gel de polyacrylamide, chromatographie d'affinité sur colonne de RCA_{I} -Sepharose, puis de Con A-Sepharose permet d'isoler neuf variants. Le tableau III résume ces fractionnements et réunit les variants ainsi obtenus. La partie glycanique n'intervient pas dans la réaction immunologique antigène-anticorps, car les neuf iso-AFP ont la même antigénécité.

TABLEAU III.- Fractionnements permettant d'isoler les neuf variants de l'AFP à partir du liquide amniotique du Rat (23).



6 - PROPRIETES BIOLOGIQUES DE L'ALPHA-FOETOPROTEINE

Le rôle biologique de l'AFP, dans la physiologie foetale ou tumorale, n'est pas encore bien établi. Il faut cependant retenir quatre orientations principales :

- 1) l'AFP jouerait le rôle d'une albumine foetale,
- 2) elle fixe les oestrogènes et protégerait ainsi le foetus contre les hormones de la mère,
- 3) elle aurait un rôle dans la régulation de la croissance cellulaire,
- 4) enfin, elle aurait un pouvoir immunosuppresseur.

Par son pouvoir de fixation des oestrogènes et par son rôle immunosuppresseur, s'il existe, l'AFP jouerait un rôle dans le phénomène de non-rejet du foetus par la mère ou d'une tumeur par l'adulte.

6.1. L'AFP est-elle une albumine foetale ?

La possibilité pour l'AFP d'être une albumine foetale a été, pour la première fois, suggérée par Abelev en 1971 (2), sur la base des concentrations relatives, chez le foetus et chez l'adulte, de l'albumine et de l'AFP et par la comparaison du poids moléculaire et du point isoélectrique. Ce dernier point est illustré par le fait qu'il est difficile d'obtenir une AFP pure sans contamination d'albumine (9, 148, 195). Par la suite, cette hypothèse a été renforcée par la mise en évidence d'une homologie entre des séquences d'acides aminés de fragments d'AFP humaine et d'albumine (143). Grigorova et al (62) ont montré des analogies entre les deux protéines en ce qui concerne le nombre des groupes sulhydriques, de tyrosine et de tryptophane. Ruoslahti et Engvall (137) ont mis en évidence des réactions immunologiques croisées entre l'albumine et l'AFP humaine, après réduction des ponts disulfures et carboxyaminoéthylolation. Ce type de traitement des protéines permet de montrer une antigénicité commune entre des molécules telles que le lysosyme et

TABLEAU IV.- Composition en acides aminés de l'albumine et de l'AFP de Rat.

Acides aminés	Albumine*	AFP _A de Rat	AFP _B de Rat
Lys	10,95	6,9	7,0
His	3,17	2,9	2,8
Arg	5,38	3,4	3,4
Asp	9,05	8,7	8,6
Thr	4,31	5,0	5,2
Ser	3,15	8,6	8,0
Glu	15,85	15,5	15,3
Pro	3,65	4,2	4,3
Ala	6,67	8,2	8,5
Leu	10,3	9,3	8,9
Ile	1,31	4,5	4,0
Phe	6,74	4,3	4,3
Tyr	4,03	2,4	2,4
Met	1,03	2,0	1,7
Val	6,17	4,2	4,2
Cys	5,09	3,9	4,0
Gly	1,05	6,4	7,9
Trp	0,13	ND	ND
C-terminaux	Leu, Ala, Val, Gly	Val	Val
N-terminaux	Asp, Ala	NI	NI

ND : non déterminé ; NI : non identifié.

*D'après Schultze & Heremans (145).



la lactalbumine (11), molécules qui n'ont en fait rien de commun. Par contre, un certain nombre de différences entre l'AFP et l'albumine ont été observées : les acides aminés N terminaux sont différents pour les deux molécules (62) ; l'albumine ne possède pas de glucides alors que l'AFP est une glycoprotéine ; l'AFP lie l'oestradiol avec une très forte affinité et une spécificité étroite, alors que l'albumine fixe toutes les hormones avec une faible affinité ; aucune réaction immunologique croisée n'a été mise en évidence entre les deux protéines natives. Enfin, l'AFP et l'albumine sont synthétisées à des moments différents du cycle cellulaire (151).

Ces nombreuses différences entre les deux molécules compensent donc largement leurs similitudes, si bien qu'il nous paraît difficile de considérer l'AFP comme une albumine foetale même avec une fonction spéciale supplémentaire chez le foetus comme le suggèrent Ruoslahti et Terry (143).

6.2. Rôle de fixation des oestrogènes

Ce sont les travaux de Ramaley en 1970 (134) et Soloff et al en 1971 (163) qui démontrent la présence de substances dans le sérum de Rat nouveau-né et celui de la Rate gestante pouvant fixer les hormones oestrogènes. Depuis, ces travaux ont été confirmés et précisés principalement par les équipes de Nunez et de Uriel. Nunez et al (118) ont d'abord identifié la foetoprotéine responsable de la fixation des oestrogènes dans le sérum de Rat nouveau-né. Uriel et al ont ensuite montré qu'une faible fraction de l'AFP humaine (moins de 1 %) pouvait lier les oestrogènes (190), mais pour l'instant, ceci n'a pas été confirmé (119). La fixation d'oestrogènes par l'AFP de Rat est étudiée par les expériences d'équilibre de dialyse ; elle est très spécifique de l'oestradiol et de l'oestrone (17, 19).

La constante d'affinité K_a est de 4.10^8 M^{-1} à pH 6, le nombre de sites de liaison égal à 1 (16, 17, 19).

Cette propriété de lier les oestrogènes et en particulier le 17- β -oestradiol a été exploitée pour isoler l'AFP sur une colonne d'affinité oestradiol (72) ou pour localiser dans le foie les cellules productrices d'AFP (188).

L'étude de la fixation des oestrogènes par deux, quatre puis neuf variants moléculaires a montré que toutes les iso-AFP fixent les oestrogènes avec la même capacité et avec une affinité similaire (16, 17, 18, 19, 164). Il faut noter que les résultats de l'équipe de Nunez diffèrent de ceux obtenus par Aussel *et al*, principalement en ce qui concerne le nombre de sites de fixation de l'oestradiol. Nunez *et al* (31, 117, 144, 192) obtiennent des valeurs différentes dans le nombre de sites de fixation (0,25 au lieu de 1). D'autre part, il semblerait pour Nunez que la partie glucidique joue un rôle important dans la fixation des hormones ; en effet, ils observent des différences dans l'affinité pour le 17- β -oestradiol selon les variants glycaniques (séparés sur Con A-Sepharose).

Le foie représente le carrefour métabolique pour toutes les hormones stéroïdes. Il ne joue pas seulement un rôle de détoxification qui inactive les hormones et les transforme en conjugués solubles, mais joue aussi un rôle dans la régulation des taux circulants de ces hormones. C'est vers l'âge de trente jours environ, que le taux d'AFP chez le Rat s'abaisse à 1 % de ce qu'il était chez le nouveau-né, or c'est également vers cette période que le métabolisme des stéroïdes évolue vers ce qui sera un métabolisme adulte. C'est à partir de cette constatation que Aussel et Masseyeff ont pensé que, par sa propriété de fixation des oestrogènes, l'AFP pouvait être responsable de cette évolution (14, 15). Chez le jeune animal, la faible activité des enzymes responsables du métabolisme de l'oestradiol peut être due, en partie, à la présence de l'AFP et non seulement au faible taux de ces enzymes (14).

Le mode d'action des hormones a été très étudié ces quinze dernières années. Alors que l'hormone est rapidement catabolisée par le foie et que l'on retrouve des métabolites de celle-ci dans le sérum de l'animal, on ne trouve que de l'oestradiol inchangé dans l'utérus qui en est un organe cible. Bayard *et al* (24)

ont isolé l'AFP du cytosol utérin de Rates de vingt jours. La même hétérogénéité moléculaire est retrouvée dans cette AFP que pour l'AFP sérique, avec quelques différences dans les taux de chaque variant. De même, Aussel *et al* (20) ont isolé, à partir du cytosol utérin de Rates immatures, un complexe macromoléculaire 4 - 5 S fixant les oestrogènes : cette capacité provient de l'AFP qui, dans ce complexe, serait liée à des constituants cytoplasmiques ou nucléaires (189).

Pour Aussel, il est peu probable que l'AFP participe au mécanisme d'action des oestrogènes au niveau de l'utérus, mais elle pourrait jouer un rôle de régulateur du taux d'oestrogènes libres dans le plasma au moins chez le Rat et la Souris (13).

6.3. Action sur la croissance cellulaire

Cette activité s'illustre par le fait que l'addition de sérum foetal au milieu de culture favorise l'attachement et la prolifération des cellules, qu'il s'agisse de cultures primaires d'hépatocytes foetaux ou de cultures de cellules tumorales (92, 42, 89, 93, 125, 151, 158, 198). La présence d'AFP dans le sérum foetal (sérum de Veau foetal) semble donc coïncider avec une prolifération cellulaire accélérée. *In vivo*, l'AFP pourrait donc agir en facilitant la croissance des cellules normales chez l'embryon et de cellules tumorales rétro-différenciées chez l'adulte (125). Leffert *et al* (93, 151) pensent que ce mécanisme d'action sur la croissance cellulaire est dû tout simplement à la possibilité de fixation des oestrogènes par l'AFP intracellulaire. En effet, les oestrogènes stimulent la synthèse par le foie des lipoprotéines de très faible densité (VLDL). Les VLDL suppriment l'initiation de la synthèse du DNA par les hépatocytes foetaux. L'AFP, en fixant les oestrogènes, abaisserait le taux de VLDL et par conséquent, augmenterait le taux de synthèse du DNA (93, 151). Cette hypothèse n'a reçu aucune confirmation expérimentale, mais elle constitue une voie de recherche intéressante.

6.4. Rôle immunosuppresseur

Certains auteurs (30, 37, 112, 126) ont étudié la possibilité pour l'AFP d'avoir des propriétés d'immunorégulation. Parmely et al (126) et Caldwell et al (37) ont comparé l'action du sérum du cordon, du sérum de l'adulte normal ou du sérum de Rats porteurs de tumeurs, sur des cultures de lymphocytes mixtes in vitro (126) et sur des cultures stimulées par la PHA (PHA : phyto-hémagglutinine) (37, 126). L'effet immunosuppresseur obtenu est variable avec la PHA, en revanche, l'immunosuppression en culture mixte est en corrélation avec le taux d'AFP. En 1976, ces auteurs ont repris les mêmes expériences avec l'AFP purifiée (127) et montré que cette activité immunosuppressive n'était pas due à l'AFP elle-même, mais à une fraction α -globulinique de haut poids moléculaire, qui n'aurait aucun caractère onco-foetal. En 1974, Belanger et al (30), utilisant les mêmes cultures, étaient déjà parvenus à cette conclusion. Par contre, l'équipe de Murgita et Tomasi, en 1975, (43, 110, 111) travaillant également sur la transformation lymphocytaire par des mitogènes ainsi que sur des cultures mixtes de lymphocytes, trouvent que l'AFP inhibe ces réactions. C'est donc à cette protéine qu'ils attribuent un effet immunosuppresseur non cytotoxique sur la synthèse des anticorps, à la fois sur la réponse primaire et secondaire (112). Les cellules impliquées dans ces phénomènes seraient des T-lymphocytes (43, 109). Alors que Murgita et Tomasi utilisaient l'AFP isolée du liquide amniotique de Souris, Yachnin (199, 200) et Lester et al (97) étudient l'effet de l'AFP humaine isolée de sérum, de liquide ascitique et de foie foetal, et trouvent effectivement un effet immunosuppresseur, qu'ils attribuent à une fraction seulement de l'AFP, fraction qui varie en quantité selon l'origine de l'AFP (199).

On trouve, à l'opposé, un certain nombre de travaux qui mettent en doute ce pouvoir immunosuppresseur de l'AFP (46, 56, 72, 108 152). Pour Sheppard et al (152), ce rôle immunosuppresseur, mis en évidence in vitro, ne serait pas retrouvé in vivo. Mucchielli et al (108) ont même trouvé une activité immunoactivatrice

à partir de diverses préparations d'AFP humaine. Ces derniers ne tirent cependant aucune conclusion, car de nombreux facteurs peuvent intervenir dans l'expérimentation tels que : la source d'AFP, les conditions de purification et de stockage, la contamination et la prolifération bactérienne, les conditions et la stimulation des cultures de lymphocytes qui sont mal standardisées. En définitive, le rôle immunosuppresseur de l'AFP demeure très contesté. En dehors des équipes de Tomasi et de Yachnin, personne n'a trouvé un pouvoir immunosuppresseur constant et spécifique de l'AFP.

7 - METABOLISME DE L'ALPHA-FOETOPROTEINE

7.1. Sites de synthèse

Nous savons que l'AFP, décelée dans le sérum maternel et dans le liquide amniotique, provient du fœtus ; Gitlin et al (55) en ont déterminé l'origine tissulaire chez l'Homme ainsi que chez le Rat. Le foie et le sac amniotique (ou sac vitellin) en sont les deux sources principales surtout au début du développement fœtal. Au début de la gestation, le foie et le sac amniotique produisent environ la même quantité d'AFP, mais le foie se développe rapidement et en devient, vers la douzième semaine, la source principale. Gitlin et al (55) ont également mis en évidence une synthèse, assez faible cependant, par le tractus gastro-intestinal. Les mêmes études faites chez le Rat y ont montré une synthèse d'AFP par les mêmes trois sources (150). Le sac amniotique est plus développé chez le Rat et sa fonction biologique avant la naissance est plus importante que chez l'Homme (54).

L'étude du métabolisme de l'AFP peut être abordée de deux manières :

- étude de sa localisation au niveau des organelles cytoplasmiques des hépatocytes (41, 44, 63, 122, 131),
- étude de sa production au cours du cycle cellulaire (151, 182, 183, 196).

Les techniques immunocytochimiques, utilisées par plusieurs auteurs (38, 47, 131), ont permis d'obtenir un marquage spécifique de l'AFP au niveau des hépatocytes foetaux ou hépatomateux, que l'hépatome soit spontané ou provoqué par le 3'Me 4 DAB. La synthèse d'AFP semble se tenir dans les hépatocytes immatures, dans les cellules transitionnelles pour la plus grande partie, mais aussi pour une faible part dans les petits hépatocytes (44, 63). Aucun marquage n'est observé au stade précoce des cellules ovales, ni dans les hépatocytes matures (voir figure 1). Au cours de la cancérogénèse chimique, induite par ingestion de 3'Me 4 DAB ou de AAF (26, 44, 63, 122, 176), l'AFP se décèle dans les tissus avant l'apparition de la tumeur, au niveau des cellules transitionnelles. L'AFP serait donc synthétisée par des cellules transitionnelles mitotiquement actives, donc cellules qui sont à un stade intermédiaire entre la cellule ovale et l'hépatocyte mature (92, 176, 179, 188, 194). L'albumine, étudiée simultanément par les mêmes techniques, se localise dans les hépatocytes typiques et dans quelques cellules transitionnelles.

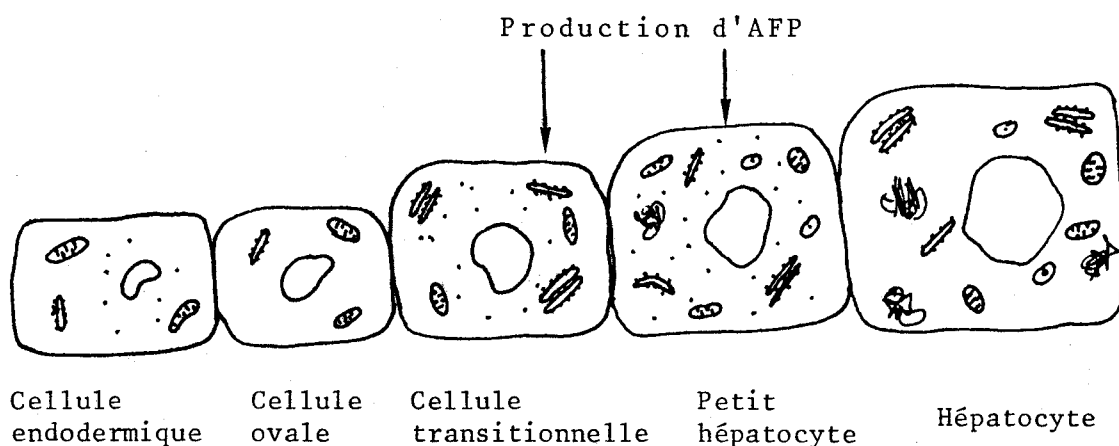


Figure 1

Représentation schématique de la relation entre la maturation de l'hépatocyte et la production d'AFP d'après Onoé et al (124).

7.2. Phase de synthèse durant le cycle cellulaire

L'utilisation de cultures de lignées cellulaires dérivées d'hépatomes -AH 66 (182, 183)- ou d'hépatocytes foetaux (91, 92) a permis d'établir certaines relations entre l'AFP et les phases du cycle cellulaire, dans de nombreux cas, cette étude a été menée de façon parallèle avec l'albumine (182, 196) et parfois d'autres protéines (151). L'AFP et l'albumine sont produites à des phases différentes du cycle cellulaire. Il semble cependant que l'AFP soit synthétisée durant les phases G_1 et S et sécrétée rapidement en phase M (151, 182, 183), alors que l'albumine est produite depuis le milieu de S jusqu'en phase G_2 .

7.3. L'Alpha-foetoprotéine et la prolifération cellulaire

Au cours du développement de la culture d'hépatocytes foetaux, la lag phase ou phase de latence dure environ vingt quatre à quarante huit heures. Durant la phase de croissance logarithmique, qui dure huit jours, la population cellulaire double en vingt quatre heures et, au cours de la phase stationnaire, la multiplication cellulaire diminue et le nombre de cellules attachées reste constant. La synthèse d'AFP est en relation avec le taux de croissance des hépatocytes et leur position dans le cycle. La production d'hémopexine semble également être liée à la prolifération cellulaire contrairement à l'albumine et à l'haptoglobine (92, 151, 196). La production d'AFP est donc couplée à la synthèse du DNA. Dans tous les cas étudiés, un arrêt de la production d'AFP a été observé après blocage de la synthèse du DNA, celle-ci reprenant lors d'une réinitiation de la synthèse du DNA (91, 92, 151, 196).

7.4. Catabolisme

Colquhoun et al (41) ont observé pour l'AFP, une demie-vie de vingt deux à vingt quatre heures chez la Rate après délivrance. Chez le Rat nouveau-né cependant, ces auteurs constatent une demie-vie de cinq jours environ durant les vingt six premiers jours de la vie. L'absence de réponse immunitaire contre l'AFP injectée chez l'animal adulte, suggère l'existence d'un taux d'AFP de base dans la circulation sanguine de l'animal mature (41). Ce taux de base est atteint chez le Rat au quarante quatrième jour suivant la naissance.

TRAVAUX PERSONNELS

I N T R O D U C T I O N

Nous avons étudié et comparé l'AFP de Rat produite in vivo chez l'embryon ou chez le Rat hépatomateux et in vitro par les hépatocytes foetaux en culture primaire. Dans un premier temps, nous avons analysé, par les techniques de chromatographie d'affinité et d'immuno-affino-électrophorèse bidimensionnelle, l'AFP provenant de ces différentes sources :

- a) L'AFP de Rat embryonnaire est recueillie à partir du liquide amniotique et du sérum d'embryons de 17 à 20 jours.
- b) Le sérum de Rat hépatomateux provient de Rats ayant un régime alimentaire contenant 0,06 % de cancérogène : le 3^{Me} 4 DAB (3^e méthyl 4 diméthyl aminoazobenzène).
- c) Quant à l'AFP synthétisée in vitro, elle est recueillie à partir des milieux de cultures primaires d'hépatocytes foetaux de Rats (embryons de 17 à 20 jours).

Nous avons étudié la microhétérogénéité de l'AFP : microhétérogénéité protéique et surtout glycanique révélée par son interaction avec diverses lectines. La première partie de notre étude est donc essentiellement comparative.

La méthode de culture primaire employée permet d'aborder le problème de la régulation de l'expression de l'AFP par l'observation systématique de la prolifération cellulaire et par une étude de la production protéique.

La production protéique est suivie dans les milieux de culture par dosage de la protéine qui nous intéresse : l'AFP, ainsi que l'albumine, en tant que protéine de référence. Grâce à ce

systeme, nous pouvons étudier l'action de divers agents exogènes additionnés au milieu de culture, drogues, hormones (AMPc, théophylline, bléomycine, et méthotrexate) et cancérigène (AAF).

