50376
1988
239

N° d'ordre : 282

50376
1988
239

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE FLANDRES ARTOIS

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITE

Spécialité : SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

par

Olivier DELMAS

LES FACTEURS DE CROISSANCE DU LAIT DE FEMME

1 - CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE SUR HEPARINE
2 - CHROMATOGRAPHIE D'ECHANGE DE CATIONS : ISOLEMENT ET CARACTERISATION D'UN FACTEUR DE CROISSANCE ANALOGUE A LA CYCLOPHILINE

Présentée le 19 Décembre 1988 devant la Commission d'Examen

Président et Rapporteur :	J. MONTREUIL
Rapporteur :	Y. COURTOIS
Examinateur :	A. TARTAR
Examinateur :	G. SPIK

Ce travail a été réalisé sous la direction de Madame le Professeur Geneviève SPIK dans le Laboratoire de Chimie Biologique de l'Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois (Unité Associée au CNRS n° 217 : Relations structure-fonctions des constituants membranaires - Directeur : Professeur Jean MONTREUIL), 59655 VILLENEUVE D'ASCQ CEDEX.

Nous exprimons notre vive gratitude au CNRS et au Conseil Régional du Nord-Pas de Calais qui nous ont permis de poursuivre nos recherches pendant trois années grâce à une bourse de Docteur-Ingénieur co-financée par ces deux organismes.

A Marion et à Quentin

A Sylvie

A mes parents

"Les petits ruissaux font les grandes rivières"

Proverbe

J'adresse mes plus sincères remerciements à tous ceux qui m'ont aidé dans la réalisation de ce travail :

Le Centre National de la Recherche Scientifique, le Conseil Régional Nord-Pas de Calais et l'Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois, qui ont financé ces travaux.

Monsieur le Professeur Jean Montreuil, Directeur de l'Unité Associée au CNRS n° 217 "Relations structure-fonction des constituants membranaires".

Depuis plusieurs décennies s'est développé à Lille une tradition d'études du lait de Femme.

Par votre dynamisme, une équipe forte d'une vingtaine de personnes, dirigée par Madame le Professeur Geneviève Spik, s'est constituée pour étudier la lactotransferrine, que vous avez découverte dans le lait de Femme, ainsi que différents aspects du lait maternel. Vous m'avez demandé de m'y intégrer pour aborder un nouvel aspect du lait maternel: son pouvoir mitogène.

Au terme de ce travail, le pari était gagné puisqu'il m'a été permi de découvrir un nouveau facteur de croissance.

Je vous remercie profondément pour m'avoir fait partager "l'aventure du lait de Femme", pour l'accueil que vous m'avez réservé, pour m'avoir formulé ce merveilleux souhait: de continuer les recherches sur ce nouveau facteur de croissance, le CGF. J'espère être méritant de votre confiance.

Madame le Professeur Geneviève Spik, Directeur de thèse, chef du groupe "structures et fonctions des transferrines".

Soyez assurée de toute ma reconnaissance pour ces trois années passées au sein de votre équipe. Vous m'avez lancé des défis, vous avez partagé les moments difficiles commme les instants de joie. Je garderai le plus vif souvenir de votre optimisme qui applanit les plus hautes montagnes. Encore merci.

Monsieur le Docteur Yves Courtois, Directeur de l'Unité de l'INSERM n° 118, Hôpital Sainte Perrine, Paris.

Je vous remercie d'avoir si prestement accepté d'être rapporteur de ce travail. C'est pour moi un grand honneur que d'être jugé, au terme de mes études, par l'un des "pontes" des facteurs de croissance.

Monsieur le Professeur André Tartar, Directeur du Laboratoire de Chimie des Biomolécules, Institut Pasteur de Lille.

Sans vous ce travail ne serait pas arrivé à son aboutissement. Les déterminations de séquence ont permis d'ouvrir de nombreuses perspectives. Merci également d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Mademoiselle le Docteur Pierrette Maes, chercheur au Laboratoire de Chimie des Biomolécules, Institut Pasteur de Lille.

Merci pour les nombreuses analyses de microséquence que vous avez réalisées dans le cadre de ce travail.

Monsieur le Professeur Benoni Boilly et les membres du Laboratoire de Biologie des Facteurs de croissance, Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois.

Je vous remercie pour le matériel cellulaire que vous m'avez fourni et pour le savoir faire en matière de facteurs de croissance que vous m'avez prodigué.

Monsieur le Professeur Jean-François Borel, Directeur du Laboratoire d'Immunologie, Sandoz, Bâle.

Soyez remercié de m'avoir invité à donner un séminaire dans votre laboratoire. Ce fût pour moi l'occasion d'exposer mes travaux devant une équipe de grande renommée. L'intérêt que vous y avez apporté se traduit par des échanges qui feront à coup sûr progresser les connaissances concernant les molécules de la famille de la cyclophiline.

Merci au Docteur Roméo Cechelli, du laboratoire du Professeur Fruchart, Institut Pasteur de Lille, pour m'avoir fourni du FGF.

Merci au Docteur Vernillet, Laboratoires Sandoz, Rueil-Malmaison pour la fourniture de ciclosporine.

André Deck, nous avons travaillé plusieurs mois ensemble. Tu m'a apporté une aide précieuse. Merci.

Odette Labiaux, merci d'avoir pris soin des cellules tout au long de ces trois années.

Je remercie l'ensemble du personnel du Laboratoire de Chimie Biologique, avec une pensée particulière pour Daniel Damard, pour Haris Cazlaris, pour Wei-Li Hu.

Pierre Ficheux, depuis l'année du D.E.A. nous avons tissé des liens d'amitié. Tu m'as proposé tes talents reconnus pour illustrer un des résultats de cette thèse. Tes planches ont été fort appréciées. Merci (et en route pour de nouvelles aventures).