MATERIEL ET METHODES

1 - FRACTIONNEMENT DE L'ALPHA-FOETOPROTEINE

1.1. Purification de l'AFP

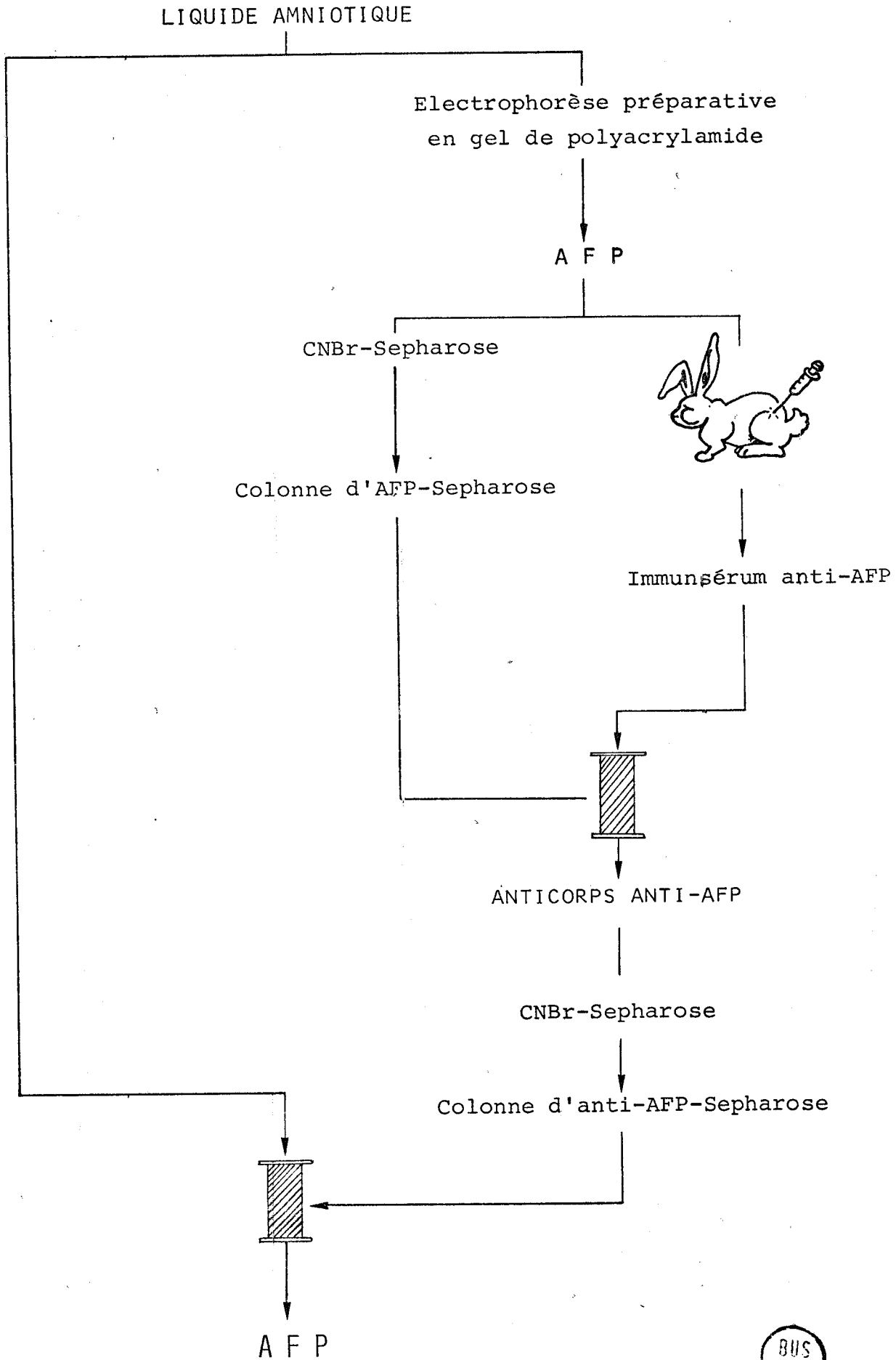
L'AFP des milieux de culture a été isolée par chromatographie d'affinité sur colonne de Sepharose couplée à des anticorps anti-AFP (74).

Isolement des anti-AFP

Les anticorps monospécifiques ont été isolés par chromatographie d'affinité sur colonne d'AFP-Sepharose. 10 mg d'AFP purifiés par électrophorèse préparative, selon le procédé décrit par Kerckaert (76), sont couplés avec 25 ml de Sepharose 4B préalablement activée selon le procédé de March et al (101). Le sérum anti-AFP de Lapin est appliqué sur cette colonne qui est lavée dans un premier temps avec un tampon Tris-HCL 0,1 M de pH 8,0 contenant 0,5 M de chlorure de sodium et 0,02 % d'azoture de sodium. Les anticorps anti-AFP fixés sur la colonne sont déplacés avec le tampon glycine 0,2 M-HCL, pH 2,8 contenant du chlorure de sodium 0,5 M. La solution d'anticorps est ensuite neutralisée, dialysée et lyophilisée.

Isolement de l'AFP

Les anticorps (100 mg) sont ensuite couplés avec 50 ml de Sepharose activée par le CNBr. Les milieux de culture (100 ml, soit le contenu de 10 flacons) sont chromatographiés sur cette colonne et l'AFP est éluée avec les mêmes tampons que ceux précédemment décrits.



DIFFERENTES ETAPES DE PREPARATION D'AFP

1.2. Chromatographie d'affinité sur colonne de lectine de Ricinus communis

Préparation et couplage de la lectine*

L'agglutinine RCA_I est préparée en associant la chromatographie d'affinité à la chromatographie de gel filtration. Tout d'abord, les extraits de graine de Ricinus sont soumis à la chromatographie d'affinité sur une colonne de Sepharose-N-ε-amino-caproyl-β-D-galactopyranosylamine préparée selon le procédé de Gordon (59). Deux lectines (RCA_I et RCA_{II}) sont éluées avec le D-galactose 0,1 M et séparées sur une colonne de Sephadex G-150 équilibrée dans un tampon phosphate de pH 7,2.

La lectine RCA_I est ensuite couplée sur une Sepharose 4B activée avec du bromure de cyanogène selon le procédé de March et al (101).

Chromatographie d'affinité sur la colonne de RCA_I-Sepharose (22)

Les différents variants de l'AFP sont appliqués au sommet de la RCA_I-colonne qui est lavée dans un premier temps avec un tampon phosphate salin 20 mM pH 7,2-0,15 M chlorure de sodium. Le matériel fixé sur la colonne est ensuite élué avec le même tampon contenant en plus du galactose 0,1 M. Le galactose commercial, obtenu chez "The Nutritional Biochemicals Corporation", est préalablement purifié sur colonne de charbon-Celite.

1.3. Chromatographie d'affinité sur colonne de Concanavaleine A (23)

La Concanavaleine A (Con A), provenant de chez "Pharmacia Fine Chemicals" et l'"Industrie Biologique Française" est couplée à une Sepharose 4B activée au CNBr. L'AFP (2 à 3 mg) est chromatographiée sur cette colonne de Concanavaleine A (1,2 x 10 cm) équilibrée avec le tampon Tris-HCL 0,05 M (pH 7,6) contenant du NaCl 0,1 M,

* Cette lectine a été préparée et nous a été aimablement fournie par H. DEBRAY que nous remercions vivement.

$MnCl_2$ 1mM, $MgCl_2$ 1mM et $CaCl_2$ 1mM. Le matériel ne réagissant pas ou peu avec la Con A est élué par lavage avec le tampon, alors que le matériel réagissant avec la Con A est déplacé avec le même tampon contenant en outre du O-méthyl- α -D-glucoside 0,1 M.

1.4. Immuno-affino-électrophorèse bidimensionnelle

La méthode d'immuno-affino-électrophorèse bidimensionnelle a été introduite par Bøg-Hansen et al (34). Elle fait intervenir, dans un premier temps, l'affinité de l'AFP pour la lectine puis l'affinité immunologique antigène-anticorps. Lectines et anticorps sont incorporés dans l'agarose 1 % dans du tampon Tris-Véronal, pH 8,6 (Tris 37 mM, Véronal 24,5 mM, lactate de calcium 0,36 mM et azoture de sodium 0,2 mM) à 50°C. Dans la première dimension de l'électrophorèse, des échantillons de 1 à 5 μ l contenant 10 à 100 μ g d'AFP/ml migrent pendant 2 heures à 10 volts/cm dans un gel contenant une concentration déterminée de lectine. La seconde dimension est effectuée à 2 volts/cm pendant 18 heures dans un gel d'agarose contenant l'anti-AFP.

2 - CULTURES PRIMAIRES D'HEPATOCYTES FOETAUX DE RAT

2.1. Mise en culture des hépatocytes

Les cultures primaires d'hépatocytes foetaux de Rat ont été réalisées selon le protocole proposé par Leffert et Sell (92) avec quelques modifications, illustré par la figure 2 (page 33). Les foies foetaux de Rat de 17 à 20 jours de gestation, excisés sous conditions stériles, sont dissociés par un traitement à la collagénase. Les cellules libres sont lavées quatre fois avec le milieu de culture et trois fois avec le chlorure d'ammonium, afin d'éliminer les érythrocytes qui contaminent la préparation. Environ 10^6 cellules sont placées dans 10 ml de milieu de Dulbecco contenant 10 % de sérum de veau (milieu 1). 24 heures plus tard, ce milieu

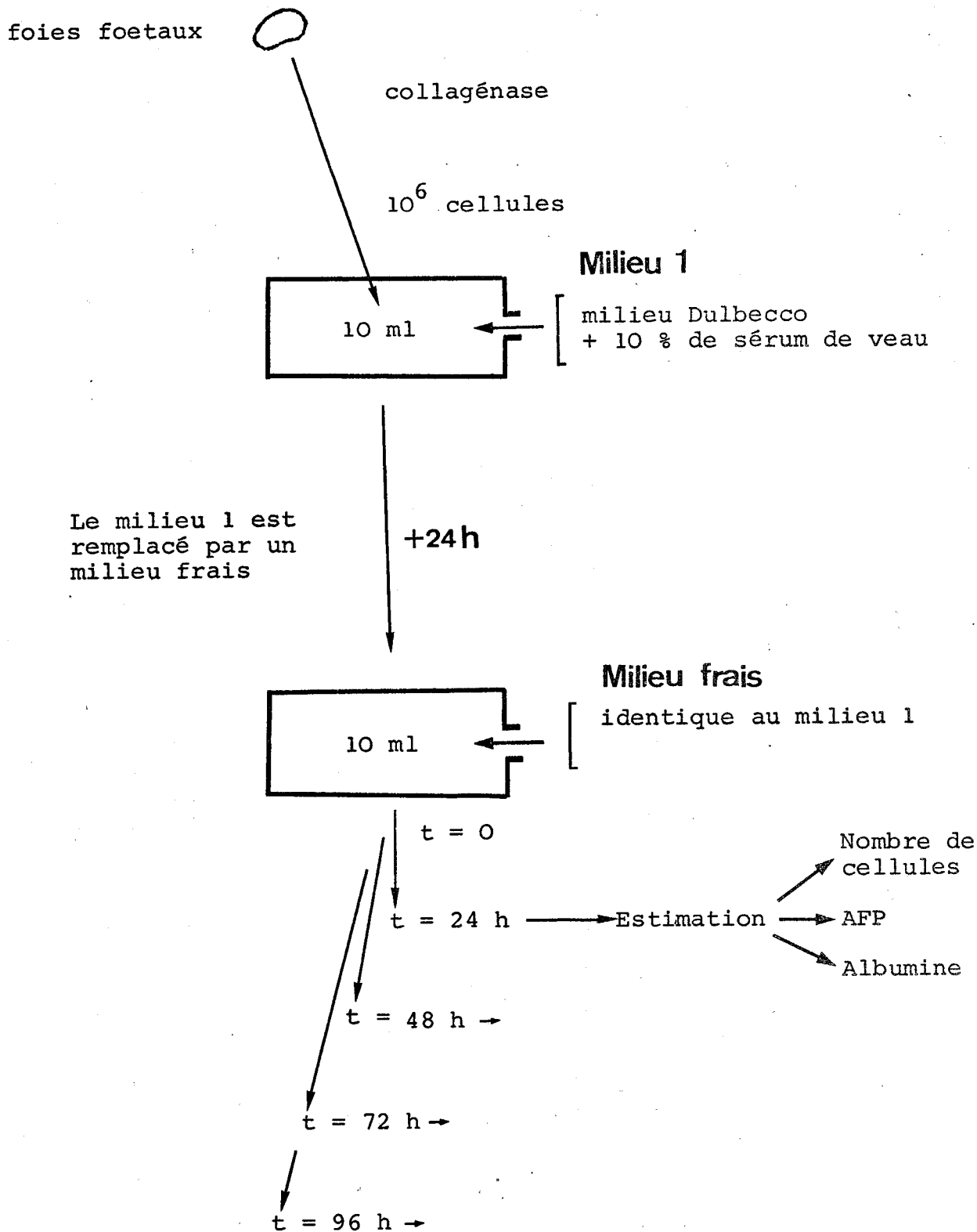


Fig. 2 - Culture primaire d'hépatocytes foetaux de rat.

est remplacé par un milieu frais (milieu 2). Cette opération permet d'éliminer les derniers érythrocytes ainsi que les protéines hépatiques synthétisées in vivo et excrétées dans le milieu de culture. Ce changement de milieu constitue dans toute notre expérimentation le temps zéro. Au cours des 96 heures suivantes et à intervalles de 24 heures, les cellules vivantes formant une monocouche sont comptées et les quantités d'albumine et d'AFP sécrétées dans le milieu sont estimées à l'aide de l'électroimmunodosage. Les drogues ou le cancérogène sont ajoutés au temps zéro, au moment du changement de milieu. Dans certaines expériences, le milieu est changé stérilement toutes les 24 heures et recueilli.

2.2. Détermination du nombre de cellules

La prolifération cellulaire est estimée en comptant le nombre de cellules préalablement dissociées par la trypsine. Les cellules sont ensuite diluées 160 fois et dosées au Coulter counter (Modèle F, Coultronics France, S. A.).

2.3. Dosage de l'AFP et de l'albumine

Principe du dosage

Le principe de l'électroimmunodosage de Laurell (90) repose sur le déplacement électrophorétique de l'antigène dans un gel d'agarose contenant une quantité définie d'anticorps. La rencontre de l'antigène et de l'anticorps constitue une ligne de précipitation qui possède la forme d'une fusée et dont la hauteur est directement proportionnelle à la quantité d'antigène.

Préparation des immunosérums monospécifiques

Les antisérums monospécifiques contre l'AFP et contre l'albumine sont préparés en immunisant des Lapins avec 4 mg d'AFP

ou d'albumine préparés par électrophorèse préparative (76).
Chaque injection contient 1 mg d'antigène dissous dans 0,5 ml de chlorure de sodium 0,15 M et émulsifié dans 0,5 ml d'adjuvant de Freund (Difco).

Immunoélectrophorèse

Les milieux de culture contenant l'AFP et l'albumine sont déposés sur une immunoplaque d'agarose contenant l'anticorps approprié. La grande sensibilité du dosage qui est de l'ordre de 1 à 25 µg par ml ne nécessite pas plus de 4 à 5 µl du milieu de culture qui est directement prélevé et déposé dans les alvéoles sans aucune concentration préalable. L'électrophorèse est réalisée dans le tampon Tris-Véronal pH 8,6 pendant 2 heures à 20 V/cm. Les immunoplaques sont ensuite séchées et colorées au Bleu de Coomassie.

RESULTATS

1 - ETUDE BIOCHIMIQUE DES ISO-AFP SYNTHETISEES IN VIVO ET IN VITRO

1.1. Hétérogénéité protéique

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide a permis de révéler l'hétérogénéité moléculaire de l'AFP provenant de plusieurs espèces (Rat, Souris, Homme) (72). Cette différence de migration électrophorétique est due à une différence de composition en acides aminés. La forme électrophorétique lente possède une vingtaine d'acides aminés supplémentaires, ce qui se traduit par une différence de 2000 daltons observée en gel SDS (73). Nous avons comparé le comportement électrophorétique de l'AFP de Rat isolée : a) du liquide amniotique, b) du sérum de Rat hépatomateux, c) de milieux de culture primaire d'hépatocytes foetaux.

Dans les trois cas, nous observons que les deux formes électrophorétiques lente (AFP_A) et rapide (AFP_B) coexistent mais à des taux variables selon l'origine (Tableau V).

TABLEAU V.- Variations du rapport A/B des formes électrophorétiques lente et rapide de l'AFP selon son origine.

	Liquide amniotique	Sérum de rat hépatomateux	Milieu de culture d'hépatocytes foetaux
$\frac{A}{B}$	1,6	1,3	1,9

Pour expliquer ces variations, on peut souligner :

- 1^o) que l'AFP isolée du sérum de Rat hépatomateux ou des milieux de culture est synthétisée par des hépatocytes -transformés ou foetaux-, alors que pour l'AFP du liquide amniotique : le sac amniotique et, pour une faible part, le tractus gastro-intestinal participent en plus du foie foetal à la synthèse ;
- 2^o) que les variants ont probablement un métabolisme différent in vivo et in vitro

1.2. Hétérogénéité glycanique

- a) Etude des iso-AFP par chromatographie d'affinité sur colonne de lectines immobilisées.

Le polymorphisme moléculaire de l'AFP est dû, en partie, à une hétérogénéité peptidique comme nous venons de le voir, mais aussi et surtout à une très large hétérogénéité des copules glucidiques comme l'a révélé l'utilisation des lectines.

Les lectines sont des substances naturelles isolées des plantes ou des animaux et qui ont la propriété de se lier spécifiquement avec certaines structures glycaniques à la manière d'une réaction antigène-anticorps ou enzyme-substrat. La spécificité de certaines de ces lectines comme celle isolée de Ricinus communis et la Concanavaleine A commence à être très bien connues.

Les différents degrés d'interaction que l'on observe entre les copules glucidiques des iso-AFP avec les lectines comme la Concanavaleine A (Con A) ou celles isolées de Lens culinaris (LCA) ou Ricinus communis (RCA_I), ont permis d'isoler, par chromatographie d'affinité sur colonne de lectine, chaque iso-AFP dans un état de pureté satisfaisant (75).

Ainsi, nous avons pu étudier et comparer le comportement des iso-AFP provenant de milieu de culture, d'origine foetale ou tumorale avec la Con A. Les résultats, illustrés par le tableau VI, font apparaître trois types d'interaction qui correspondent aux trois populations suivantes :

- 1) une fraction non retenue n'ayant aucune affinité pour la lectine,
- 2) une fraction retardée possédant une légère affinité pour la Con A,
- 3) une fraction retenue sur la colonne et éluée grâce à l'addition du α -méthyl glucoside 0,15M au tampon d'éluion.

Il est à remarquer que les pourcentages de ces fractions varient sensiblement selon l'origine de l'AFP. Plus précisément, la fraction Con A réactive de l'AFP de milieu de culture représente 48% des iso-AFP totaux, alors que le sérum embryonnaire, n'en contient que 19%. On sait, à présent, (Strecker, Bayard, Kerckaert: communication personnelle), que les deux glycannes de l'AFP Con A-non réactive, possèdent chacun un résidu de N-acétyl glucosamine supplémentaire branché sur l'hydroxyle 4 du β mannose. Par contre, les glycannes de l'AFP Con A-réactive sont dépourvus de ce résidu de N-acétyl glucosamine qui semble empêcher l'interaction de l'AFP avec cette lectine.

TABLEAU VI.- Fractionnement sur colonne de Con A-Sepharose de l'AFP isolée de différents milieux : sérum de rat embryonnaire, sérum de rat hépatomateux et milieu de culture d'hépatocytes foetaux.

Origine de l'AFP	Fractionnement de l'AFP sur Con A-Sepharose		
	Fraction non retenue	Fraction retardée	Fraction retenue
Sérum de rat embryonnaire	43,6 %	37,5 %	18,9 %
Milieu de culture (hépatocytes foetaux)	14,4 %	37,8 %	47,8 %
Sérum de rat adulte hépatomateux	31,2 %	45,6 %	23,1 %



De ce point de vue, l'AFP synthétisée *in vitro* n'a pas la même qualité que l'AFP produite *in vivo*.

De la même manière, la lectine de *Lens culinaris* permet d'isoler trois fractions à partir l'AFP isolée des trois milieux étudiés. Nous obtenons :

- 1) une fraction non retenue sur la colonne et sans affinité pour la lectine,
- 2) une fraction retardée et donc peu réactive,
- 3) une fraction retenue sur la colonne et ayant une forte affinité pour la lectine.

b) Etude des iso-AFP en immuno-affino-électrophorèse bidimensionnelle

La chromatographie des iso-AFP de différentes origines sur chacune de ces colonnes de lectines couplées à la Sepharose, nous donne un profil d'éluion caractéristique de l'origine de ces iso-AFP. Nous avons ainsi développé cette observation en étudiant les profils des iso-AFP d'origine foetale, tumorale ou de milieu de culture. Toutefois, cette méthodologie nécessite des quantités appréciables d'AFP et se prête mal à une étude en série ou à une étude fine. C'est la raison pour laquelle, au laboratoire, les iso-AFP sont dénombrées et quantifiées par immuno-affino-électrophorèse.

Il s'agit d'une technique d'électrophorèse bidimensionnelle initialement décrite par Bøg Hansen (34) et appliquée aux iso-AFP (73,74). La première migration est une affino-électrophorèse qui sépare les iso-AFP en fonction du nombre de sites interagissant avec la lectine libre contenue dans le support ; la seconde migration est une immuno-électrophorèse réalisée dans un gel contenant l'anticorps anti-AFP. Dans ce cas, les profils apparaissent sous la forme d'une succession de pics dont la hauteur est proportionnelle à la quantité d'iso-AFP. Cette méthode qualitative et semi-quantitative se prête bien à l'analyse d'échantillons de milieu de culture qui contiennent de l'AFP en très faible quantité.

Nous avons voulu, dans un premier temps, vérifier qu'il y avait parfaite correspondance entre les deux techniques, à savoir, que les profils d'éluion de colonnes correspondaient aux profils électrophorétiques.

Comme le montre la figure 3, l'iso-AFP n'ayant aucune affinité pour

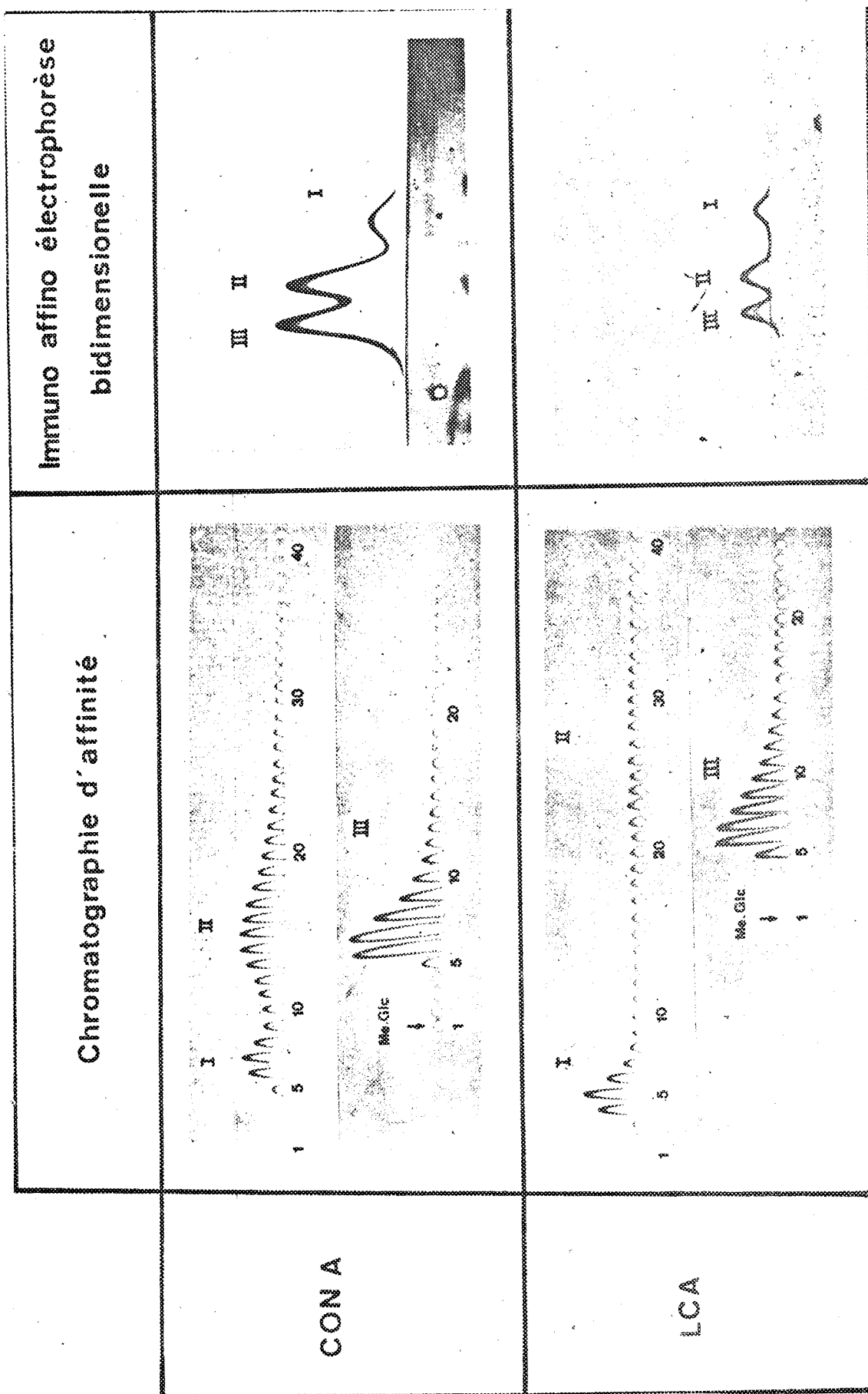


Figure 3.- Mise en évidence de l'hétérogénéité glycanique de l'APP isolée des milieux de culture par chromatographie d'affinité, révélée par la technique d'immunoélectrophorèse de Laurell (90) et par la technique d'immuno-affino-électrophorèse bidimensionnelle de Båg-Hansen (34) avec la Con A et la lectine de *Lens culinaris*.

les lectines, se trouve dans le pic exclu par la colonne en chromatographie d'affinité et ce variant migre le plus loin en immuno-affino-électrophorèse (pic I).

Le variant réagissant faiblement avec la Con A ou la LCA se trouve dans le pic retardé (pic II) en chromatographie sur colonne de lectine ainsi qu'en électrophorèse.

Quant au composé Con A ou LCA-réactif, il se trouve dans le pic retenu par la colonne (pic III) et dans celui migrant le moins loin en immuno-affino-électrophorèse.

Les résultats obtenus avec cette technique d'immuno-affino-électrophorèse reproduisent donc fidèlement ceux de la chromatographie d'affinité sur colonne de lectine-Sepharose. L'électrophorèse est plus rapide à mettre en oeuvre et permet d'utiliser des quantités moindres d'AFP : quelques nanogrammes en immuno-affino-électrophorèse contre 500 à 1000 microgrammes pour la chromatographie d'affinité. C'est donc à l'aide de cette méthode que nous caractériserons les iso-AFP de différentes origines.

Nous avons donc pu comparer les interactions de la Con A et de la LCA avec des iso-AFP provenant du liquide amniotique, de milieu de culture d'hépatocytes foetaux et de sérum de Rat hépatomateux.

Comme l'illustre la figure 4, des différences significatives sont observées dans les profils électrophorétiques obtenus avec les deux lectines (Con A et LCA). Pour l'AFP isolée de milieu de culture, nous constatons que l'iso-AFP Con A-réactive (pic III) est la plus faible chez l'AFP synthétisée in vivo et provenant du liquide amniotique ou du sérum de Rat hépatomateux. Inversement, le variant Con A-non réactif est en quantité très faible lorsque l'AFP est synthétisée in vitro par rapport aux taux observés pour l'AFP produite in vivo (figure 4).

Avec la lectine de Lens culinaris, les profils obtenus sont à rapprocher de ceux observés avec la Con A. Le variant LCA-non réactif (pic I) est en quantité faible chez l'AFP synthétisée in vitro et l'iso-AFP LCA-réactive est, proportionnellement, plus importante que lorsque l'AFP est produite in vivo.

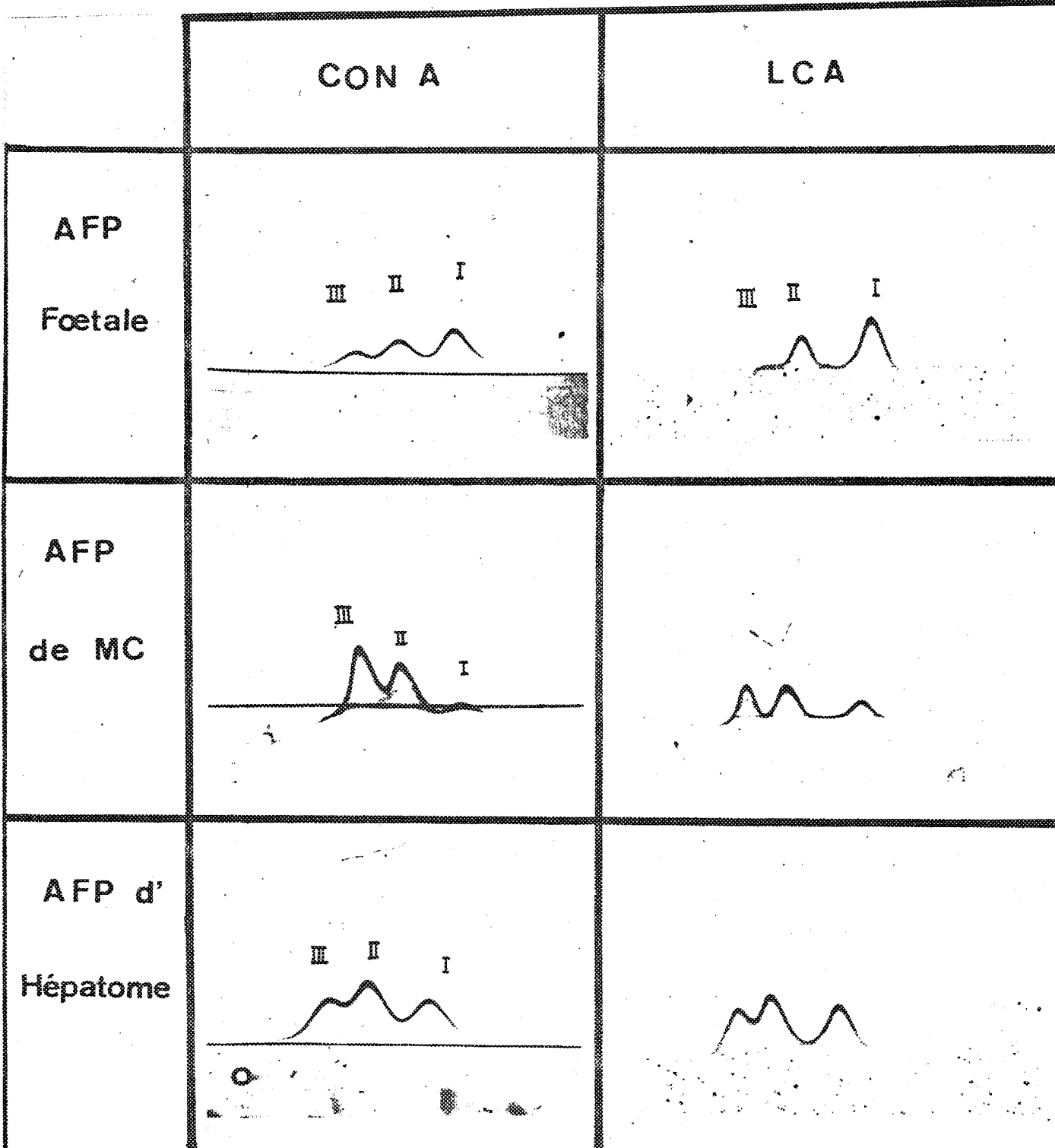


Figure 4.- Etude comparée par immuno-affino-électrophorèse bidimensionnelle de l'hétérogénéité glycanique vis-à-vis de la Con A et de la LCA de l'AFP de Rat provenant du liquide amniotique (AFP foetale), de milieux de culture (AFP de MC) et de sérum de rat hépatomateux (AFP d'hépatome).

I : Pic correspondant aux isoAFP sans affinité pour les lectines.

II : Pic correspondant aux isoAFP ayant une faible affinité pour les lectines.

III : Pic correspondant aux isoAFP réagissant fortement avec les lectines.

In vivo, les iso-AFP circulant dans le sérum ou dans le liquide amniotique résultent des synthèses combinées des hépatocytes et des cellules du sac amniotique. Or, en culture, in vitro, seuls les hépatocytes synthétisent les iso-AFP ; en conséquence, les profils différents que nous venons d'observer entre l'AFP produite in vivo et in vitro, pourraient s'expliquer par la double origine de l'AFP circulant.

c) Origine tissulaire des iso-AFP

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons tenté d'isoler l'AFP produite par les cellules du sac amniotique. En outre, nous avons recherché une éventuelle modification enzymatique de l'AFP d'origine hépatocytaire par les cellules du sac amniotique.

Les sacs amniotiques sont prélevés sur des embryons de 18 jours, ils sont broyés après plusieurs lavages dans un tampon Phosphate salin (PBS). Après centrifugation, l'AFP contenue dans le surnageant est analysée par immuno-affino-électrophorèse, alors que le culot de membranes est incubé à 37°C, une heure, avec l'AFPsynthétisée in vitro par les hépatocytes.

En fait, comme le montre la figure 5, les profils électrophorétiques résultant de l'interaction de l'AFP du sac amniotique avec la Con A et la LCA (figure 5C) s'apparentent à ceux observés précédemment avec l'AFP du liquide amniotique (figure 5A). On peut néanmoins déceler une légère diminution de la production du variant Con A-non réactif produit par le sac amniotique. De ce fait, nous pouvons confirmer que le sac amniotique et le foie produisent in vivo, dans des proportions sensiblement identiques, toutes les iso-AFP.

La qualité des iso-AFP produites par le sac amniotique est identique à celle des iso-AFP synthétisées par l'hépatocyte.

D'autre part, comme l'illustre la figure 5D, l'incubation d'AFP isolée des milieux de culture, avec des extraits de sac amniotique, ne modifie en rien les profils électrophorétiques des iso-AFP obtenus avec la Con A ou la LCA. Comme nous l'avons observé précédemment, notons que ces profils d'AFP produite in vitro restent toutefois très différents de ceux obtenus à partir de l'AFP produite in vivo.

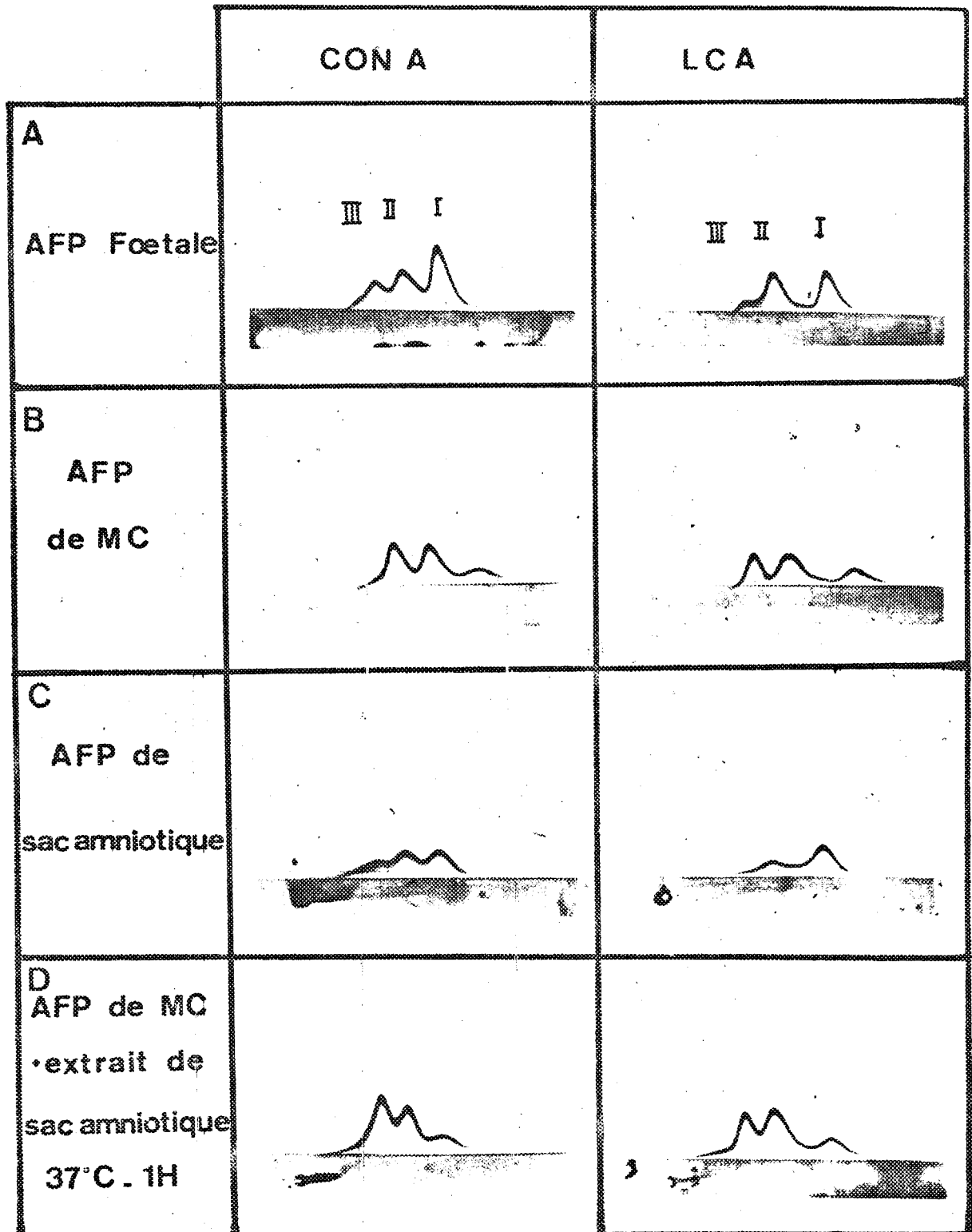


Figure 5.- Etude de l'influence du sac amniotique sur les profils d'affinité vis-à-vis de la Con A et de la LCA, de l'AFP synthétisée *in vitro* par les hépatocytes foetaux.

A - AFP foetale.

B - AFP de milieu de culture (AFP de MC)

C - AFP de sac amniotique

D - AFP de milieu de culture incubée à 37°C 1 heure avec des extraits membranaires de sac amniotique.

d) Recherche de modifications biochimiques de l'AFP produite
in vivo et in vitro

L'AFP synthétisée in vitro que nous étudions, provient d'une culture primaire d'hépatocytes foetaux de Rat. Afin de maintenir de bonnes conditions de développement de la culture, nous ajoutons, au milieu de culture, 10% de sérum de veau. Ce sérum favorise la fixation ainsi que la croissance cellulaire.

Nous avons envisagé l'éventualité suivante: à savoir que le sérum de veau peut, soit par la présence des nombreuses protéines qu'il contient, soit par une action enzymatique quelconque modifier les taux des diverses iso-AFP produites par les hépatocytes in vitro. De ce fait, l'incubation d'AFP purifiée, d'origine foetale, provenant du liquide amniotique a été effectuée en présence de 10% de sérum de veau à 37°C, durant une heure.

A la vue des résultats illustrés par la figure 6, cette hypothèse d'une modification enzymatique des iso-AFP par des enzymes du sérum de veau n'a pas été retenue, étant donné que les profils d'affinité avec la Con A et la LCA ne sont absolument pas modifiés et sont superposables aux profils témoins.

Nous pouvons conclure qu'il n'y a pas de modification des chaînes glycaniques des iso-AFP au cours de leur séjour dans le milieu de culture à 37°C, par le sérum de veau.

De la même manière, nous avons vérifié qu'il n'y avait pas de modification des chaînes glycaniques de l'AFP circulant par les glycosidases ou les glycosyltransférases sériques. Ainsi, comme en témoigne la figure 7, au cours de l'incubation de l'AFP synthétisée in vitro, par les hépatocytes, avec le sérum embryonnaire ou le liquide amniotique débarrassé de son AFP, nous n'avons observé aucune modification des profils électrophorétiques obtenus soit avec la Con A soit avec la lectine de Lens culinaris.

Nous pouvons conclure que les milieux biologiques dans lesquels sont sécrétés les iso-AFP n'ont pas pouvoir de modifier enzymatiquement les chaînes glycaniques.

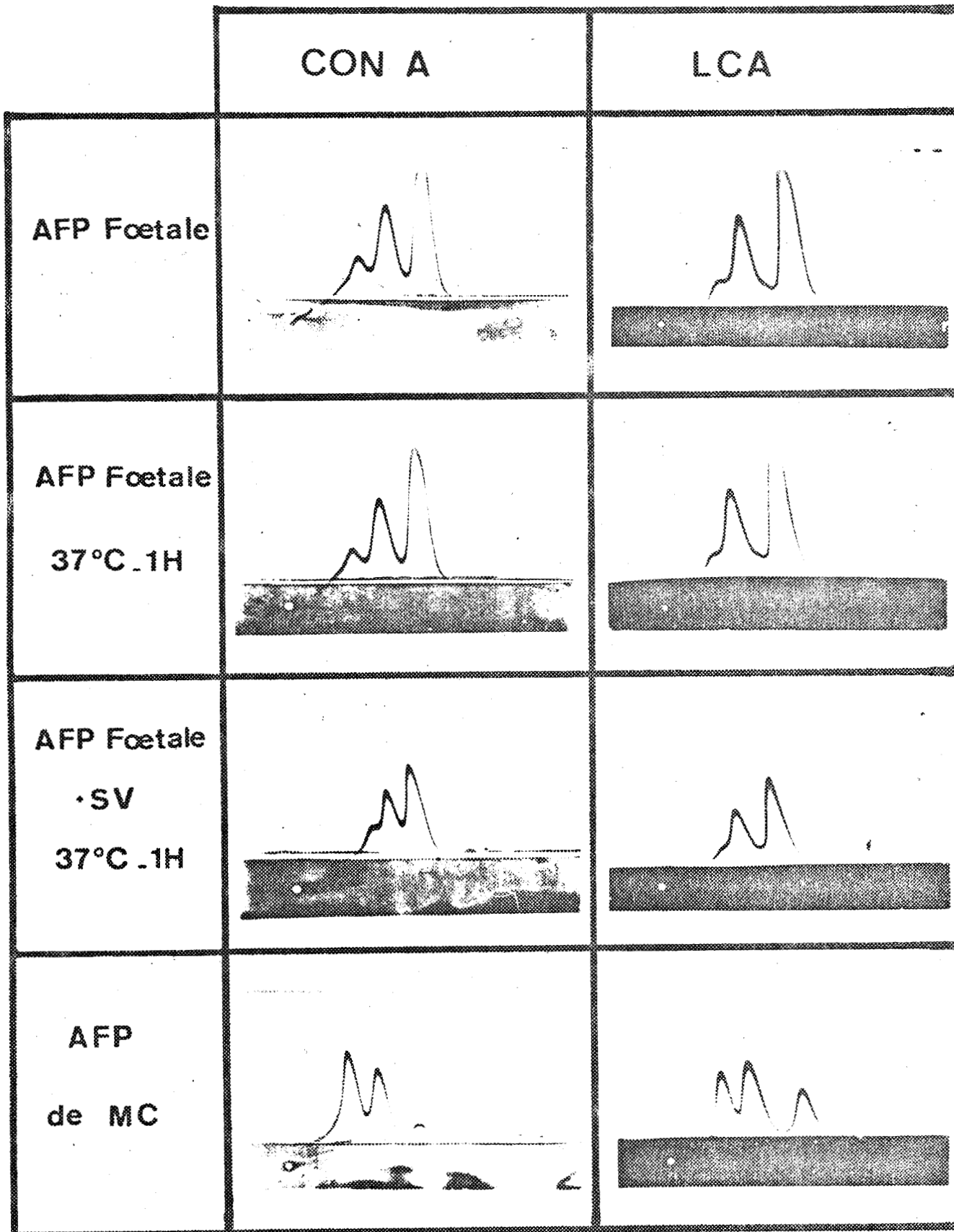


Figure 6.- Influence du sérum de Veau sur les profils d'affinité de l'AFP foetale de Rat produite in vivo vis-à-vis de la Con A et de la LCA.