ABREVIATIONS

EGF: Epidermal Growth Factor (facteur de croissance épidermique)
TGF: Transforming Growth Factor (facteur de croissance transformant)
NGF: Nerve Growth Factor (facteur de croissance nerveux)
FGF: Fibroblast Growth Factor (facteur de croissance fibroblastique)
PDGF: Platelet-Derived Growth Factor (facteur de croissance dérivé des plaquettes)
IGF: Insulin-Like Growth Factor (facteur de croissance semblable à l'insuline)
CSF: Colony Stimulating Factor (facteur de croissance stimulant la formation de colonies)
MDGF: Milk Derived Growth Factor (facteur de croissance dérivé du lait)
CGF: Cyclophilin-Like Growth Factor (facteur de croissance semblable à la cyclophiline)
NLK: neuroleukine
BCGF: B-Cell Growth Factor (facteur de croissance des cellules B)
BCDF: B-Cell Differentiation Factor (facteur de différenciation des cellules B)
HBGF: Heparin-Binding Growth Factor (facteur de croissance affine pour l'héparine)
IgAs: Immunoglobuline de type A secrétoire
CFU-GM: Colony-Forming-Unit-Granulocyte-Macrophage (cellule précurseur des granulocytes et des macrophages)
HMGF: Human Milk Growth Factor (facteur de croissance du lait de Femme)
cAMP: Adénosine 3',5',monophosphate cyclique
cGMP: Guanosine 3',5',monophosphate cyclique
TRH: Thyroïd releasing hormone
Gnrh: Gonadotropin releasing hormone
TSH: Thyroïd stimulating hormone
T_4: thyroxine
T_3: triiodothyronine
ARNm: Acide ribonucléique messager
ADN: Acide désoxyribonucléique
ADNc: Acide désoxyribonucléique complémentaire
VIP: Vasoactive Intestinal Peptide (peptide intestinal vasoactif)
MEM: Milieu Essentiel Minimum de Eagle
PBS: tampon phosphate 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,2
TBS: tampon Tris, HCl 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,8
SDS: Sodium Dodecyl Sulphate
PAGE: Electrophorèse en gel de polyacrylamide
FPLC: Fast protein liquid chromatography
DTT: dithiothréitol
cpm: coups par minute

SOMMAIRE

INTRODUCTION

GENERALITES

GENERALITES SUR LES FACTEURS DE CROISSANCE 4

I- PROPRIETES GENERALES DES PRINCIPAUX FACTEURS DE CROISSANCE 5

A- LES FACTEURS DE CROISSANCE EPIDERMIQUES 5

1- Le facteur de croissance épidermique

2- Le facteur de croissance transformant de type α

B- LE FACTEUR DE CROISSANCE DERIVE DES PLAQUETTES 6

C- LE FACTEUR DE CROISSANCE TRANSFORMANT DE TYPE β 7

D- LES FACTEURS DE CROISSANCE SEMBLABLES A L'INSULINE 7

E- LES FACTEURS DE CROISSANCE NERVEUX 7

1- Le facteur de croissance nerveux

2- La Neuroleukine

F- LES FACTEURS DE CROISSANCE INTERVENANT DANS L'HEMATOPOIESE 8

G- LES FACTEURS DE CROISSANCE INTERVENANT DANS LA REPONSE IMMUNITAIRE 10

H- LES FACTEURS DE CROISSANCE FIBROBLASTIQUES 10

1-Structure du facteur de croissance fibroblastique basique

2- Effets biologiques in vitro du FGF basique

3- Agents modulateurs du FGF basique

4- Effets biologiques in vivo du FGF basique

5- Mécanisme d'action du FGF basique

6- Conclusion

I- LES FACTEURS DE CROISSANCE TRES AFFINES POUR L'HEPARINE 15

II- CONCLUSIONS SUR LES FACTEURS DE CROISSANCE 15

LES FACTEURS DE CROISSANCE DES LAITS DE MAMMIFERES 17

I- LES PROPRIETES MITOGENES DES LAITS DE MAMMIFERES 17

II- LES FACTEURS DE CROISSANCE DU LAIT DE FEMME 19

A- LE FACTEUR DE CROISSANCE EPIDERMIQUE 19
B- LE FACTEUR DE CROISSANCE TRANSFORMANT DE TYPE α 22
C- LE FACTEUR DE CROISSANCE DERIVE DES PLAQUETTES 22
D- LE FACTEUR DE CROISSANCE SEMBLABLE A L'INSULINE DE TYPE I 22
E- LE FACTEUR DE CROISSANCE NERVEUX 23
F- LE FACTEUR DE CROISSANCE STIMULANT LA FORMATION DE COLONIES DE TYPE GRANULOMONOCYTAIRE 23
G- LE FACTEUR DE CROISSANCE DERIVE DU LAIT DE TYPE I 23
H- AUTRES ACTIVITES DE FACTEUR DE CROISSANCE 24
III- LES FACTEURS DE CROISSANCE DANS LES LAITS DES AUTRES MAMMIFERES 24
A- LES FACTEURS DE CROISSANCE DES LAITS DE RUMINANTS 24
1- Les facteurs de croissance du lait de Chèvre
2- Les facteurs de croissance du lait de Vache
B- LES FACTEURS DE CROISSANCE DU LAIT DE TRUIE 25
C- LES FACTEURS DE CROISSANCE DES LAITS DE MURIDES 25
IV- SIGNIFICATIONS BIOLOGIQUES DE LA PRESENCE DE FACTEURS DE CROISSANCE DANS LES LAITS DE MAMMIFERES 27
A- ORIGINE DES FACTEURS DE CROISSANCE DES LAITS DE MAMMIFERES 27
B- ROLES DES FACTEURS DE CROISSANCE DES LAITS DE MAMMIFERES 29

ROLES DES FACTEURS DE CROISSANCE DANS LE DEVELOPPEMENT DU TRACTUS DIGESTIF 30

I- LE COLOSTRUM ET LE LAIT DANS LE DEVELOPPEMENT DU TRACTUS DIGESTIF 30
II- LES ROLES DU FACTEUR DE CROISSANCE EPIDERMIQUE (EGF) DANS LE DEVELOPPEMENT DU TRACTUS DIGESTIF 30
A- LOCALISATION DE L'EGF 30
B- ROLES DE L'EGF SUR LE TRACTUS DIGESTIF DES MURIDES 31
C- ROLES DE L'EGF SUR LA MATURATION DES MUQUEUSES DIGESTIVES 31
III- ETUDES IN VITRO DE L'ACTION DE DIFFERENTS MODULATEURS SUR LE TRACTUS DIGESTIF 32
A- LES ROLES DES DIFFERENTS ELEMENTS PROTEIQUES DU LAIT 32
B- ROLES D'ELEMENTS NON-PROTEIQUES DU LAIT 33
IV- ETUDES DE LA FIXATION DES FACTEURS DE CROISSANCE SUR LES CELLULES INTESTINALES 33
V- CONCLUSIONS 35

LE SYSTEME CICLOSPORINE A-CYCLOPHILINE 34

I- LA CICLOSPORINE A 34
A- STRUCTURE 34
B- UTILISATIONS CLINIQUES 34
C- EFFETS CELLULAIRES 34
D- MECANISME D'ACTION 35
II- LA CYCLOPHILINE 37
A- PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES 37
B- STRUCTURE DE LA CYCLOPHILINE 37
III- L'INTERACTION CYCLOPHILINE-CYCLOSPORINE A 39
A- SITE DE FIXATION 39
B- SPECIFICITE DE L'INTERACTION CYCLOPHILINE-CYCLOSPORINE A 39
IV- CONCLUSIONS 40

TRAVAUX PERSONNELS

ETUDE DES ACTIVITES MITOGENES DU COLOSTRUM ET DU LAIT DE FEMME 42

I- INTRODUCTION 42
II- MATERIELS ET METHODES 42
A- LE LAIT ET LE COLOSTRUM DE FEMME 42
B- PREPARATION DU LACTOSERUM 43
C- FRACTIONNEMENT DU COLOSTROSERUM ET DU LACTOSERUM PAR TAMISAGE MOLECULAIRE 43
D- MESURE DE L'ACTIVITE MITOGENE 43
1- Cultures cellulaires
2- Mesure de la synthèse d'ADN
III- RESULTATS 44
A- PROFIL CHROMATOGRAPHIQUE DU COLOSTROSERUM PAR TAMISAGE MOLECULAIRE 44
B- PROFIL CHROMATOGRAPHIQUE DU LACTOSERUM PAR TAMISAGE MOLECULAIRE 46
C- DISCUSSION 46
IV- CONCLUSION 47

FRACTIONNEMENT DU LACTOSERUM PAR CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE SUR COLONNE D'HEPARINE IMMOBILISEE 48

I- INTRODUCTION 48

II- MATERIELS ET METHODES 49

A- LE LAIT ET LE LACTOSERUM 49

B- FRACTIONNEMENT DU LACTOSERUM PAR CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE SUR COLONNE D'HEPARINE IMMOBILISEE - ELUTION PAR UN GRADIENT CONTINU 49

C- FRACTIONNEMENT DU LACTOSERUM PAR CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE SUR COLONNE D'HEPARINE IMMOBILISEE - ELUTION PAR UN GRADIENT DISCONTINU 49

D- FRACTIONNEMENT DU LACTOSERUM CONTENANT 0,8 M DE NaCl PAR CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE SUR COLONNE D'HEPARINE IMMOBILISEE 50

E- DETERMINATION DES ACTIVITES MITOGENES 50

F- METHODES ELECTROPHORETIQUES 51

1- Electrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS

2- Electrotransfert sur feuille de nitrocellulose (Western-blotting)

G- METHODES IMMUNOLOGIQUES 52

1- Préparation d'un immunsérum anti-lactotransferrine

2- Antisérum anti-lysozyme

3- Immunodiffusion simple

4- Immunorévélation après électrotransfert

H- DOSAGE DES PROTEINES 53

III- RESULTATS 53

A- CHROMATOGRAPHIE DU LACTOSERUM SUR COLONNE D'HEPARINE IMMOBILISEE - ELUTION PAR UN GRADIENT CONTINU 53

B- CHROMATOGRAPHIE DU LACTOSERUM SUR COLONNE D'HEPARINE IMMOBILISEE - ELUTION PAR PALIERS 55

1- Etude des différentes fractions

2- Détermination des activités mitogènes

C- CHROMATOGRAPHIE DU LACTOSERUM CONTENANT 0,8 M EN NaCl SUR COLONNE D'HEPARINE IMMOBILISEE 60

1- Fractionnement

2- Analyse de la fraction éluée à 2,4 M en NaCl par électrophorèse (SDS-PAGE)
3- Activités mitogènes
D- DISCUSSION 60
IV- CONCLUSIONS 64

FRACTIONNEMENT DU LAIT DE FEMME PAR CHROMATOGRAPHIE D'ECHANGE DE CATIONS 65

I- INTRODUCTION 65
II- MATERIELS ET METHODES 65
A- FRACTIONNEMENT DU LAIT DE FEMME 65
1- Préparation du lait écrémé
2- Chromatographie d'échange de cations en batch
3- Chromatographie d'échange de cations sur colonne
4- Tamisage moléculaire de la fraction éluée par de l'acétate de sodium 0,4 M
5- Chromatographie d'échange de cations par "F.P.L.C."
B- METHODES ELECTROPHORETIQUES 67
1- Electrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE)
2- Electrotransfert sur feuille de nitrocellulose (Western blotting)
3- Isoélectrofocalisation analytique
C- IMMUNO-REVELATION APRES ELECTROTRANSFERT 68
D- CHROMATOGRAPHIES LIQUIDES A HAUTE PRESSION 68
1- Chromatographie liquide à haute pression en phase inverse
2- Chromatographie liquide de tamisage moléculaire à haute pression
E- DETERMINATION DE LA SEQUENCE PEPTIDIQUE 69
F- DOSAGE DES PROTEINES 69
G- DETERMINATION DES ACTIVITES BIOLOGIQUES 69
1- Mesure de l'activité mitogène
2- Etude de la stabilité des activités mitogènes
3- Recherche d'une affinité des protéines mitogènes pour l'héparine
4- Détermination de l'activité angiogène