AFP foetale isolée du liquide amniotique.

AFP foetale incubée une heure à 37°C.

AFP foetale incubée une heure à 37°C avec du sérum de Veau dans la proportion de 10 %.

AFP isolée de milieu de culture (MC).

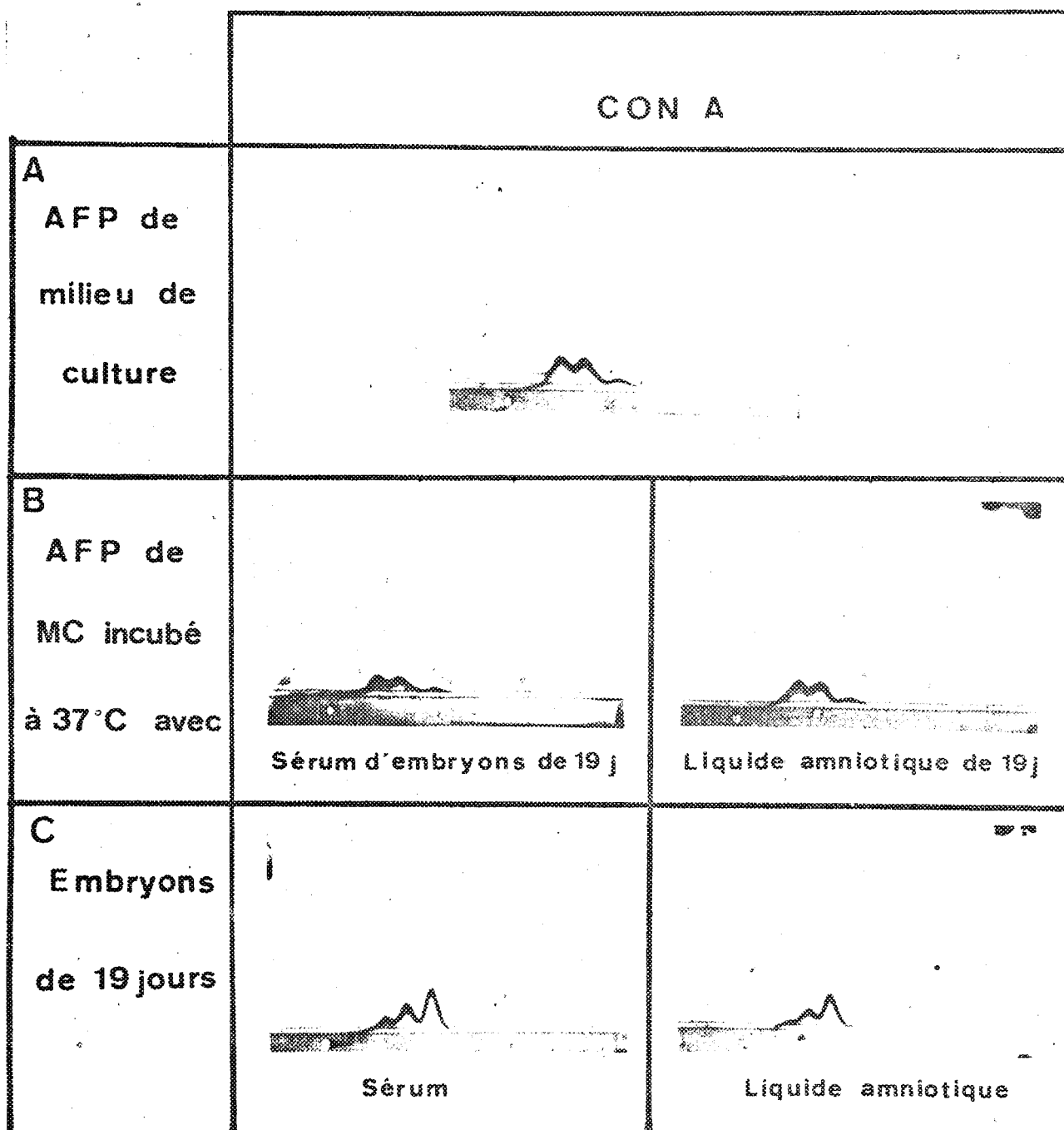


Figure 7.- Profils d'affinité vis-à-vis de la Con A et de la LCA de l'AFP de milieu de culture produite *in vitro* (A) ; après incubation avec du sérum foetal et du liquide amniotique d'embryons de Rat de 19 jours, dont on a éliminé l'AFP par passage sur colonne de Sepharose anti-AFP (B) ; AFP isolée de sérum et de liquide amniotique d'embryons de 19 jours (C).

e) Synthèse des iso-AFP en culture primaire de cellules de foie foetal

Comme nous l'avons observé précédemment, à l'aide des lectines de LCA et la Con A, les iso-AFP produites par les hépatocytes in vivo et in vitro n'ont absolument pas les mêmes caractéristiques. Les profils d'affinité comparés in vivo et in vitro en témoignent et nous font penser, qu'à ces modifications de profils correspondent des modifications structurales des glycanes. Ces modifications peuvent prendre naissance, soit subitement lors de la mise en culture, soit de manière lente et progressive au cours du développement et du vieillissement de la culture primaire de foies foetaux. De façon à mieux saisir le moment et les modalités de cette transition, nous avons collecté les milieux à intervalles réguliers de 24 heures et isolé de ces milieux, les populations d'iso-AFP par chromatographie d'affinité sur colonne de Sepharose anti-AFP.

Les 24 premières heures qui suivent la mise en culture constituent un intervalle de temps particulier au cours duquel certaines AFP sont produites de novo par les hépatocytes alors que d'autres ont été initiés et transcrits in vivo et sécrétés in vitro. De ce fait, les profils de réactivité des AFP produites au cours de cette période (temps : -24, 0), avec la Con A mais aussi surtout avec la LCA (figure 8) ont une allure particulière.

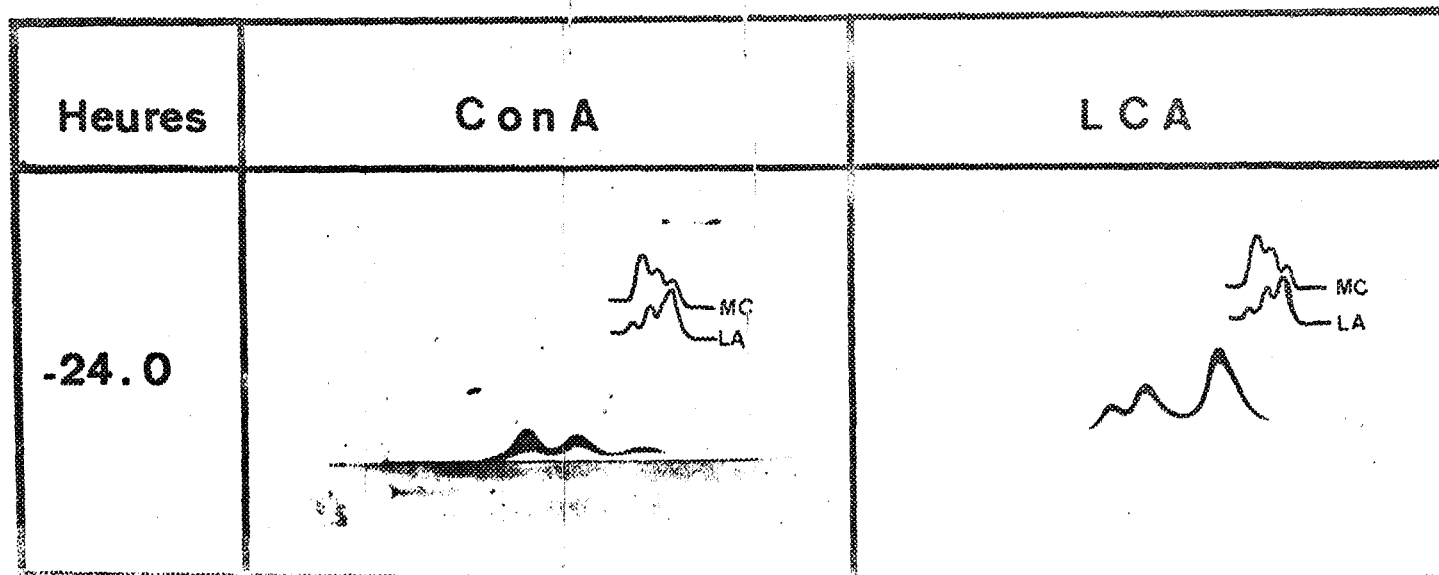


Figure 8.- Profils électrophorétiques d'affinité vis-à-vis de la Con A et de la LCA, de l'AFP de Rat sécrétés in vitro par les hépatocytes, du moment de la mise en culture jusqu'au changement de milieu (t : - 24,0). (MC et LA : rappel des profils d'affinité obtenus avec l'AFP provenant des milieux de culture (MC) et du liquide amniotique (LA)).

En effet, le profil obtenu avec la Con A est déjà totalement différent de celui observé pour l'AFP du liquide amniotique. Le variant Con A-réactif prédomine déjà dès les premières heures de la culture. Par contre, le profil LCA des iso-AFP de milieu de culture ressemble encore à celui des AFP du liquide amniotique. Le variant LCA-non réactif étant toujours prédominant dans cette première période, le profil ne sera modifié qu'ultérieurement, au moment du changement de milieu. En conséquence, au cours de ce passage de la vie des hépatocytes foetaux in vivo à une survie in vitro, au moins deux modifications structurales des chaînes glycaniques interviennent à deux moments différents. La première, révélée par la Con A, affecte le branchement d'un résidu de N-acétyl glucosamine en position 4 sur le β mannose ; la seconde modification, révélée par la LCA, n'intervient que beaucoup plus tardivement. La spécificité de la LCA étant encore mal définie, il nous est impossible actuellement, de préciser la nature de cette variation structurale.

Nous considérons cette première phase de la culture comme une phase transitoire. De manière à éliminer les protéines initiées in vivo et excrétées in vitro, nous changeons et remplaçons les milieux de culture au bout de 24 heures après la mise en culture. Ce changement de milieu constitue pour la culture le temps zéro.

Comme le montre la figure 9, les profils d'affinité avec la Con A et la LCA, des iso-AFP produites en culture à intervalles de temps de 24 heures sont superposables et identiques aux profils obtenus avec les iso-AFP produites entre 0 et 96 heures. La superposition des profils montre qu'il existe une parfaite stabilité des iso-AFP produites tout au long de la culture.



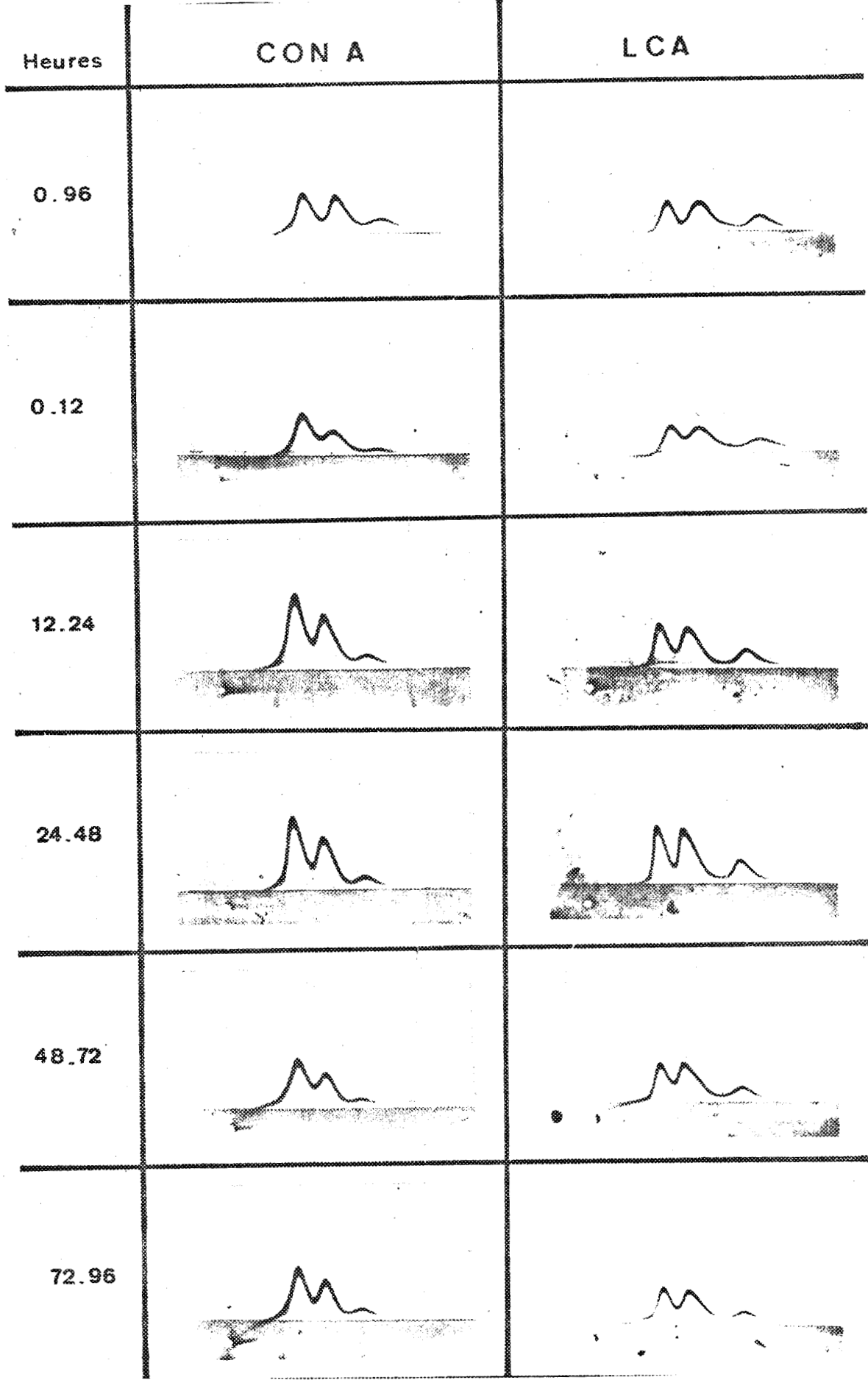


Figure 9.- Profils d'affinité vis-à-vis de la Con A et de la LCA de l'AFP de Rat produite *in vitro* dans les milieux de culture durant différents intervalles de temps au cours de la culture primaire d'hépatocytes foetaux.



2 - ETUDE DE L'INFLUENCE DE CERTAINS FACTEURS SUR LA PRODUCTION ET LA QUALITE DES ISO-AFP SECRETEES IN VITRO EN CULTURE PRIMAIRE D'HEPATOCYTES FOETAUX.

La croissance cellulaire est suivie tout au long de la culture par numération des cellules toutes les 24 heures. L'AFP et l'albumine sont dosées par immuno-électrophorèse et la production de protéine peut être ramenée à la quantité de protéine synthétisée par cellule.

Les études in vivo ne permettent pas de relier la production d'AFP à la prolifération cellulaire alors que la culture primaire in vitro permet de quantifier le nombre de cellules ainsi que l'AFP synthétisée par ces cellules et présente dans les milieux de culture.

Les protéines synthétisées in vivo et sécrétées durant les 24 premières heures de la culture sont éliminées et le milieu est remplacé par un milieu neuf, identique au précédent. Ce temps, 24 heures après la mise en culture, constitue le temps zéro de notre étude. La courbe de prolifération cellulaire (figure 10) d'une culture d'hépatocytes foetaux peut être divisée en trois étapes.

1°) Au cours des 24 heures qui suivent le changement de milieu, la culture s'adapte ; la division cellulaire est nulle ou très faible : c'est la lag phase non représentée sur la figure.

2°) Durant la phase suivante de croissance, la prolifération cellulaire est pratiquement linéaire et les cellules se divisent rapidement.

3°) Au-delà de 120 heures, les cellules ne se divisent plus, elles deviennent confluentes, c'est la phase stationnaire ; puis elles meurent, se détachent du fond du flacon et flottent dans le milieu. Les études de prolifération cellulaire et de production protéique seront donc limitées aux 120 premières heures de culture.

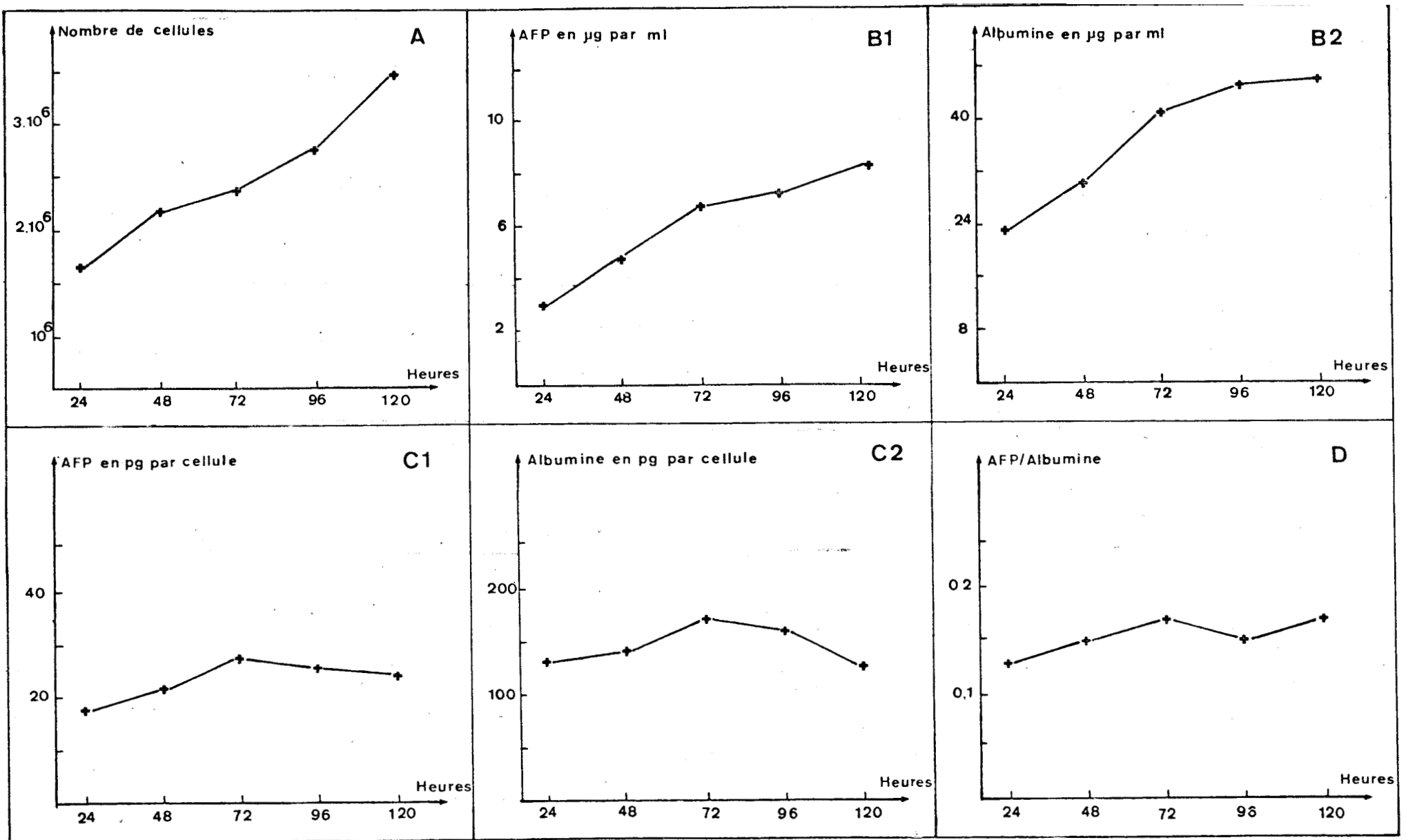


Figure 10.- A) Courbe de prolifération cellulaire des hépatocytes foetaux en culture primaire. B) Courbes de production d'AFP (B1) et d'albumine (B2) dans les milieux de culture en fonction du temps. C) Cinétique de la production d'AFP (C1) et d'albumine (C2) des cellules. D) Evolution du rapport AFP/albumine en fonction du temps.