III- RESULTATS 71
A- PURIFICATION DES FACTEURS DE CROISSANCE 71
B- CARACTERISATION BIOCHIMIQUE DES FACTEURS DE CROISSANCE 71
1- Détermination de la masse moléculaire
2- Détermination du point isoélectrique
3- Détermination du caractère hydrophobe
C- IMMUNO-REVELATION APRES ELECTROTRANSFERT 75
D- SEQUENCES PEPTIDIQUES PARTIELLES DES FACTEURS DE CROISSANCE 79
E- DETERMINATION DES ACTIVITES BIOLOGIQUES 82
1- L'activité mitogène est fonction de la concentration en protéines
2- Stabilité des activités mitogènes
3- Recherche d'une affinité pour l'héparine
4- Activité angiogène
IV- CONCLUSIONS 84

INFLUENCE DE LA CICLOSPORINE A SUR L'ACTIVITE BIOLOGIQUE DE DIVERS FACTEURS DE CROISSANCE 87

I- INTRODUCTION 87
II- MATERIELS ET METHODES 87
A- MISE EN EVIDENCE D'UNE AFFINITE DES PROTEINES POUR LA CICLOSPORINE A 87
B- ETUDE IN VITRO DU ROLE DE LA CICLOSPORINE A DANS LA MODULATION DE L'ACTIVITE MITOGENE 88
1- Détermination des courbes dose-réponse
2- Détermination des courbes dose-réponse en présence de ciclosporine A
3- Détermination des courbes dose-réponse en présence de CGF
III- RESULTATS 89
A- MISE EN EVIDENCE D'UNE AFFINITE DES FACTEURS DE CROISSANCE POUR LA CICLOSPORINE A 89
B- ETUDE IN VITRO DU ROLE DE LA CICLOSPORINE A DANS LA MODULATION DE L'ACTIVITE MITOGENE DES FACTEURS DE CROISSANCE 91
1- Inhibition de l'activité mitogène du CGF par la ciclosporine A

2- Modulation des activités mitogènes de divers facteurs de croissance par la ciclosporine A et le CGF

IV- CONCLUSIONS 95

CONCLUSION GENERALE

BIBLIOGRAPHIE

INTRODUCTION

Le lait est le seul aliment du nouveau-né et doit donc répondre à l'ensemble des besoins de celui-ci. Le lait de la mère représente de loin l'aliment le mieux adapté au développement du nouveau-né. De nombreuses études ont montré effectivement que les nourrissons alimentés au lait de Femme présentaient une résistance plus grande aux infections bactériennes et virales. Cependant, certaines femmes ne peuvent allaiter. Aussi des aliments de substitution, appelés aliments lactés diététiques ont été élaborés. Ces aliments sont fabriqués à partir du lait de Vache dont la composition a été modifiée afin de le rendre plus digeste et plus adapté aux besoins du nourrisson. Les préparations commercialisées aujourd'hui répondent, pour la plupart, aux besoins caloriques et nutritionnels des nourrissons normaux. Elles se révèlent néanmoins moins adaptées dans le cas de l'alimentation et du traitement de nourrissons atteints d'infections bactériennes ou virales intestinales. Cette déficience s'explique d'une part par l'absence dans le lait de Vache de facteurs spécifiques et non spécifiques de la défense de la muqueuse intestinale comme les sIgA, la lactotransferrine, le lysozyme et le gynolactose de Polonovski et Lespagnol et, d'autre part, par l'absence dans le lait de Vache de facteurs de croissance capables d'assurer une régénération rapide des cellules intestinales lésées. Plus d'une dizaine de facteurs de croissance différents ont été mis en évidence dans le lait de Femme, en particulier le facteur de croissance épidermique (EGF) qui induit la prolifération et la maturation des cellules entérocytaires.

Nos travaux s'inscrivent dans la thématique du Laboratoire du Professeur G. SPIK concernant l'étude des composés biologiquement actifs du lait de Femme et la maternisation des laits. Il nous a été confié le sujet ayant l'intitulé suivant:

"Recherche de facteurs de croissance et de différenciation cellulaire dans le lait de Femme"

Dans un premier temps, nous avons étudié les activités de facteur de croissance du colostrum et du lactosérum à partir d'un fractionnement par chromatographie de tamisage moléculaire. Dans un deuxième temps, nous avons mis au point plusieurs protocoles de purification des

facteurs de croissance du lait de Femme dans le but d'isoler de nouvelles molécules mitogènes. En particulier, nous avons utilisé le fractionnement des protéines sur colonne d'héparine immobilisée qui est aujourd'hui universellement utilisé pour purifier les facteurs de croissance fibroblastiques. Ce fractionnement a conduit à la purification d' un facteur de croissance possédant une très forte affinité pour l'héparine. D'autre part, nous avons utilisé le fractionnement par chromatographie d'échange de cations afin de purifier les facteurs de croissance basiques. Lors de ce fractionnement, dans le but de préserver les activités mitogènes sensibles à pH acide nous avons mis au point un protocole ne comportant pas d'étape d'acidification. Ce protocole nous a permis d'isoler un polypeptide basique, acido-labile, mitogène pour les fibroblastes en culture. Une partie de sa séquence peptidique a été déterminée. Elle présente de fortes homologies avec la séquence de la cyclophiline, molécule cytoplasmique capable de fixer la ciclosporine. Dans la dernière partie de nos travaux nous étudions les interactions entre la ciclosporine A et le facteur de croissance analogue à la cyclophiline que nous avons isolé du lait de Femme.

Ce travail a fait l'objet du mémoire suivant :

Olivier Delmas, Pierrette Maes, André Tartar, Jean Montreuil and Geneviève Spik
A novel growth factor: isolation from human milk, characterization and comparison with cyclophilin
Soumis à publication à FEBS Letters

GENERALITES

GENERALITES SUR LES FACTEURS DE CROISSANCE

Les facteurs de croissance sont communément définis comme des polypeptides stimulant la prolifération cellulaire, en particulier in vitro. Ils diffèrent des polypeptides hormonaux par leur mode de stockage, de transport (ils n'appartiennent pas au système endocrine) et par leur moindre spécificité de tissus cibles. Une meilleure connaissance de leur mode d'action a conduit JAMES et BRADSHAW (1984) a leur donner une définition plus précise: "un facteur de croissance est un polypeptide qui induit la réponse à l'extérieur de la cellule exclusivement par la formation d'un complexe avec un récepteur membranaire spécifique; La réponse cellulaire, spécifique, qui peut-être hypertrophique ou hyperplasique, résulte de la formation du complexe facteur de croissance-récepteur; le complexe est internalisé par endocytose; la production, le transport et l'interaction avec des cellules cibles interviennent dans un processus physiologique".

Par analogie avec les hormones, trois modes possibles de transport des facteurs de croissance vers la cellules cible ont été proposés : endocrine, paracrine et autocrine (SPORN et TODARO, 1980).

Ils sont présents dans la plupart des tissus et les cellules en culture en sécrètent. La plupart, si ce n'est toutes les cellules, possèdent des récepteurs spécifiques d'un ou plusieurs facteurs de croissance. Différents facteurs de croissance agissent en synergie sur une même cellule (ROZENGURT, 1986).

Ils sont impliqués dans de nombreux mécanismes physiologiques et pathologiques, en particulier, dans l'embryogenèse, la croissance, le développement et la survie cellulaire, l'hématopoïèse, la réparation tissulaire, la réponse immunitaire, l'arthérosclérose, l'angiogenèse et les processus néoplasiques.

De nombreux oncogènes présentent des points communs avec les facteurs de croissance ou avec leurs récepteurs. Leur produit est soit le facteur de croissance lui-même (c-sis) (WATERFIELD et al., 1983), soit le récepteur (c-fms) (SHERR et al., 1985), soit une forme tronquée du récepteur (v-erbB)(DOWNWARD et al., 1984), soit une protéine de transduction du signal mitogène (MULCAHY et al.,1985). Inversement, il a été montré que des facteurs de croissance augmentaient la transcription de certains proto-oncogènes (myc et fos) (KELLY et al., 1983; GREENBERG et ZIFF, 1984). La dérégulation des mécanismes d'action des facteurs de croissance provoquée par les oncogènes conduit à des transformations néoplasiques.

Les facteurs de croissance ont été généralement dénommés soit suivant le tissu à partir duquel ils ont été isolés pour la première fois, soit suivant le type cellulaire sur lequel leur activité mitogène a été mise en évidence.

Au fur et à mesure que leur structure primaire à été déterminée, on s'est aperçu que différentes appellations désignaient une même molécule. Par exemple, le facteur de croissance fibroblastique basique porte 15 noms différents.

Nous décrivons dans les paragraphes suivants la localisation,les propriétés physico-chimiques et les propriétés biologiques des principaux facteurs de croissance, en les désignant par le nom le plus généralement admis.

I - PROPRIETES GENERALES DES PRINCIPAUX FACTEURS DE CROISSANCE

A - LES FACTEURS DE CROISSANCE EPIDERMIQUES

1 - Le facteur de croissance épidermique (EGF)

L'EGF a été mis en évidence pour la première fois dans les glandes sous maxillaires de souris par COHEN (1962) Il fut caractérisé comme un peptide qui provoque l'ouverture précoce des paupières et la pousse des dents chez la Souris nouveau-née. L'urogastrone, purifiée à partir des urines humaines, présente 70% d'homologie de séquence avec l'EGF de Souris (GREGORY, 1975).

L'EGF est un peptide monocaténaire de 53 acides aminés (masse moléculaire 6000) dérivant d'un précurseur de masse moléculaire 128 000 (GRAY et ULLRICH, 1983).

L'EGF est mitogène pour les cellules mésenchymateuses et épithéliales (ROSE et al., 1975).

2 - Le facteur de croissance transformant de type α (TGF-α)

Le facteur de croissance transformant de type-α (TGFα), qui appartient à la famille des facteurs de croissance épidermiques est caractéristique des cellules tumorales. Il a été mis en évidence pour la première fois dans des milieux de culture de cellules murines transformées par un virus oncogène de type sarc (TODARO et al., 1976).

Il est constitué d'une chaîne de 50 résidus, présente une homologie de structure avec l'EGF, et se fixe sur le même récepteur (TODARO et al., 1976).

Le TGF-α stimule non seulement la croissance des cellules, mais également la formation de colonies de cellules cultivées en milieu semi-solide (TODARO et al., 1979)

B - LE FACTEUR DE CROISSANCE DERIVE DES PLAQUETTES (PDGF)

Isolé à partir de plaquettes sanguines (ROSS ET VOGEL, 1978), le PDGF est le facteur de croissance le plus abondant dans le sang. Le PDGF est synthétisé par les plaquettes, les monocytes et les macrophages.

Il est constitué de deux chaînes glycosylées A et B, de masses moléculaires 18 000 et 16 000, reliées par un pont disulfure. Certaines cellules cancéreuses sécrètent une forme homodimère. La protéine $p28^{sis}$ de l'oncogène v-sis est fortement homologue à la chaîne B du PDGF (ROSS, 1987).

Le PDGF est chimiotactant pour les cellules fibroblastiques et pour les cellules du muscle lisse (SEPPA et al., 1982), mitogène pour la plupart des cellules du mésenchyme et pour les cellules gliales (ROSS, 1987).