L' AFP et l'albumine présentes dans les milieux de culture sont dosées, sans concentration préalable des milieux, par la méthode d'immuno-électrophorèse de Laurell (89). Ces dosages permettent d'établir les courbes de production de ces deux protéines en fonction du temps comme le montre la figure 10. D'autre part, nous pouvons observer les variations au cours du temps de la production protéique par cellule. Nous constatons que celle-ci se stabilise rapidement après le début de la culture. Nous pouvons noter, en outre, que la production d'AFP est nettement inférieure à la production d'albumine (20 à 30 pg/cellule pour l'AFP, environ 100 à 200 pg/cellule pour l'albumine). Nous traçons, d'autre part, la courbe du rapport AFP/albumine en fonction du temps qui sera utile pour étudier l'influence de drogues sur la production protéique.

2.1. Etude de l'action d'agents chimiques modifiant le cycle cellulaire

Nous pouvons, grâce à notre système de culture primaire, faire une approche du problème de la synthèse de l'AFP au cours du cycle cellulaire. Durant la culture, la prolifération cellulaire est suivie parallèlement à la synthèse protéique.

L'action des agents chimiques, méthotrexate, bléomycine et colchicine, est suivie facilement par une observation du comportement des cellules poussant en leur présence et par une étude de l'AFP et de l'albumine synthétisées par ces cellules.

Le méthotrexate et la bléomycine inhibent la prolifération cellulaire aux faibles concentrations utilisées (2,5 $\mu\text{g/ml}$ pour le méthotrexate et 1,5 $\mu\text{g/ml}$ pour la bléomycine). En présence de ces agents, les cellules survivent sans se diviser (figure 11).

Quant à la colchicine, elle reste très toxique à des doses extrêmement faibles (0,2 $\mu\text{g/ml}$) et provoque une mort cellulaire très importante. Notre étude se limitera donc au méthotrexate et à la bléomycine qui sont connus pour bloquer, respectivement, les cellules en fin de phase G1 et en phase G2 du cycle cellulaire.

Comme l'illustre la figure 11 A, les cellules traitées au méthotrexate et à la bléomycine voient leur prolifération cellulaire bloquée et stabilisée à 10^6 cellules par boîte de culture alors que les cellules non traitées ont une prolifération cellulaire normale, qui triple toutes les 100 heures.

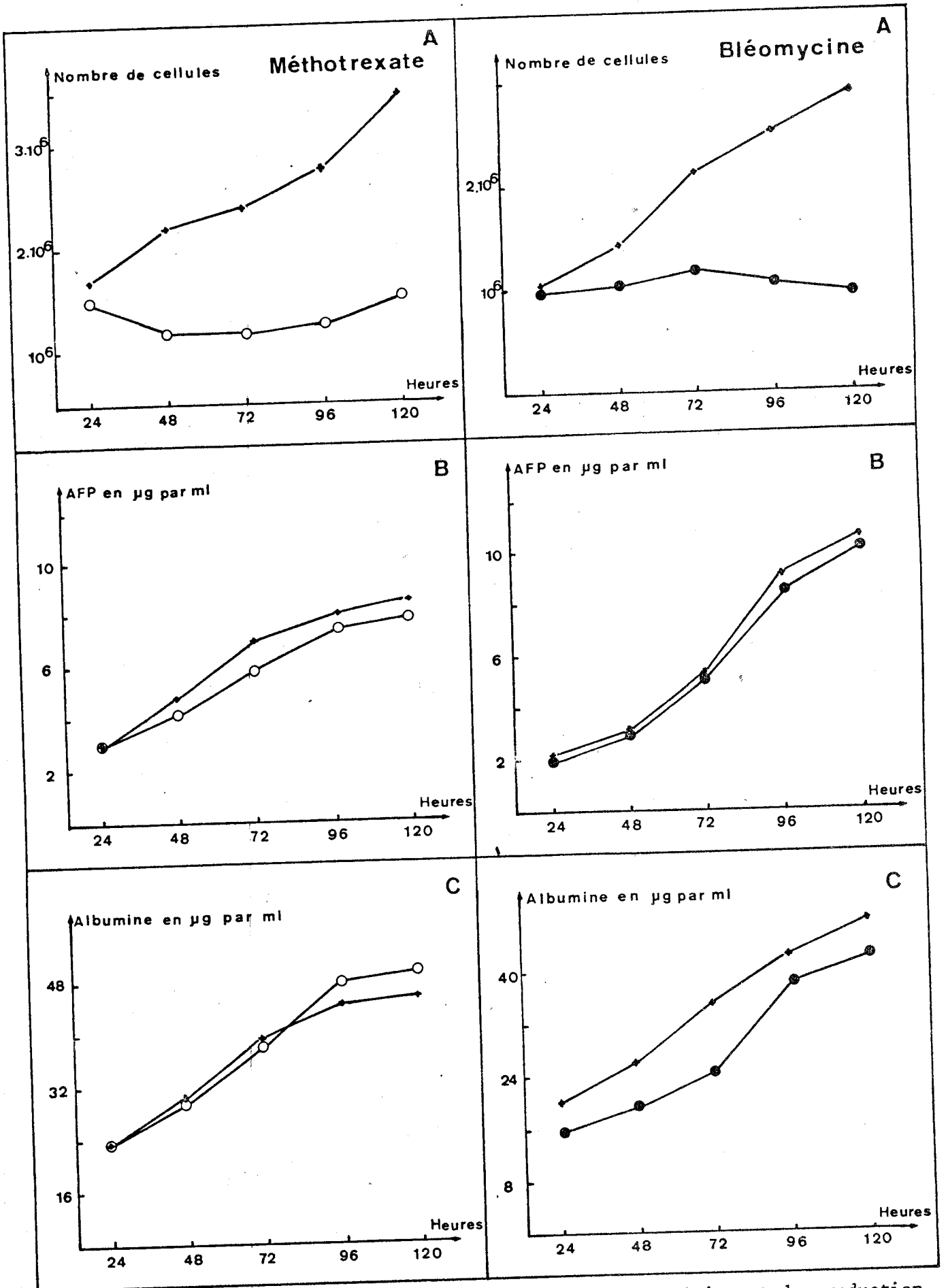


Figure 11.- Modification des courbes de prolifération cellulaire et de production protéique par le méthotrexate ou la bléomycine.
 A) Courbes de prolifération cellulaire ; B) Courbes de production d'AFP dans les milieux de culture ; C) Courbes de production d'albumine dans les milieux en fonction du temps. + Courbes obtenues en milieu témoin ; o courbe obtenue avec

Malgré cet arrêt de la prolifération cellulaire, nous n'avons pas observé, dans les lots de cellules traitées, de diminution concomitante de la production des iso-AFP et de l'albumine comme l'on pouvait s'y attendre (figure 11B,C).

Nous avons vérifié, par ailleurs, en immuno-affino-électrophorèse, la qualité de ces iso-AFP sécrétées par les cellules traitées. A cet égard, les études d'immuno-affino-électrophorèse avec les lectines, comme la Con A ou la LCA, nous montre (figure 12) que les variants produits par les lots de cellules traitées au méthotrexate ou à la bléomycine sont rigoureusement identiques aux iso-AFP produites par les lots de cellules témoins non traitées.

Par contre, les cellules traitées à la colchicine produisent des iso-AFP dont les profils sont sensiblement modifiés. Comme le montre la figure 12, cet AFP semble avoir plus d'affinité pour la Con A, en effet, nous observons que les variants ne réagissant pas ou peu avec cette lectine, sont quantitativement plus faibles comparés à ceux obtenus avec les cellules non traitées.

2.2 Influence de l'AMPc et de la Théophylline sur la production d'AFP

Dans tous les cas, les agents chimiques étudiés sont cytotoxiques ; les doses employées sont donc très faibles. Pour de faibles concentrations (10^{-8} à 10^{-6} M) l'AMPc activerait la division cellulaire, alors que des concentrations supérieures à 10^{-6} M l'inhiberait (100). Nous utilisons des concentrations, en AMPc, de $0,5 \cdot 10^{-6}$ M, cette même concentration est employée pour la théophylline.

Nous observons, pour ces deux agents, la courbe de prolifération cellulaire en fonction du temps -numérations cellulaires effectuées toutes les 24 heures-; nous dosons en même temps dans les milieux, l'AFP et l'albumine. La courbe du rapport AFP/albumine permet de savoir si la drogue a une action sélective sur l'une ou l'autre de ces protéines. L'AFP est isolée des milieux de culture recueillis, elle est ensuite analysée en immuno-affino-électrophorèse.

L'AMPc et la théophylline sont ajoutées directement au milieu, au temps zéro, à la concentration de 0,5mM (figure 13). A cette concentration, l'AMPc ralentit sensiblement la prolifération cellulaire ; par contre, l'effet est beaucoup plus visible avec la théophylline qui bloque très sélectivement la prolifération cellulaire.

Nous avons, d'autre part, utilisé le dibutyryl AMPc qui grâce à son groupement dibutyryl, a une action plus rapide et plus efficace que l'AMPc. Cependant, la très grande cytotoxicité de ce produit ne permet pas une étude

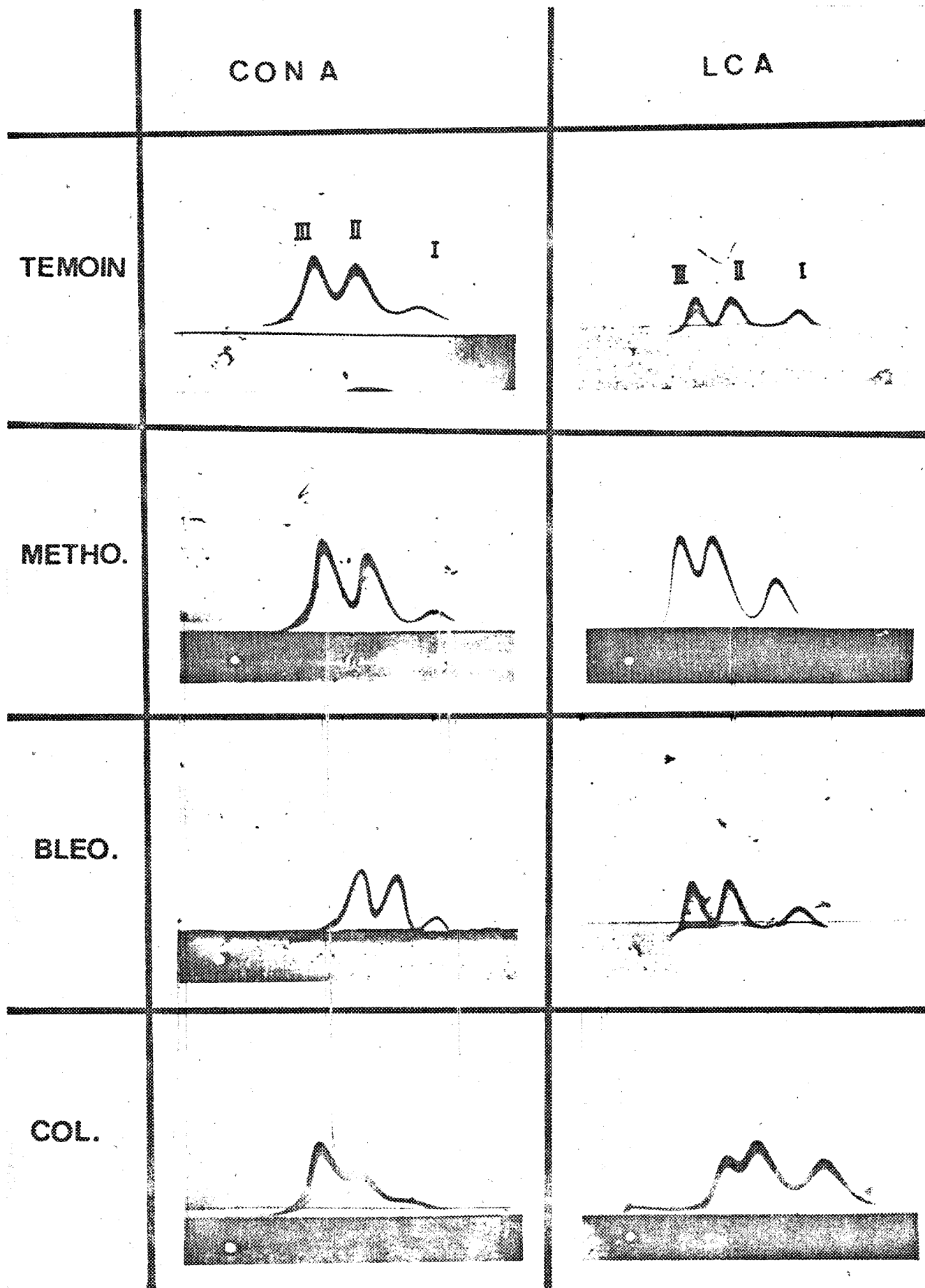


Figure 12.- Profils d'affinité vis-à-vis de la Con A et de la LCA de l'AFP produite *in vitro* dans les milieux de culture par les hépatocytes *in vitro* en milieu témoin (TEMOIN), en présence de méthotrexate (METHO), de bléomycine (BLEO) ou de colchicine (COL).

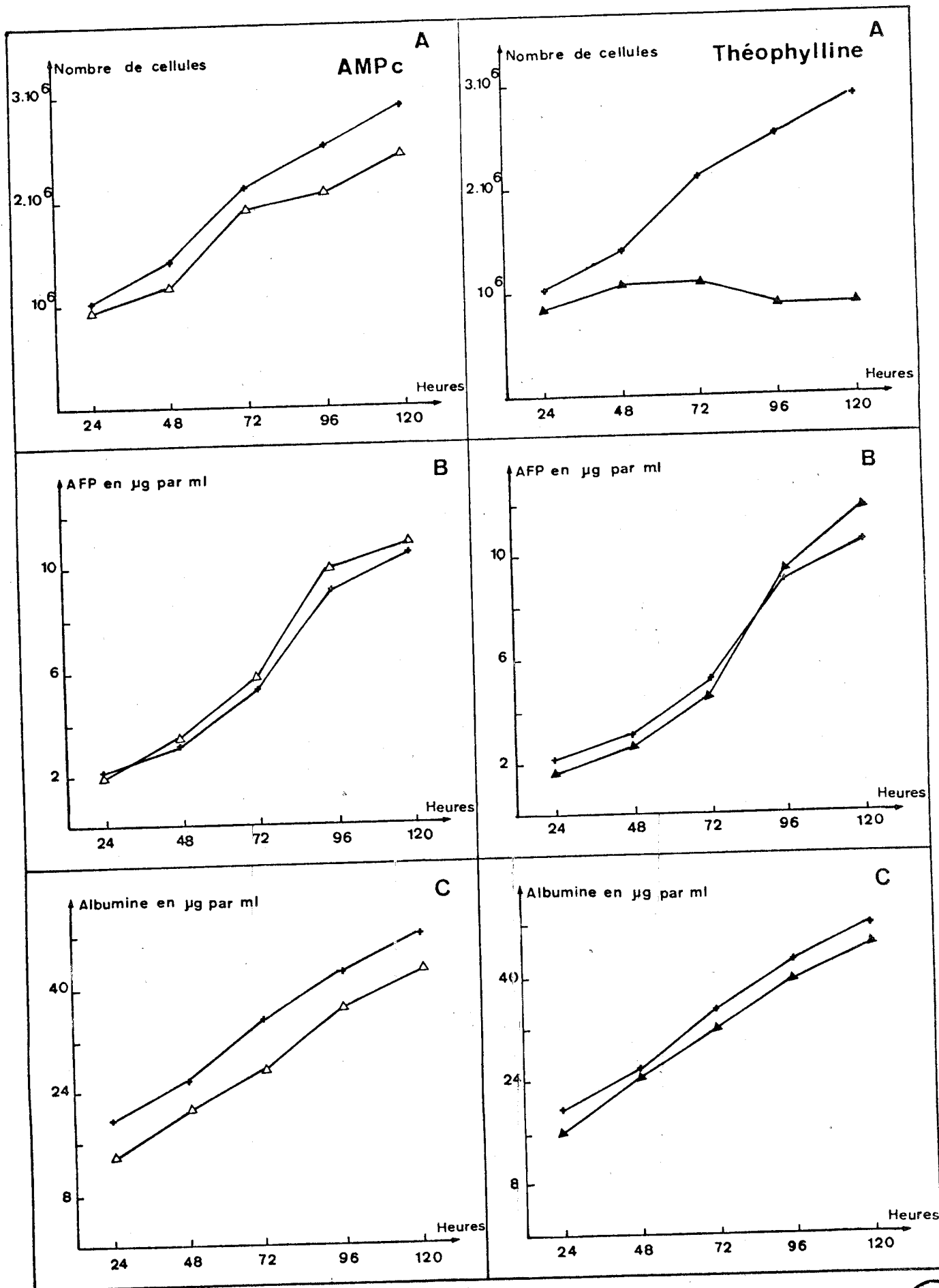


Figure 13.- Comportement des cellules en culture en présence d'AMPc (1) et de théophylline (2).
 A) Courbes de prolifération cellulaire ; B) Courbes de production d'AFP dans les milieux en fonction du temps ; C) Courbes de production d'albumine dans les milieux de culture. Δ courbes obtenues avec milieu témoin. \bullet Courbes obtenues en milieu de culture.

précise; nous nous sommes donc limitée à l'AMPc.

En présence d'AMPc, la production globale d'AFP est légèrement augmentée (figure 13 B1) alors que la production totale d'albumine est inférieure à celle observée dans la culture témoin (figure 13 C1). La synthèse d'AFP, ramenée à la production par cellule, est donc stimulée par l'AMPc, alors que celle de l'albumine n'est pas modifiée (figure 14). Le rapport AFP/albumine est donc supérieur pour les cellules se divisant en présence d'AMPc par rapport à la culture témoin (figure 15).

La théophylline a un effet de stimulation sur la synthèse et la sécrétion protéique (figure 13), cette stimulation est sensiblement la même pour l'AFP et pour l'albumine.

En présence d'AMPc ou de théophylline, les profils immuno-électrophorétiques des iso-AFP, sécrétées par les cellules, se trouvent légèrement modifiés. L'étude comparée des profils d'affinité avec les lectines, nous indiquent que l'AMPc et la théophylline diminuent l'affinité des iso-AFP pour la Con A ou la LCA. En effet, nous observons (figure 16) que les iso-AFP faiblement réactives vis à vis de la Con A (pic II) sont, en proportion, plus élevées que la famille d'iso-AFP fortement réactive (pic III).

2.3. Influence d'un cancérigène : l'acétylaminofluorène sur la production d'AFP

L'acétylaminofluorène (AAF) est un hépatocancérigène puissant ; c'est le cancérigène précurseur du N-acétoxy-acétylaminofluorène, composé que l'on pense être l'un des cancérigènes ultimes majeurs dans le foie (107).

Nous avons donc pensé qu'il serait intéressant d'observer les effets de l'AAF sur les cellules en culture.

Le cancérigène est ajouté au milieu de culture dissout dans un mélange DMFA/DMSO (1-1). Trois séries de culture sont utilisées au cours de notre expérimentation : une série témoin de cellules se développant en milieu complet, une série de contrôle de cellules qui prolifèrent dans un milieu additionné de solvant DMFA/DMSO, une troisième série de cellules soumises à l'action de l'acétylaminofluorène ajouté au milieu de culture. La concentration en AAF

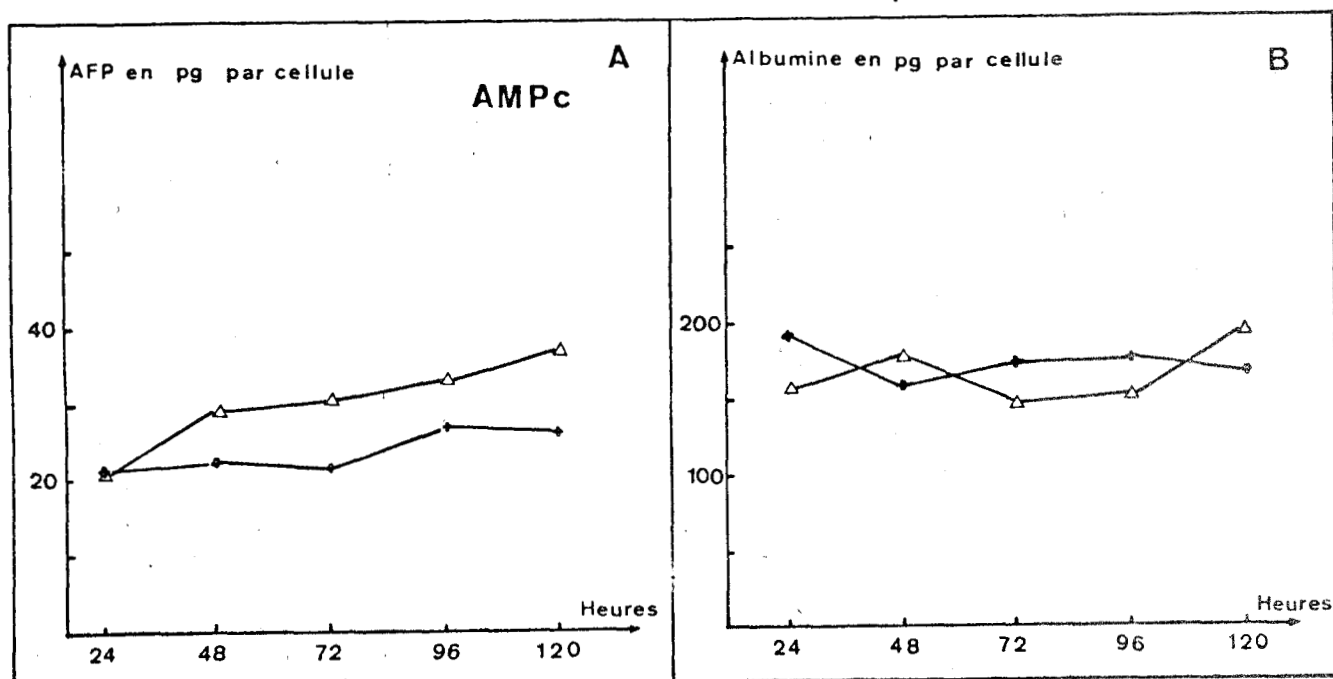


Figure 14.- Cinétique de production protéique des cellules en présence d'AMPc (0,5 mM). A) Production d'AFP ; B) Production d'albumine. + Courbes obtenues en milieu témoin. Δ Courbes obtenues avec les cellules traitées avec l'AMP cyclique.