C - LE FACTEUR DE CROISSANCE TRANSFORMANT DE TYPE-ß (TGF-ß)

Isolé à partir de milieux de culture des cellules tumorales, le TGF-ß a d'abord été décrit comme un facteur stimulant la croissance de cellules en milieu semi-solide (MOSES et al., 1981).

Il a été caractérisé comme un peptide de masse moléculaire 25 000 constitué de 2 chaînes reliées par un pont disulfure (DERYNCK et al., 1985). Le TGF-ß est sécrété sous une forme inactive, et est activé in vitro en milieu acide (LAWRENCE et al., 1984).

Son action peut-être soit activatrice soit inhibitrice de la multiplication cellulaire, suivant le type de cellules (TUCKER et al., 1984).

D - LES FACTEURS DE CROISSANCE SEMBLABLES A L'INSULINE (IGF-I et IGF-II)

L'IGF I (ou somatomedine C) et l'IGF II (ou somatomedine A) sont des facteurs de croissance sécrétés en réponse à l'hormone de croissance circulante. Ils ont été isolés pour la première fois à partir du sérum humain (RINDERKNECHT et HUMBEL, 1978a). Les IGF circulants sont fixés de manière non-covalente sur une protéine porteuse spécifique (FURLANETTO, 1980).

L'IGF-I est un peptide de 70 acides aminés comprenant trois ponts disulfures intercaténaires (RINDERKNECHT et HUMBEL, 1978b).

Les IGF sont des agents de multiplication et de différenciation des chondrocytes. (HIRAKI et al., 1986).

E - LES FACTEURS DE CROISSANCE NERVEUX

1 - Le facteur de croissance nerveux (NGF)

Le facteur de croissance nerveux, ou NGF, mis en évidence en premier lieu dans des tumeurs transplantées dans des embryons de poulet (LEVI-MONTALCINI et HAMBURGER, 1951) a été purifié à partir de venin de serpent (COHEN, 1960).

Le NGF est un homodimère de masse moléculaire 26 000 (ANGELETTI et BRADSHOW, 1971).

Le NGF est hypertrophique et hyperplasique pour les neurones. Il induit l'arrêt de la division et provoque la différenciation des cellules de la lignée de phéochromocytome PC 12 (GREENE et TISCHLER, 1976).

2 - La neuroleukine (NLK)

La neuroleukine (NLK) isolée du muscle dénervé et des glandes salivaires de Rat est neurotrope pour les neurones spinaux et sensoriels (GURNEY et al., 1986).

La détermination de la séquence de la NLK a montré que cette molécule est une phosphohexose isomèrase (CHAPUT et al., 1988).

F - LES FACTEURS DE CROISSANCE INTERVENANT DANS L'HEMATOPOIESE

L'hématopoïèse est sous la dépendance d'une régulation permettant le maintien d'une production cellulaire stable à l'état basal et son adaptation aux besoins éventuels. Toutes les cellules du sang ont pour origine une cellule souche dite totipotente de la moëlle. Les différentes étapes de la différenciation des cellules hématopoïètiques sont contrôlées par les facteurs de croissance granulocyto-monocytaires (CSF) (COSMAN, 1988) (Fig.1):

- l'Interleukine 3 (ou multi CSF), glycoprotéine de masse moléculaire 20-26 000, est synthétisée par les lymphocytes T. Elle stimule la croissance des cellules totipotentes et des éosinophiles.

- Le GM-CSF, glycoprotéine de 127 acides aminés, est synthétisé par les lymphocytes T, les cellules endothéliales et les fibroblastes. Il intervient dans la maturation des granulocytes et des macrophages.

- Le G-CSF, protéine de 19 000, synthétisé par les monocytes et les fibroblastes, agit sur les neutrophiles.

- Le M-CSF (ou CSF 1), glycoprotéine bicaténaire de masse moléculaire 70 - 90 000, synthétisé par les monocytes, intervient dans la maturation des monocytes et des macrophages.

- L'érythropoïètine joue également un rôle très important dans l'hématopoïèse. Synthétisée par le rein, elle est considérée comme étant une hormone.

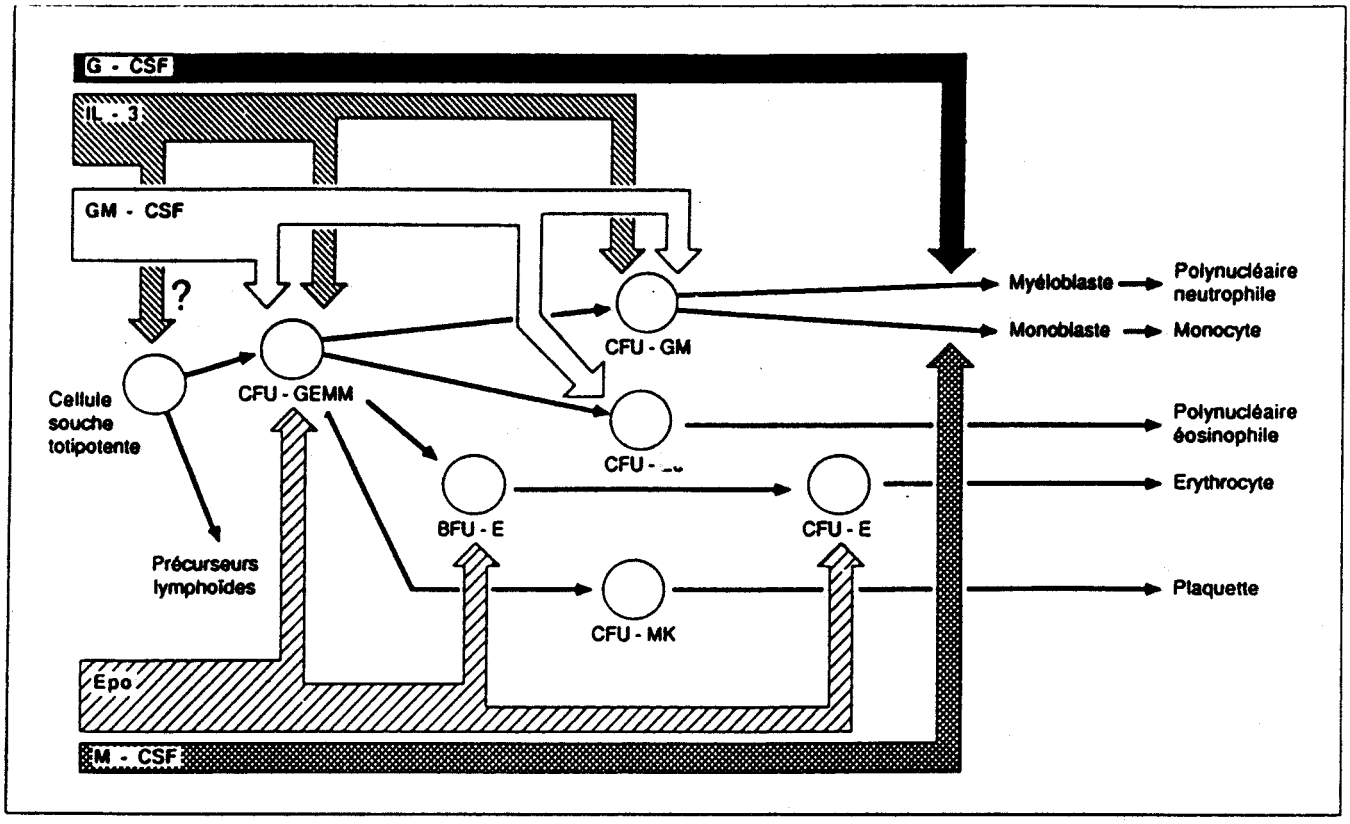

Figure 1: Schéma de l'action des facteurs de croissance de l'hématopoïèse. CSF: colony-stimulating factor; G-CSF: granulocyte-CSF; GM-CSF: granulocyte, monocyte-CSF; M-CSF: monocyte-CSF; IL-3: Interleukine 3; CFU: colony-forming-unit; CFU-GEMM: CFU-granulocyte,erythrocyte,monocyte,mégakaryocyte; CFU-GM: CFU-granulocyte-monocyte; CFU-Eo: CFU-eosinophils; CFU-E: CFU-erythrocyte CFU-MK: CFU-megakaryocyte; BFU-E: burst-forming-unit-erythrocyte; Epo: Erythropoïétine. (d'après SOLAL-CELIGNY, 1988)

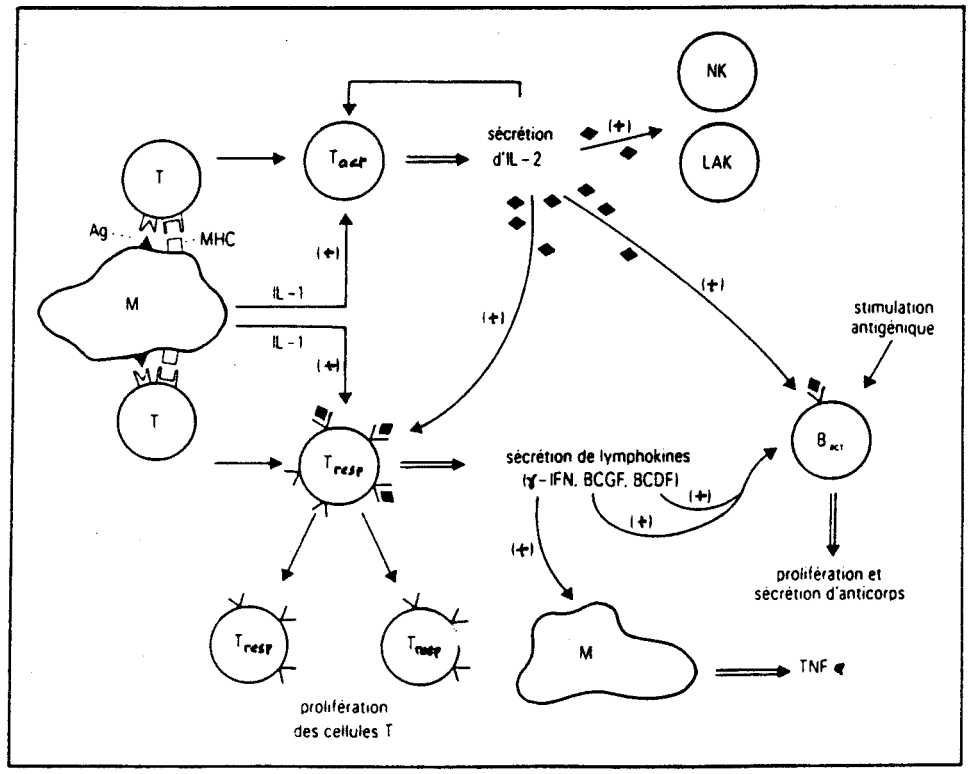

Figure 2: Induction de la réponse immunitaire. M: macrophage; T-act: lymphocyte T activé; T-resp: Lymphocyte répondant à l'IL-2 (T cytotoxique); NK: Natural killer; LAK: lymphokine activated killer; B-act: lymphocyte B activé; IL-1: Interleukine 1; Γ-IFN: interféron-Γ; BCGF: facteur de différenciation des lymphocytes B; BCDF: facteur de différenciation des lymphocytes B; Ag: antigène (d'après ROBB, 1984)

G - LES FACTEURS DE CROISSANCE INTERVENANT DANS LA REPONSE IMMUNITAIRE

Le développement de la réponse immunitaire suite à l'introduction d'un antigène dans l'organisme met en jeu des facteurs de croissance, dénommés lymphokines, intervenant sur les cellules immunitaires (Fig.2):

- L'Interleukine 1, protéine de masse moléculaire de 15 - 17 000, intervient dans l'activation des lymphocytes T, et est produite essentiellement par les macrophages et les monocytes, mais aussi par les lymphocytes B, les cellules épithéliales et les kératinocytes (MOCHIZUKI et al., 1987).