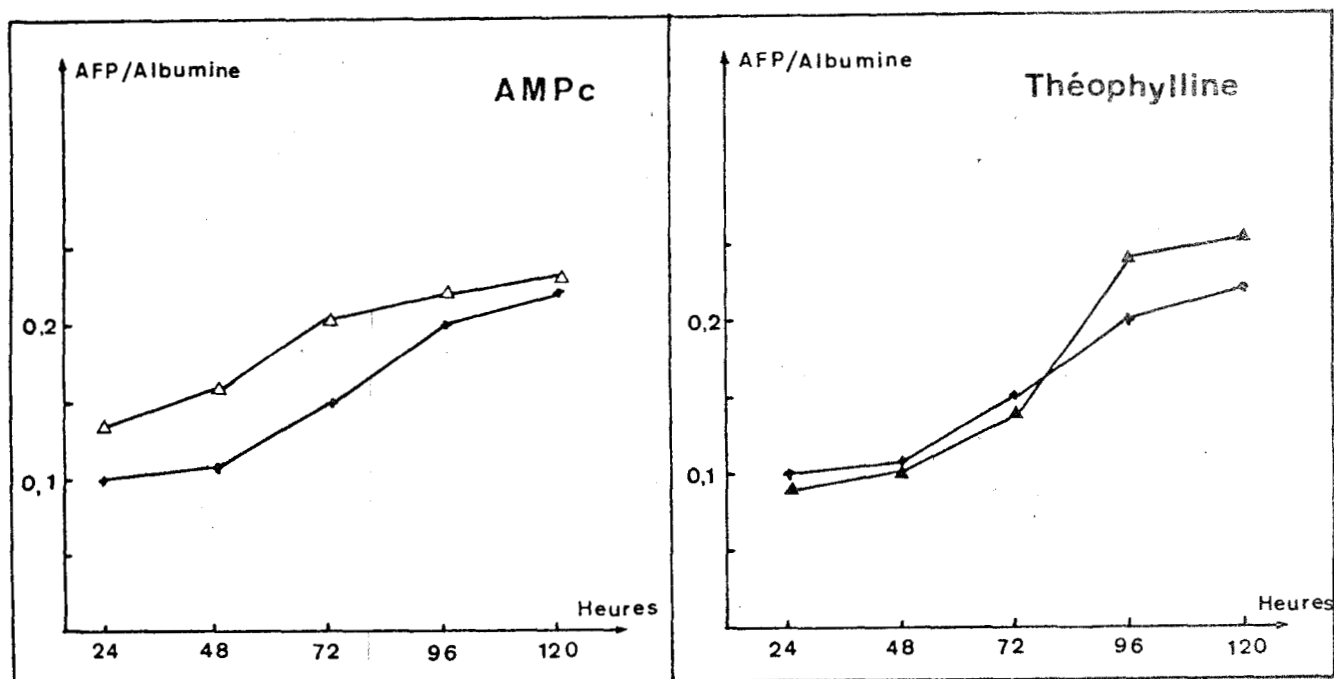


Figure 15.- Evolution des rapports AFP/albumine en fonction du temps lorsque les cellules sont en contact avec l'AMPc (0,5 mM) et la théophylline (0,5 mM). + Courbes obtenues en milieu témoin. Δ Courbes obtenues avec les cellules traitées avec l'AMP cyclique. ▲ Courbes obtenues avec les cellules traitées à la théophylline.

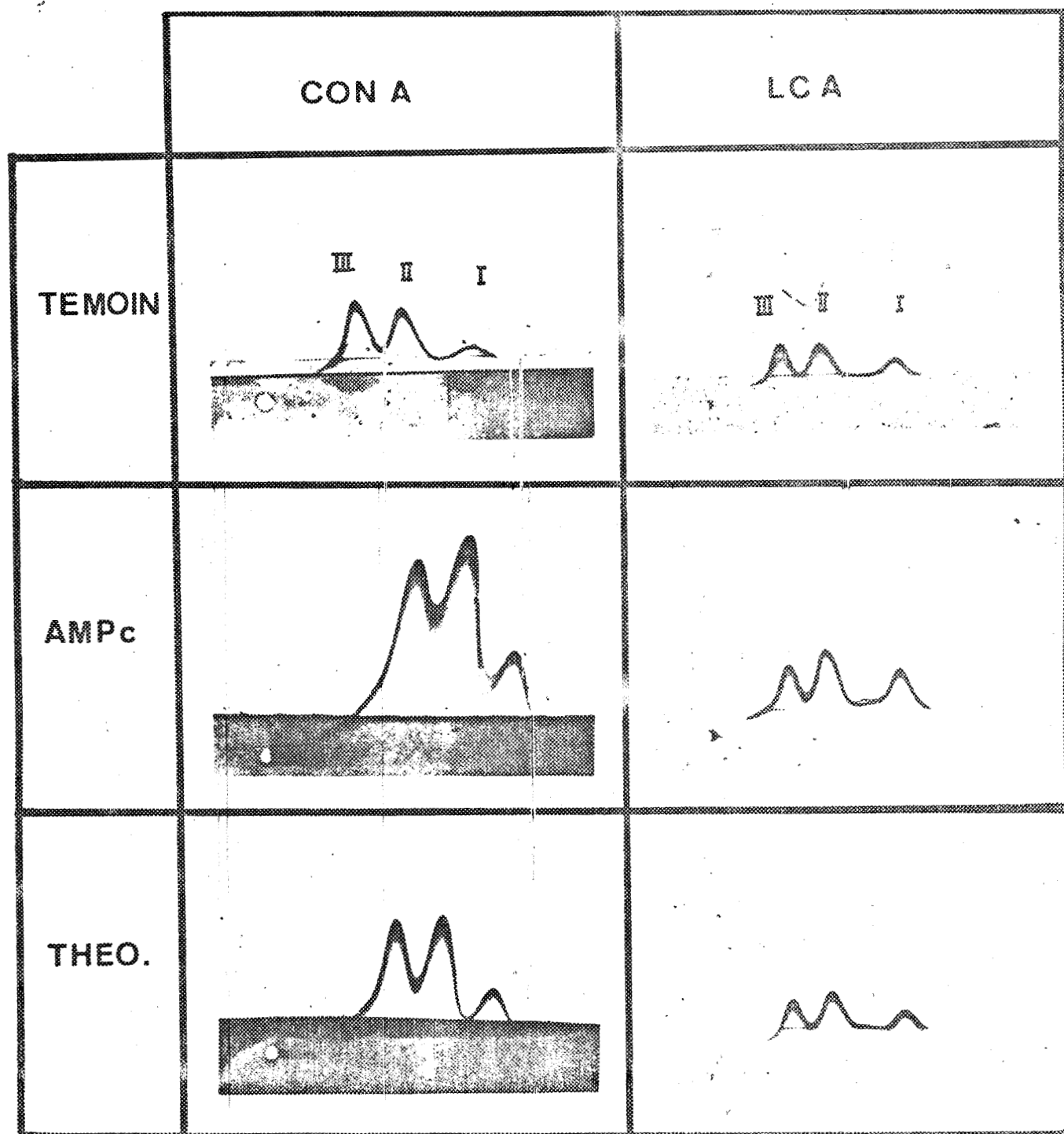


Figure 16.- Profils d'affinité vis-à-vis de la Con A et de la LCA de l'AFP produite in vitro par les hépatocytes en milieu témoin (TEMOIN), en présence d'AMPc (AMPc) ou de théophylline (THEO).

utilisée (5 $\mu\text{g/ml}$) permet une croissance cellulaire proche de celle observée pour la culture témoin.

Comme le montre la figure 17, la présence d'AAF mais aussi de DMFA/DMSO dans le milieu de culture, stimule la synthèse d'AFP tout en ne modifiant pas la production d'albumine.

D'autre part, cette augmentation de la production d'AFP par l'AAF et le solvant ne modifie pas la qualité des iso-AFP sécrétées. Comme on peut l'observer sur la figure 18, les profils d'immuno-affino-électrophorèse sont identiques à ceux des AFP produites par les cellules non soumises à l'influence de ces composés.

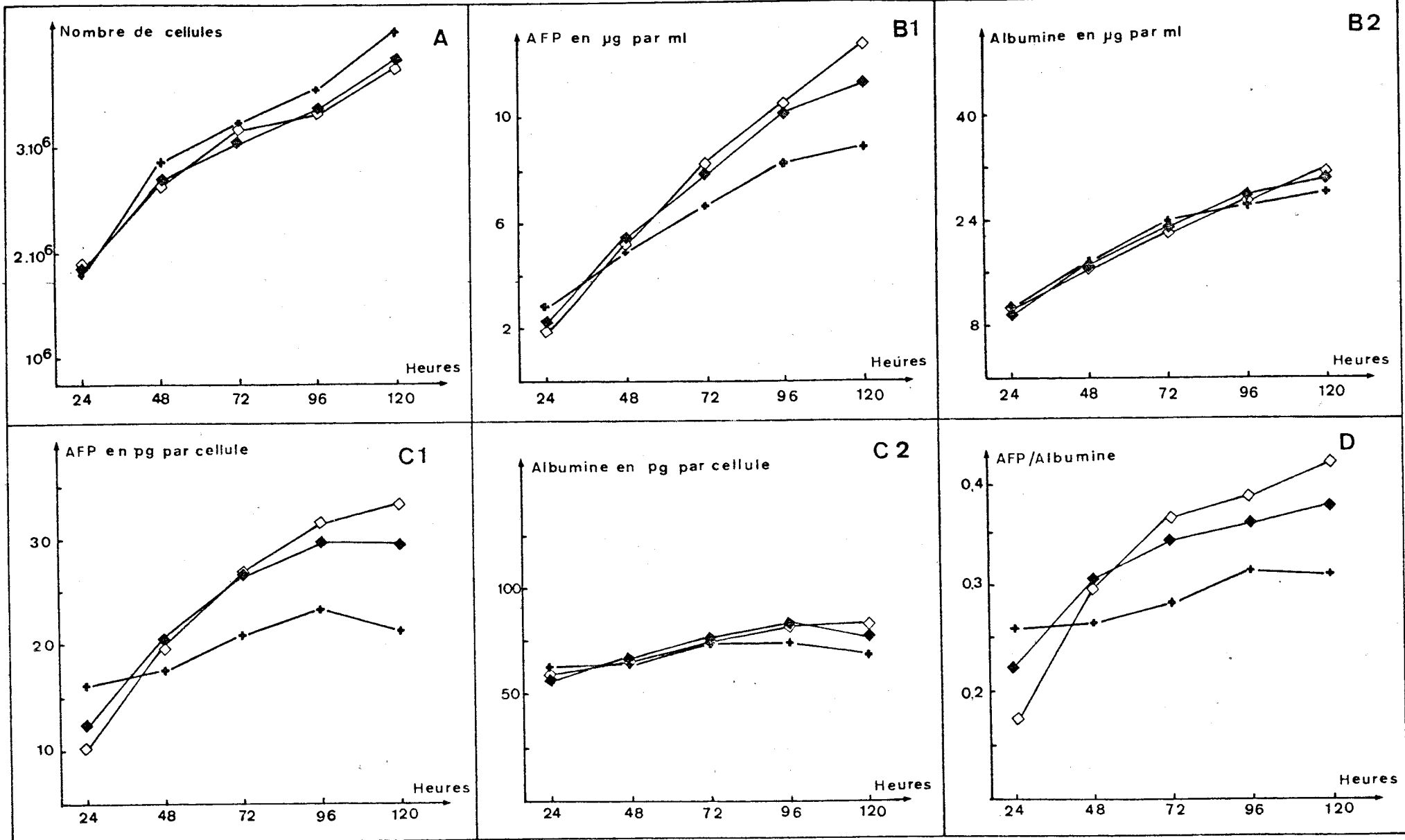


Figure 17.- Influence sur le comportement des cellules en culture, du solvant DMFA-DMSO (◇-◇) et de l'AAF (◆-◆).
 A) Courbes de prolifération cellulaire ; B) Courbes de production d'AFP (B1) et d'albumine (B2) dans les milieux de culture en fonction du temps ; C) Cinétique de la production d'AFP (C1) et d'albumine (C2) des cellules ; D) Evolution du rapport AFP/albumine en fonction du temps. + Courbes témoins.



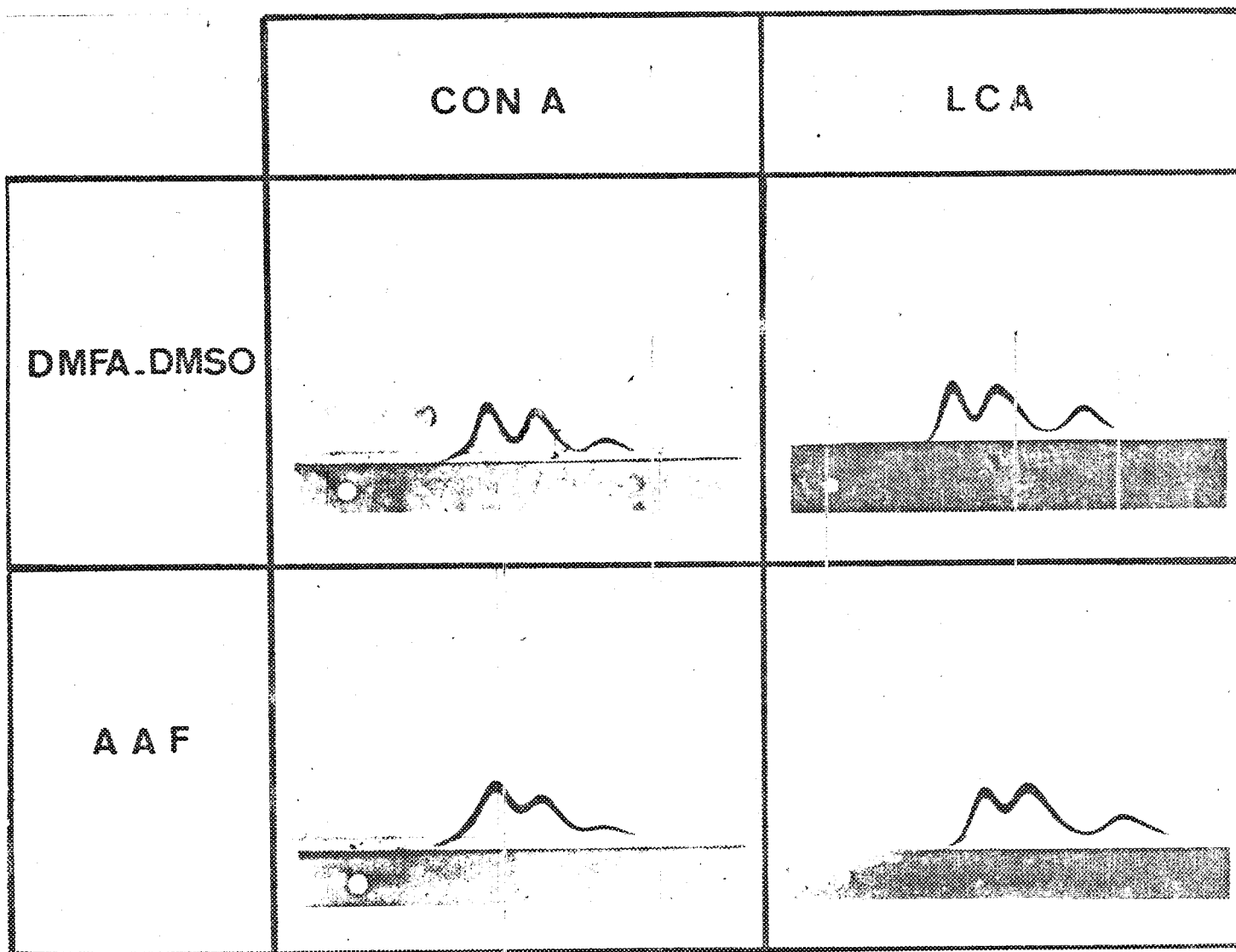


Figure 18.- Profils d'affinité vis-à-vis de la Con A et de la LCA de l'AFP produite in vitro par les hépatocytes foetaux en milieu de culture additionné de solvant DMFA-DMSO ou d'AAF.

DISCUSSION

1 - ETUDE COMPARATIVE DE L'AFP SYNTHETISEE IN VIVO ET IN VITRO

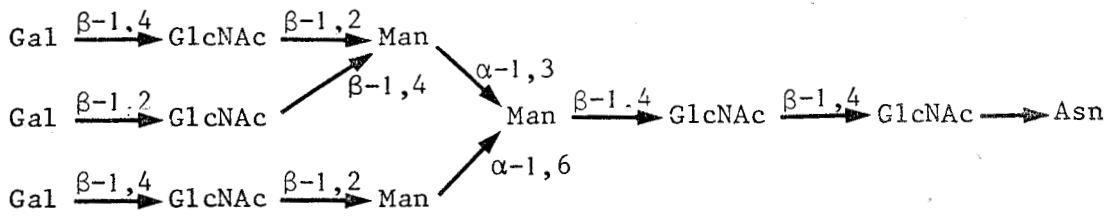
L'hétérogénéité des iso-AFP est maintenant bien établie chez diverses espèces (Rat, Souris, Homme) et ceci grâce à l'électrophorèse en gel de polyacrylamide (hétérogénéité protéique) et à la chromatographie d'affinité vis à vis des lectines, comme la Concanavaleine A et la lectine de Lens culinaris (hétérogénéité glycanique).

Cette microhétérogénéité est caractérisée, soit par l'utilisation de la lectine immobilisée sur un support en chromatographie d'affinité sur colonne, soit par l'utilisation de la lectine libre en immuno-affino-électrophorèse bidimensionnelle. Cette dernière technique devrait connaître de nombreuses applications car elle s'est révélée comme une méthode sensible, reproductible et ne nécessitant que peu de produit ; elle se prête donc bien, comme le montre notre étude, au dosage et à la caractérisation des iso-AFP produites en très faible quantité dans les milieux de culture. C'est une méthode qualitative et semi-quantitative dont les profils reflètent les différents degrés d'interaction de ces iso-AFP avec les lectines.

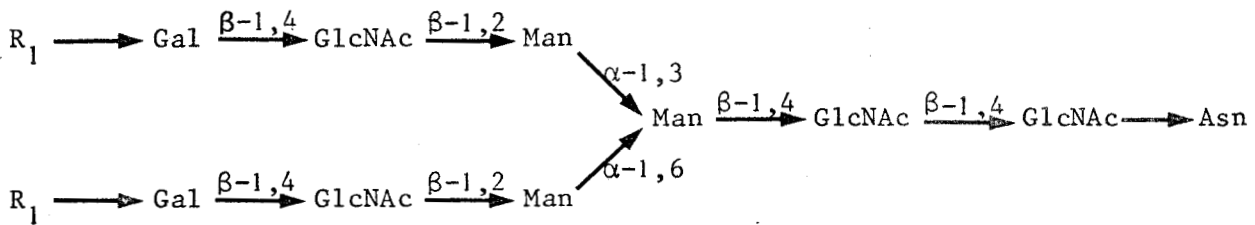
La spécificité de la Con A avec les glycanes a fait l'objet de nombreux travaux (21, 58, 78, 83, 84, 112) qui se trouvent résumés dans la figure 19. L'AFP de milieu de culture présente avec la Con A trois types d'interaction :

- 1) une fraction mineure n'interagissant pas avec cette lectine ;
- 2) une fraction réagissant faiblement et qui résulte, probablement, d'une interaction hydrophobe ;
- 3) une fraction majeure réagissant fortement avec la lectine.

Les récentes analyses structurales comparées des fractions 1 et 3 (Strecker, Bayard, Kerckaert), démontrent que seule, la présence d'une N-acétyl glucosamine additionnelle substituant le β mannose en C4 suffit pour abolir toute

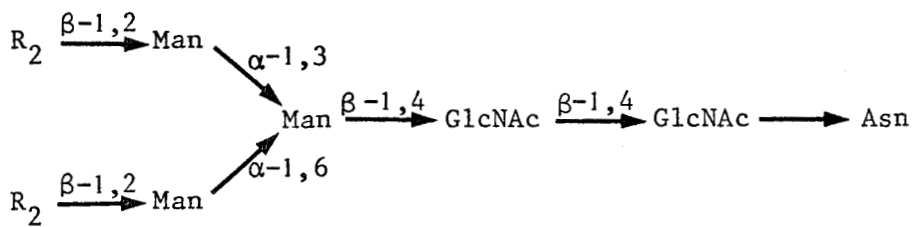


A



R_1 : H ou Acide Sialique (AS)

B



R_2 : H ou GlcNAc ou Gal-GlcNAc ou AS-Gal-GlcNAc

C

Figure 19.- Structures des groupements glycaniques plus ou moins fixés par la Con A selon Narasimhan *et al.* (112).

A : Structure glycanique non fixée par la Con A.

B : Structure glycanique ayant une faible affinité pour la Con A.

C : Structure glycanique fortement fixée par la Con A.

interaction avec la lectine (figure 20). Cette observation a été récemment décrite par Baenziger et Fiete (21) à propos de la structure des chaînes glycaniques des immunoglobulines G bovines. Le variant majeur produit dans les milieux de culture et réagissant avec la Con A possède deux glycannes identiques dont les structures s'apparentent à celles des glycannes de la transferrine humaine (165).

Toutefois, notre étude démontre clairement, que d'importantes modifications structurales des chaînes glycaniques interviennent lors de la mise en culture des hépatocytes foetaux. En effet, l'étude comparée des profils d'interaction avec les lectines des AFP de milieu de culture et de liquide amniotique sont inversés, le variant ne réagissant pas avec la Con A est le composé majeur dans le liquide amniotique. Ayant démontré, l'absence d'activité N-acétylglucosaminidase dans les milieux de culture, nous pouvons souscrire à l'idée que in vitro, la N-acétylglucosaminyl transférase est, en grande partie, inactive ou inhibée lorsque les hépatocytes survivent en culture de cellules. Cette conclusion devrait amener les auteurs à analyser les résultats des études structurales des glycannes synthétisés en culture avec beaucoup de prudence.

Les spécificités d'interaction des glycannes avec la lectine de Lens culinaris (LCA) sont moins bien connues (180, 201) et les structures glycaniques des variants obtenus avec la LCA n'ont, à ce jour, pas encore été précisées. Toutefois, comme pour la Con A, nous avons obtenu de profondes modifications des profils d'affinité des AFP produites par les hépatocytes lors de la mise en culture.

Donc, au moins deux modifications structurales interviennent lors de la mise en culture des cellules: 1) l'une caractérisée par l'utilisation de la Con A ; 2) l'autre mise en évidence par la LCA. En outre, nous avons démontré à l'aide d'une étude cinétique de la production des iso-AFP en culture, que la modification structurale décelée avec la Con A -à savoir l'inhibition de la N-acétylglucosaminyl transférase- intervient dès les premières heures qui suivent le début de la culture. Par contre, l'autre modification structurale des glycannes décelée avec la LCA, n'apparaît qu'après les 24 premières heures de la culture. Dès que ces modifications sont apparues, les profils obtenus avec la Con A comme avec la LCA, sont stabilisés tout au long de la culture.

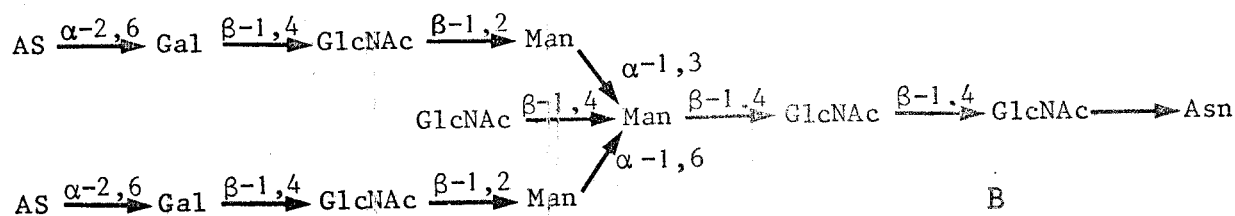
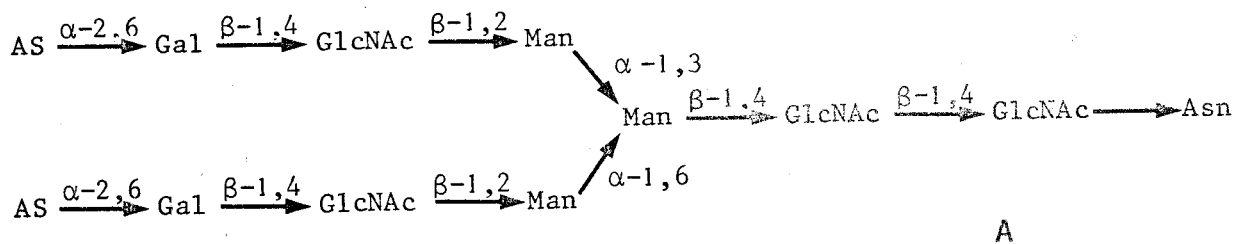


Figure 20.- Structure des chaînes glycaniques portées par les isoAFP réagissant (A) ou non (B) avec la Con A. (G. Strecker, B. Bayard et J.P. Kerckaert).

A : Structure glycanique ayant une forte affinité pour la Con A, mineure dans le liquide amniotique et majeure dans les milieux de culture.

B : Structure glycanique sans affinité pour la Con A, majeure dans le liquide amniotique et mineure dans les milieux de culture.

Chez la Souris, Ruoslahti et al (142) ont montré que le sac amniotique produisait des iso-AFP. La synthèse des iso-AFP par différents organes foetaux a été étudiée par incorporation d'acides aminés marqués dans les glycoprotéines, en culture de tissu avec une recherche des AFP marqués à l'aide d'anticorps. La synthèse d'AFP chez l'Homme est d'abord localisée dans le sac amniotique et le foie puis, ensuite, uniquement dans le foie. En outre, Ruoslahti et al (142) suggèrent, chez la Souris, que l'AFP du sac amniotique ne possède pas les mêmes propriétés vis à vis de la Con A que l'AFP produite par l'hépatocyte. Notre étude s'est appliquée à comparer, grâce à la Con A et à la LCA, les qualités des iso-AFP produites par le sac amniotique chez le Rat. Les profils obtenus avec les lectines en immuno-affino-électrophorèse démontrent que la qualité des iso-AFP produites par le sac amniotique sont, en tous points, comparables à celles produites par l'hépatocyte in vivo. De ce fait, nous pouvons conclure, que cette molécule est glycosylée de la même manière dans les deux tissus.

2 - ETUDE DE LA PRODUCTION D'AFP PAR DES CULTURES PRIMAIRES D'HEPATOCYTES FOETAUX

Les études in vivo ne permettent pas de relier la production d'AFP à la prolifération cellulaire, alors que la culture primaire in vitro permet de quantifier le nombre de cellules ainsi que l'AFP synthétisée par ces cellules et présente dans les milieux de culture.

2.1. Action d'agents chimiques modifiant le cycle cellulaire

Le méthotrexate et la bléomycine sont des agents chimiques utilisés en chimiothérapie anticancéreuse.

Le méthotrexate se fixe sur une enzyme de la chaîne métabolique de l'acide folique dont il est un analogue. Il provoque un arrêt de la synthèse du DNA, bloque les cellules au passage des phases G1 à S et provoque une mort cellulaire en G2 (36, 104, 174)(figure 21).

Quant à la bléomycine, elle agit sur le DNA double hélice et bloque les cellules en phase G2 (85, 185)(figure 21).

Certains auteurs (151, 182, 183) pensent que l'AFP est synthétisée durant les phases G1 et S du cycle cellulaire. L'albumine serait synthétisée du milieu de S jusqu'en phase G2 (151).

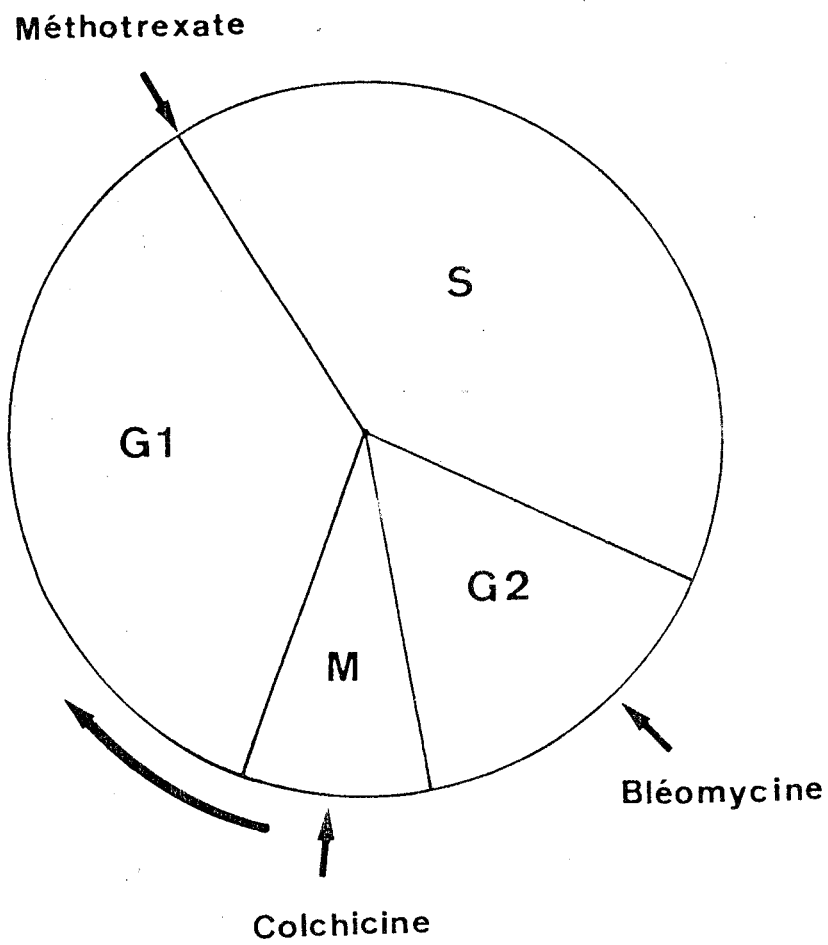


Figure 21.- Phases du cycle cellulaire et points d'impact des différents agents chimiques utilisés : méthotrexate, bléomycine et colchicine.

Les hépatocytes foetaux de Rat en culture primaire ne sont pas synchrones. Au moment de l'addition de la drogue, (au temps $t=0$), ils se trouvent dans les différentes phases du cycle cellulaire. Les cellules doivent donc, si elles ne sont pas en G1 ou en G2, terminer le cycle engagé avant d'être sensibilisées par la drogue, méthotrexate ou bléomycine. C'est donc avant ce blocage que doit avoir lieu la synthèse protéique que nous mesurons et qui est souvent, avec ces agents, supérieure à celle des cultures témoins.

L'action cytotoxique du méthotrexate se fait ressentir dès les 24 premières heures de la culture. Cependant, un certain nombre de cellules échappe à son action, car la division cellulaire reprend légèrement après 72 heures.

La bléomycine est moins toxique pour les hépatocytes à la concentration utilisée. Jusqu'à 72 heures, certaines cellules se divisent, ce sont les hépatocytes effectuant une dernière mitose avant d'être bloqués en phase G2 par la bléomycine.

Si l'on admet que la bléomycine bloque les cellules en phase G2, nous pouvons penser que l'AFP est synthétisée durant cette phase. Ceci expliquerait la stimulation préférentielle de la synthèse d'AFP lorsque les cellules traitées à la bléomycine.

2.2. Influence de l'AMPc et de la Théophylline sur la production d'AFP

L'action de l'AMPc exogène, sur les cellules est encore très controversée. Il semble qu'il affecte la synthèse du DNA et qu'il joue un rôle dans la croissance cellulaire (6). Short et al (153), travaillant in vivo confirment un rôle de stimulation sur la synthèse du DNA dans le foie. Taylor-Papadimitriou (175) suggère un blocage des cellules au passage de S à G2 ; la croissance cellulaire est donc inhibée, mais la concentration utilisée dans ce cas est très élevée (10^{-3} M).

La concentration d'AMPc que nous utilisons ($0,5 \cdot 10^{-6}$ M) ne permet pas une stimulation de la prolifération cellulaire mais active la production protéique. Isaka et al (71) ont des résultats parallèles sur des cultures de cellules ascitiques ; l'AMPc serait d'autre part, responsable de la différenciation cellulaire.

Quant à la théophylline, elle inhibe la phosphodiesterase, enzyme qui dégrade l'AMPc en AMP. La concentration intracellulaire en AMPc est donc augmentée par addition de théophylline.

Les résultats que nous obtenons viennent appuyer ceux d'autres auteurs travaillant également in vitro (6, 71, 153) mais aussi in vivo (153). Ils ne permettent cependant pas d'élucider le rôle de l'AMPc ; nous pouvons simplement confirmer son rôle dans la régulation de la croissance cellulaire. Il pourrait, en outre, agir au niveau de la synthèse des glycoprotéines puisqu'il active la production de l'AFP sans toucher à la synthèse de l'albumine.

2.3. Influence d'un cancérigène : l'acétylaminofluorène sur la production protéique

Chez l'animal, une administration orale et continue de 200 à 300 ppm (82) ou de 0,05% (184) à 1% (26) d'acétylaminofluorène (AAF) incorporé à la nourriture des Rats provoque une synthèse d'AFP.

De nombreux travaux (52, 79, 106) ont permis de montrer que l'AAF se fixait sur les macromolécules cellulaires et en particulier sur le DNA.

Nous avons donc pensé qu'il serait intéressant d'observer les effets de l'AAF sur les cellules en culture.

Des concentrations faibles en AAF n'ont pas d'effet sur la prolifération cellulaire et la production protéique. Il semble, en effet, que la faible diminution du nombre de cellules et l'augmentation des productions d'AFP et d'albumine, soient dues à l'action du solvant ajouté au milieu. Cependant, des taux plus élevés en AAF de l'ordre de 20 à 50 g/ml, bien que très toxiques pour les hépatocytes, stimulent la sécrétion d'AFP et d'albumine (50). Nous ne pouvons pas, ici, attribuer l'effet de stimulation de la production protéique, pour de faibles doses, à l'AAF.

BIBLIOGRAPHIE

1. ABELEV, G.I. (1963) *Acta Unio. Int. Contrat Cancrum* 19, 80-82.
2. ABELEV, G.I. (1971) *Adv. Cancer Res.* 14, 295-358.
3. ABELEV, G.I., ASSECRITOVA, I., KRAEVSKY, N.A., PEROVA, S.D. & PEREVODCHIKOVA, N. (1967) *Int. J. Cancer* 2, 551-558.
4. ABELEV, G.I., PEROVA, S.D., KHARANKOVA, N.I., POSTNIKOVA, Z.A. & IRLIN, I.S. (1963) *Transplantation* 1, 174-180.
5. ABELEV, G.I., TSVETKOV, U.S., BIRYULINA, T.I., ELGORT, D.A. & OLOVNIKOV, A.M. (1971) *Bull. Exp. Biol. Med.* 4, 75-81.
6. ABELL, C.W. & MONOHAN, T.M. (1973) *J. Cell Biol.* 59, 549-558.
7. ADNIOLFI, A., ADNIOLFI, M. & LESSOF, M.H. (1975) *J. Med. Genet.* 12, 138-151.
8. ALPERT, E., DRYSDALE, J.W. & ISSELBACHER, K.J. (1973) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 209, 387-396.
9. ALPERT, E., DRYSDALE, J.W., ISSELBACHER, K.J. & SCHUR, P.H. (1972) *J. Biol. Chem.* 247, 3792-3798.
10. ALPERT, E., SCHUR, P.H., DRYSDALE, J.W. & ISSELBACHER, K.J. (1971) *Fed. Proc.* 30, 246.
11. ARNON, R. & MARON, E. (1971) *J. Mol. Biol.* 61, 225-235.
12. AUBERT, J.P., KERCKAERT, J.P., BAYARD, B. & LOUCHEUX-LEFEBVRE, M.H. (1977) *FEBS-Letters* 78, 194.
13. AUSSEL, C. (1978) *Thèse d'Etat*, Nice.
14. AUSSEL, C. & MASSEYEFF, R. (1976) *Biochimie* 58, 737-741.
15. AUSSEL, C. & MASSEYEFF, R. (1976) in : *Onco-developmental Gene Expression* (Fishman & Sell, eds.) Academic Press, pp. 355-363.
16. AUSSEL, C. & MASSEYEFF, R. (1977) *FEBS-Letters* 81, 363-365.
17. AUSSEL, C. & MASSEYEFF, R. (1978) *J. Steroid Biochem.* 9, 547-552.
18. AUSSEL, C., KERCKAERT, J.P. & BAYARD, B. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 533, 504-510.

19. AUSSEL, C., URIEL, J. & MERCIER-BODARD, C. (1973)
Biochimie 55, 1431-1437.
20. AUSSEL, C., URIEL, J., MICHEL, G. & BAULIEU, E.E. (1974)
Biochimie 56, 567-570.
21. BAENZIGER, J.U. & FIETE, D. (1979) *J. Biol. Chem.* 254,
2400-2407.
22. BAYARD, B., DEBRAY, H., KERCKAERT, J.P. & BISERTE, G.
(1977) *FEBS-Letters* 80, 35-40.
23. BAYARD, B. & KERCKAERT, J.P. (1977) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 77, 489-495.
24. BAYARD, B., KERCKAERT, J.P. & BISERTE, G. (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 85, 47-54.
25. BECKER, F.F., HORLAND, A.A., SHURGIN, A. & SELL, S. (1975)
Cancer Res. 35, 1510-1513.
26. BECKER, F.F. & SELL, S. (1974) *Cancer Res.* 34, 2489-2494.
27. BELANGER, L., BELANGER, M. & LAROCHELLE, J. (1972) *Union Med. Can.* 101, 877-878.
28. BELANGER, L. & DUFOUR, D. (1974) in : *Alpha-foetoprotéine* (Masseyeff, R., ed.) INSERM, Paris, pp. 25-36.
29. BELANGER, L., HAMEL, D., LACHANCE, L., DUFOUR, D., TREMBLAY, M. & GAGNON, P.M. (1975) *Nature* 256, 657-659.
30. BELANGER, L., WAITHE, W.J., DAGUILLARD, F., LAROCHELLE, J. & DUFOUR, D. (1974) In : *Alpha-foetoprotéine* (Masseyeff, R., ed.) INSERM, Paris, pp. 423-430.
31. BENASSAYAG, C., VALLETTE, G., CITTANOVA, N., NUNEZ, E. & JAYLE, M.F. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* 412, 295-305.
32. BERGSTRAND, C.G. & CZAR, B. (1956) *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 8, 174-179.
33. BERTINO, J.R. (1975) In : *Antineoplastic and Immunosuppressive Agents* (Sartorelli, A.C. & Johns, D.G., eds.) Tome II, Springer-Verlag, pp. 468-483.
34. BØG-HANSEN, T.C., BJERUM, O.J. & RAMLAU, J. (1975) *Scand. J. Immunol.* 4, suppl. 2, 141-147.

35. BROCK, J., SCRIMGEOUR, J.B. & NELSON, M.M. (1975) *Clin. Genet.* 7, 163-169.
36. BUFFE, D. & RIMBAUT, C. (1973) *Biomédecine* 19, 172-176.
37. CALDWELL, J.L., GOEKEN, N.E., SEVERSON, C.D. & THOMPSON, J.S. (1974) In : *Alpha-fœtoprotéine* (Masseyeff, R., ed.) INSERM, Paris, pp. 445-455.
38. CAUCHI, M.N., HALLEY, J.B., IRVING, M.C. & WILLIAMS, J.F. (1974) *Cancer Res.* 34, 1808-1812.
39. CHAYVIALLE, J.A.P. & GANGULI, P.C. (1973) *Lancet* 1, 1355-1357.
40. CITTANOVA, N., GRIGOROVA, M., BENASSAYAG, C., NUNEZ, E. & JAYLE, M.F. (1974) *FEBS-Letters* 41, 21-24.
41. COLQUHOUN, B., GOLD, P., BARZELL, W., OAKES, D.D. & SHUSTER, J. (1974) *Cancer Res.* 34, 2296-2299.
42. CROIZAT, B., GRANELLI-PIPERNO, A. & GROS, F. (1974) *Biochimie* 56, 305-313.
43. DATTWYLER, R., MURGITA, R. & TOMASI, T. (1975) *Nature* 256, 656-657.
44. DEMPO, K., CHISAKA, N., YOSHIDA, Y., KANAKO, A. & ONOE, T. (1975) *Cancer Res.* 35, 1282-1287.
45. De NECHAUD, B. & URIEL, J. (1971) *Int. J. Cancer* 8, 71-80.
46. ENDO, Y., KANAI, K., ODA, T., MITAMURA, K., IINO, S. & SUZUKI, H. (1975) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 259, 234-238.
47. ENGELHARDT, N.V., LAZAREVA, M.N., ABELEV, G.I., URYVAEVA, I.V., FACTOR, V.M. & BRODSKY, V.Y. (1976) *Nature* 263, 146-148.
48. ENGELHARDT, N.V., SHIPOVA, L.J., GUSEV, A.I., JAZOVA, A.K. & TER-GRIGOROVA, E.N. (1969) *Bull. Exp. Biol. Med.* 12, 62-64.
49. FISHMAN, W.H., SASAKI, M. & SINGER, R.M. (1973) *Tumor Res.* 8, 135-145.
50. FOURNIER, C. (1977) *Diplôme d'Etudes Approfondies*, Lille.
51. FOURNIER, C., KERCKAERT, J.P., BAYARD, B., COLLYN, M. & BISERTE, G. (1979) In : *Protides of Biological Fluids*, Brussels (sous presse).
52. FUCHS, R.P.P., LEFEVRE, J.F., POUYET, J. & DAUNE, M.P. (1976) *Biochemistry* 15, 3347-3351.

53. GITLIN, D. & BOESMAN, M. (1966) *J. Clin. Invest.* 45, 1826-1838.
54. GITLIN, D. & BOESMAN, M. (1967) *J. Clin. Invest.* 46, 1010-1016.
55. GITLIN, D., PERRICELLI, A. & GITLIN, G.M. (1972) *Cancer Res.* 32, 979-982.
56. GOEKEN, N.E. & THOMPSON, J.S. (1976) In : *Onco-developmental Gene Expression* (Fishman & Sell, eds.) Academic Press, pp. 307-315.
57. GOLD, P. & FREEDMAN, S.O. (1965) *J. Exp. Med.* 121, 439.
58. GOLDSTEIN, I.J., HOLLERMAN, C.E. & SMITH, E.E. (1965) *Biochemistry* 4, 876-883.
59. GORDON, J.A., BLUMBERG, S., LIS, H. & SHARON, N. (1966) *FEBS-Letters* 53, 193-196.
60. GUSEV, A.I. & JAZOVA, A.K. (1970) *Biokhimiya* 35, 172-181.
61. GUSEV, A.I. & JAZOVA, A.K. (1974) In : *Alpha-foetoprotéine* (Masseyeff, R., ed.) INSERM, Paris, pp. 255-270.
62. GRIGOROVA, A.M., CITTANOVA, N. & JAYLE, M.F. (1977) *Biochimie* 59, 217-220.
63. GUILLOUZO, A., BELANGER, L., BEAUMONT, C., VALET, J.P., BRIGS, R. & CHIU, J.F. (1978) *J. Histochem. Cytochem.* 26, 948-959.
64. GUILLOUZO, A., FELDMANN, G., MAURICE, M., SAPIN, C. & BENHAMOU, J.P. (1976) *Biol. Cell.* 26, 35.
65. GUSTINE, D.L. & ZIMMERMAN, E.F. (1973) *Biochem. J.* 132, 541-551.
66. HIRAI, H., NISHI, S. & WATABE, H. (1973) *J. Nucl. Med.* 13, 783.
67. HIRAI, H., NISHI, S. & WATABE, H. (1973) *Tumor Res.* 8, 11-16.
68. HIRZFELD, L., HALBER, W. & ROSEMBLAT, J. (1932) *Z. Immun. Forsch.* 75, 209.
69. HOWARD, A. & PELC, S.R. (1953) *Heredity (suppl.) Lond.* 6, 261-273.
70. HUNT, L.A., ETCHISON, J.R. & SUMMERS, D.F. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 754-758.

71. ISAKA, H., UMEHARA, S., UMEDA, M., HIRAI, H., TSUKADA, Y. & WATABE, H. (1974) *Gann* 65, 79-83.
72. KELLER, R.H., CALVINACO, N.J. & TOMASI, T.B. (1976) In : *Onco-developmental Gene Expression* (Fishman & Sell, eds.) Academic Press, pp. 287-295.
73. KERCKAERT, J.P., BAYARD, B. & BISERTE, G. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 576, 99-108.
74. KERCKAERT, J.P., BAYARD, B., DEBRAY, H., SAUTIERE, P. & BISERTE, G. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* 493, 293-303.
75. KERCKAERT, J.P., BAYARD, B., FOURNIER, C., QUIEF, S. & BISERTE, G. (1979) In : *Carcino-embryonic Proteins* (Lehmann, F.G., ed.) Vol. 2, Biomed. Press, pp. 271-276.
76. KERCKAERT, J.P., BAYARD, B., QUIEF, S. & BISERTE, G. (1975) *FEBS-Letters* 53, 234-236.
77. KITHIER, K., MASOPUST, J. & RADL, J. (1968) *Biochim. Biophys. Acta* 160, 135-137.
78. KORNFELD, R. & FERRIS, C. (1975) *J. Biol. Chem.* 250, 2614-2619.
79. KRIEK, E., MILLER, J.A., JUHL, U. & MILLER, E.C. (1967) *Biochemistry* 6, 177-182.
80. KROES, R., SONTAG, J.M., SELL, S., WILLIAMS, G.M. & WEISBURGER, J.H. (1975) *Cancer Res.* 35, 1214-1217.
81. KROES, R., WILLIAMS, G.M. & WEISBURGER, J.H. (1972) *Cancer Res.* 32, 1526-1532.
82. KROES, R., WILLIAMS, G.M. & WEISBURGER, J.H. (1973) *Cancer Res.* 33, 613-617.
83. KRUSIUS, T. (1976) *FEBS-Letters* 66, 86-89.
84. KRUSIUS, T., FINNE, J. & RAUVALA, H. (1976) *FEBS-Letters* 71, 117-120.
85. KUO, M.T. & HAIDLE, C.W. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 335, 109-114.
86. LAI, P.C.W., FORRESTER, P.I., HANCOCK, R.L., HAY, D.M. & LORSCHIEDER, F.L. (1976) *J. Reprod. Fert.* 48, 1-8.
87. LAI, P.C.W., FORRESTER, P.I., HANCOCK, R.L., HAY, D.M. & LORSCHIEDER, F.L. (1976) In : *Onco-developmental Gene Expression* (Fishman & Sell, eds.) Academic Press, pp. 685-690.
88. LAI, P.C.W., HAY, D.M. & LORSCHIEDER, F.L. (1977) *J. Reprod. Fert.* 51, 163-164.

89. LAISHES, B.A. & WILLIAMS, G.M. (1976) *In vitro* 12, 521-532.
90. LAURELL, C.B. (1966) *Anal. Biochem.* 15, 45-52.
91. LEFFERT, H.L. (1974) *J. Cell Biol.* 62, 792-801.
92. LEFFERT, H.L. & SELL, S. (1974) *J. Cell Biol.* 61, 823-829.
93. LEFFERT, H.L. & WEINSTEIN, D.B. (1976) *J. Cell Biol.* 70, 20-32.
94. LEHMANN, F.G. (1975) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 259, 196-210.
95. LEHMANN, F.G. (1976) In : *Onco-developmental Gene Expression* (Fishman & Sell, eds.) Academic Press, pp. 407-415.
96. LEHMANN, F.G., LEHMANN, D. & MARTINO, G.A. (1971) *Clin. Chim. Acta* 33, 197.
97. LESTER, E., MILLER, B. & YACHNIN, S. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73, 4645-4648.
98. McMAHON, J.B., KELLEHER, P.C. & SMITH, C.J. (1977) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 76, 1144-1156.
99. McMAHON, J.B., SMITH, C.J., SCHAEFFER, W.I. & KELLEHER, P.C. (1979) In : *Carcino-embryonic Proteins* (LEHMANN, F.G., ed.) Vol. 2, Biomed. Press, pp. 249-252.
100. McMANUS, J.P. & WHITFIELD, J.F. (1970) *Exp. Cell Res.* 58, 188-191.
101. MARCH, S., PARIKH, I. & CUATRECASAS, P. (1974) *Anal. Biochem.* 60, 149-152.
102. MASSEYEFF, R., BONNET, C., DROUET, J., SUDAKA, P. & LALANNE, C. (1974) *Digestion* 10, 17-28.
103. MASSEYEFF, R., GILLI, G., KREBS, B., CALLUAND, A. & BONNET, C. (1975) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 259, 17-28.
104. MEAD, J.A.R. (1974) In : *Antineoplastic and Immunosuppressive Agents* (Sartorelli, A.C. & Johns, D.G., eds.) Springer-Verlag, Tome I, pp. 52-75.
105. MIHABEV, A., TZINGILEV, D. & SIRAKOV, L.M. (1976) *Neoplasma* 23, 103-107.
106. MILLER, E.C., JUHL, U. & MILLER, J.A. (1966) *Science* 153, 1125-1127.
107. MILLER, J.A. & MILLER, E.C. (1969) *Prog. Exp. Tumor Res.* 11, 273-301.
108. MUCCHIELLI, A., SOUBIRAN, P. & MASSEYEFF, R. (1979) In : *Carcino-embryonic Proteins* (Lehmann, F.G., ed.)

109. MURGITA, R.A., GOIDL, E.A., KONTOAINEN, S. & WIGZELL, H.
(1977) *Nature* 267, 257-259.
110. MURGITA, R. & TOMASI, T.B. (1975) *J. Exp. Med.* 141, 269-286.
111. MURGITA, R. & TOMASI, T.B. (1975) *J. Exp. Med.* 141, 440-452.
112. NARASIMHAN, S., WILSON, J.R., MARTIN, E. & SCHACHTER, H.
(1979) *Can. J. Biochem.* 57, 83-96.
113. NISHI, S. (1970) *Cancer Res.* 30, 2507-2513.
114. NISHI, S. & HIRAI, H. (1972) *Biochim. Biophys. Acta* 278,
293-298.
115. NISHI, S., WATABE, H. & HIRAI, H. (1975) *Ann. N.Y. Acad. Sci.*
259, 109-118.
116. NUNEZ, E., BENASSAYAG, C., SAVU, L., VALLETTE, G. & JAYLE, M.F.
(1976) In : *Onco-developmental Gene Expression*
(Fishman & Sell, eds.) Academic Press, pp. 355-363.
117. NUNEZ, E., BENASSAYAG, C., SAVU, L., VALLETTE, G. & JAYLE, M.F.
(1976) In : *Protides of Biological Fluids* (Peeters,
H., ed.) Pergamon Press, pp. 255-258.
118. NUNEZ, E., ENGELMAN, F., BENASSAYAG, C. & JAYLE, M.F. (1971)
C.R. Acad. Sci. Paris D273, 831-834.
119. NUNEZ, E., VALLETTE, G. & BENASSAYAG, C. (1974) *Biochem.*
Biophys. Res. Commun. 57, 126-133.
120. OAKES, D.D., SHUSTER, J. & GOLD, P. (1972) *Cancer Res.* 32,
2753-2760.
121. OGATA, S.I., MURAMATSU, T. & KOBATA, A. (1975) *J. Biochem.*
78, 687-696.
122. OKITA, K., GUENSTEIN, M., KLAIBER, M. & FARBER, E. (1974)
Cancer Res. 34, 2758-2763.
123. OKUDA, K., KUBO, Y. & OBATA, H. (1975) *Ann. N.Y. Acad. Sci.*
259, 248-252.
124. ONOE, T., MORI, M., KANEKO, A., DEMPO, K. & OGAWA, K.
(1973) *Tumor Res.* 8, 75-78.
125. PAGE, M. (1974) In : *Alpha-foetoprotéine* (Masseyeff, R., ed.)
INSERM, Paris, pp. 457-466.
126. PARMELY, M.J. & THOMPSON, J.S. (1974) In : *Alpha-foetoprotéine*
(Masseyeff, R., ed.), INSERM, Paris, pp. 467-479.

127. PARMELY, M.J. & THOMPSON, J.S. (1976) In : *Onco-developmental Gene Expression* (Fishman & Sell, eds.) Academic Press, pp. 297-305.
128. PEDERSEN, K.O. (1944) *Nature*, 154, 575.
129. PEROVA, S.D., ELGART, D.A. & ABELEV, G.I. (1971) *Bull. Exp. Biol. Med.* 71, 45-47.
130. PETERS, T., FLEISCHER, B. & FLEISCHER, S. (1971) *J. Biol. Chem.* 246, 2040.
131. PURTILLO, D.T. & YUNIS, E.J. (1971) *Lab. Invest.* 25, 291-294.
132. PURVES, L.R., BRANCH, W.R., GEDDES, E.W., PORTUGAL, M. & MASSON, C. (1973) *Cancer* 31, 578-587.
133. PURVES, L.R. & GEDDES, E.W. (1972) *Lancet* 1, 47-48.
134. RAMALEY, J.A. (1970) *Steroids* 16, 619.
135. ROBBINS, P.W., HUBBARD, S.C., TUREO, S.S. & WIRTH, D.F. (1977) *Cell* 12, 893-1000.
136. RUOSLAHTI, E. & ADAMSON, E. (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 85, 1622-1630.
137. RUOSLAHTI, E. & ENGVALL, E. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73, 4641-4644.
138. RUOSLAHTI, E., ENGVALL, E., PEKKALA, A. & SEPPÄLÄ, M. (1978) *Int. J. Cancer* 22, 515-520.
139. RUOSLAHTI, E., PIHKO, H. & SEPPÄLÄ, M. (1974) *Transpl. Rev.* 20, 38-52.
140. RUOSLAHTI, E. & SEPPÄLÄ, M. (1971) *Int. J. Cancer* 8, 374-383.
141. RUOSLAHTI, E. & SEPPÄLÄ, M. (1972) *Nature* 235, 161-162.
142. RUOSLAHTI, E. & SEPPÄLÄ, M. (1979) *Adv. Cancer Res.* 29, 275-346.
143. RUOSLAHTI, E. & TERRY, W. (1976) *Nature* 260, 804-805.
144. SAVU, L., BENASSAYAG, C., VALLETTE, G., NUNEZ, E. & JAYLE, M.F. (1977) *Biochimie* 59, 323-328.
145. SCHULTZE, H.E. & HEREMANS, J.F. (1966) In : *Molecular Biology of Human Proteins*, Vol. 1, Elsevier-Publishing Co., Amsterdam, p. 182.
146. SELL, S. (1973) *Cancer Res.* 33, 1010-1015.
147. SELL, S. & ALEXANDER, D. (1974) *J. Natl. Cancer Inst.* 52, 1483-1489.

148. SELL, S., JALOWAYSKI, I., BELLONE, C. & WEPSIC, H. (1972) *Cancer Res.* 32, 1184.
149. SELL, S., NICHOLS, M., BECKER, F.F. & LEFFERT, H.L. (1974) *Cancer Res.* 34, 865-871.
150. SELL, S. & SKELLY, H. (1976) *J. Natl. Cancer Inst.* 56, 645-648.
151. SELL, S., SKELLY, H., LEFFERT, H.L., MULLER-EBERHARD, V. & KIDA, S. (1975) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 259, 45-58.
152. SHEPPARD, H.W., POLER, S.L., TREFTS, P. & SELL, S. (1976) In : *Onco-developmental Gene Expression* (Fishman & Sell, eds.) Academic Press, pp. 317-327.
153. SHORT, J., TSUKADA, K., RUDERT, W.A. & LIEBERMAN, I. (1975) *J. Biol. Chem.* 250, 3602-3606.
154. SEPPÄLÄ, M. (1975) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 259, 59-73.
155. SEPPÄLÄ, M., LINDGREN, J., LAPINLEIMU, K. & SAXEN, L. (1976) In : *Onco-developmental Gene Expression* (Fishman & Sell, eds.) Academic Press, pp. 393-399.
156. SEPPÄLÄ, M. & RUOSLAHTI, E. (1973) *J. Perinat. Med.* 1, 104-113.
157. SEPPÄLÄ, M. & RUOSLAHTI, E. (1974) In : *Alpha-foetoprotéine* (Masseyeff, R., ed.) INSERM, Paris, pp. 387-391.
158. SMITH, C.J., BECKER, J.E. & KELLEHER, P.C. (1976) In : *Onco-developmental Gene Expression* (Fishman & Sell, eds.) Academic Press, pp. 675-678.
159. SMITH, C.J. & KELLEHER, P.C. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 317, 231-235.
160. SMITH, C.J. & KELLEHER, P.C. (1974) In : *Alpha-foetoprotéine* (Masseyeff, R., ed.) INSERM, Paris, pp. 85-95.
161. SMITH, C.J., MORRIS, H.P. & KELLEHER, P.C. (1977) *Cancer Res.* 37, 2651-2656.
162. SMITH, C.J. & KELLEHER, P.C. (1977) *Cancer letters* 3, 53.
163. SOLOFF, M.S., CREANGE, J.E. & POTTS, G.O. (1971) *Endocrinology* 88, 427.
164. SOLOFF, M.S., SWARTZ, S.K., PEARLMUTTER, A.F. & KITHIER, K. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 427, 644-651.
165. SPIK, G., BAYARD, B., FOURNET, B., STRECKER, G., BOUQUELET, S. & MONTREUIL, J. (1975) *FEBS-Letters* 50, 296-299.
166. STANISLAWSKI-BIRENCWAJG, M. (1967) *Cancer Res.*, 27, 1982-1989.
167. STANISLAWSKI-BIRENCWAJG, M., URIEL, J. & GRABAR, P. (1967) *Cancer Res.* 27, 1990-1997.
168. SUDAKA, P., RIGAT, A.M. & MASSEYEFF, R. (1972) *Biochimie* 54, 1487.

169. SUROLIA, A., AHMAD, A. & BICHKAWAT, B. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* 404, 83-92.
170. SYLVER, H.K., DENEALU, J., GOLD, P., THOMPSON, W.G., SHUSTER, J. & FREEDMAN, S.O. (1974) *Cancer Res.* 34, 244-247.
171. TABAS, I., SCHLESINGER, S. & KORNFELD, S. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 716-722.
172. TAKETA, K., WATANABE, A. & KOSAKA, K. (1975) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 259, 80-84.
173. TATARINOV, Y. (1964) *Vopr. Med. Khim.* 10, 90-91.
174. TATTERSALL, M.H.N., JACKSON, R.C., JACKSON, S.T.N. & HARRAP, K.P. (1974) *Eur. J. Cancer* 10, 819-826.
175. TAYLOR-PAPADIMITRIOU, J. (1974) *Int. J. Cancer* 13, 404-411.
176. TCHIPYSHEVA, T.A., GUELSTEIN, V.I. & BANNIKOV, G.A. (1977) *Int. J. Cancer* 20, 388-393.
177. TEILUM, G. (1971) *Munksgaard, Copenhagen, Denmark.*
178. TEILUM, G., ALBRECHTSEN, R. & NØRGAARD-PEDERSEN, B. (1975) *Acta Path. Micro. Scand. Sect.* 83, 80-86.
179. TOMASI, T.B. (1977) *Ann. Rev. Med.* 28, 453-465.
180. TOYOSHIMA, S., OSAWA, T. & TONOMURA, A. (1970) *Biochim. Biophys. Acta* 221, 514-521.
181. TSUCHIDA, Y., ENDO, Y., URANO, Y. & ISHIDA, M. (1975) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 259, 221-233.
182. TSUKADA, Y. & HIRAI, H. (1975) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 259, 37-45.
183. TSUKADA, Y. & HIRAI, H. (1976) In : *Onco-developmental Gene Expression* (Fishman & Sell, eds.) Academic Press, pp. 639-646.
184. TSUKADA, Y., MOCHIZUKI, Y. & GOTOH, M. (1975) *J. Natl. Cancer Inst.* 54, 519-523.
185. UNEZAWA, H., ASAKURA, H., ODA, K., HORI, S. & HORI, M. (1973) *J. Antibiotics* 26, 521-527.
186. URANO, Y., ENDO, Y. & TSUCHIDA, Y. (1976) In : *Onco-developmental Gene Expression* (Fishman & Sell, eds.) Academic Press, pp. 131-137.
187. URIEL, J. (1968) *Gordon Conference on Cancer.*
188. URIEL, J., AUSSEL, C., BOUILLON, D., LOISILLIER, F. & DE NECHAUD, B. (1975) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 259, 119-130.
189. URIEL, J., BOUILLON, D., AUSSEL, C. & DUPIERS, M. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73, 1452-1456.

190. URIEL, J., De NECHAUD, B. & DUPIERS, M. (1972) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 46, 1175-1180.
191. URIEL, J., De NECHAUD, B., STANISLAWSKI-BIRENCWAJG, M., MASSEYEFF, R., LEBLANC, L., QUENUM, C., LOISILLIER, F. & GRABAR, P. (1967) *C.R. Acad. Sci. Paris* D265, 75-78.
192. VALLETTE, G., BENASSAYAG, C., BELANGER, L., NUNEZ, E.A. & JAYLE, M.F. (1977) *Steroids* 29, 277-289.
193. WALDMANN, T.A. & McINTIRE, K.R. (1972) *Lancet* 1, 1112-1115.
194. WATABE, H. (1971) *Cancer Res.* 31, 1192-1194.
195. WATABE, H. (1974) *Int. J. Cancer* 13, 377-388.
196. WATABE, H., LEFFERT, H.L. & SELL, S. (1976) In : *Onco-developmental Gene Expression* (Fishman & Sell, eds.) Academic Press, pp. 123-130.
197. WATANABE, A., TAKETA, K. & KOSAKA, K. (1975) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 259, 95-108.
198. WILLIAMS, G.M., BERMUDEZ, E., SAN, R.H., GOLDBLATT, P.J. & LASPIA, M.F. (1978) *In vitro* 14, 824-837.
199. YACHNIN, S. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73, 2857-2861.
200. YACHNIN, S. & LESTER, E.P. (1979) In : *Carcino-embryonic Proteins* (Lehmann, F.G., ed.) Vol. 2, Biomed. Press, pp. 339-344.
201. YOUNG, N.M. & LEON, M.A. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* 365, 418-424.
202. ZIMMERMAN, E.F., BOWEN, D., WILSON, J.R. & MADAPPALLY, M.M. (1976) *Biochemistry* 15, 5534-5543.