- L'Interleukine 2, facteur de croissance des lymphocytes T et B, est une glycoprotéine de 133 acides aminés (masse moléculaire : 15 000) (SMITH, 1984; MINGARI et al., 1984) et agirait de manière autocrine sur les lymphocytes T.

- L'Interleukine 4 ou facteur de croissance des lymphocytes B (BCGF-1) provoque la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes et est mitogène pour les lymphocytes T (LEE et al. 1986).

- L'Interleukine 5 est mitogène pour les lymphocytes B et pour les éosinophiles (KINASHI et al., 1986).

- L'Interleukine 6, protéine de masse moléculaire apparente 19 - 21 000, induit la croissance des plasmocytes. Elle est également dénommée Interféron ß2 et facteur de différenciation des lymphocytes B (BCDF) (WONG et CLARK, 1988).

H - LES FACTEURS DE CROISSANCE FIBROBLASTIQUES

La famille des FGFs est subdivisée en deux groupes constitués par le FGF acide et le FGF basique, polypeptides de masses moléculaires 15 000-19 000. Ces deux formes présentent une homologie de séquence de 55%. Ils diffèrent par leur pI, de 5,6 pour la forme acide et de 9,6 pour la forme basique. Ils possèdent une forte affinité pour l'héparine (SULLIVAN et KLAGSBRUN, 1985) ce qui leur vaut l'appellation de "Heparin Binding Growth Factors" ou HBGF. Le FGF acide est élué sur une colonne d'héparine immobilisée par une solution renfermant 1,0 M en NaCl, et est dénommé HBGF I. Le FGF basique est élué par une solution renfermant 1,6 M en NaCl, et est dénommé HBGF II.

Le FGF acide est localisé dans les tissus nerveux, oculaires,

osseux, dans les ostéosarcomes (LOBB et al., 1986) et dans le rein (GAUTSCHI-SOVA et al., 1987).

Le FGFb est présent dans les tissus nerveux, le cartilage, le placenta, la glande pituitaire, le rein, le corpus luteum, les glandes adrénaliennes, les cellules du système immunitaire, la prostate, les tissus osseux, les tissus cancéreux et d'une manière générale dans les organes hautement vascularisés (GOSPODAROWICZ et al., 1987). Le FGF basique est présent dans de nombreuses cellules en culture: macrophages, cellules endothéliales, cellules stéroïdogéniques du cortex adrénalien, et cellules transformées: rhabdomyosarcomes, neuroblastomes, hemangioendothélioblastomes (SCHWEIGERER et al., 1987a,b,). Par contre, le FGF n'a jamais été mis en évidence dans des liquides biologiques.

De part l'abondance des travaux consacrés au FGF basique, nous exposons plus en détail la structure, les rôles biologiques et le mécanisme d'action du FGF basique.

1- Structure du facteur de croissance fibroblastique basique

Le FGFb est un peptide monocaténaire de 131 à 157 acides aminés possédant une extrémité N-terminale variable suivant son origine (MOSCATELLI et al., 1988). Toutes les formes ont les mêmes activités biologiques. Le FGFb a une structure qui est très conservé entre les différentes espèces animales. L'homologie entre la forme humaine et bovine est de 98,7% (ABRAHAM et al., 1988).

La molécule ne possède pas de séquence signal, de type hydrophobe, pour la sécrétion, mais seulement une courte séquence de résidus d'acides aminés neutres à l'extrémité N - terminale (ABRAHAM et al., 1986).

Certains oncogènes codent pour des protéines homologues du FGF : l'oncogène int - 2 présent chez l'embryon de souris (DICKSON et PETERS, 1987), l'oncogène hst isolé de tumeurs de l'estomac chez l'homme (YOSHIDA et al., 1987) et l'oncogène ks-3 isolé du sarcome de Kaposi (BOVI et al., 1987). Une homologie structurale existe entre le FGF basique et l'Interleukine I (THOMAS et GIMENEZ - GALLEGO, 1986).

Un seul gène code pour le FGF, il est constitué par trois exons et de deux introns (ABRAHAM et al., 1986 b), et est localisé sur le chromosome 4.

2- Effets biologiques in vitro du FGF basique

L'activité du FGFb a été d'abord mise en évidence sur les cellules de la lignée Balb/c3T3. Il agit d'une manière générale sur les cellules d'origine mésodermique et neuroectodermique, à des concentrations de 10 à 100 pM. Les temps de doublement des cellules en culture sont diminués, la phase G1 du cycle cellulaire étant raccourcie (GOSPODAROWICZ, 1985). Les cellules Balb/c3T3 acquièrent une morphologie de cellules transformées, et le cyto-squelette est modifié (GOSPODAROWICZ, 1985).

Des chondrocytes différenciés forment des colonies en Agar mou, en présence de FGF, sans avoir le phénotype de cellules transformées (KATO et al., 1987).

Le FGFb est également capable de provoquer la différenciation de plusieurs types cellulaires en culture comme les cellules granulaires de l'ovaire (ADASHI et al., 1988). A l'opposé les cellules tumorales de muscle (lignée BC3H1) se dédifférencient sous l'action du FGFb, ce qui se traduit par l'arrêt de la synthèse de l'α-actine, et l'entrée des cellules en phase G1 (WICE et al., 1987).

L'action du FGFb sur les cellules endothéliales est multiple. MONTESANO et al. (1986) ont utilisé un modèle de culture de cellules endothéliales dans une matrice tridimensionnelle de collagène. Dans ces conditions, le FGFb provoque la formation de tubules similaires à des capillaires sanguins. L'organisation des cellules endothéliales en une telle structure est provoquée par l' invasion de la matrice par les cellules endothéliales (effet de chimiotactisme) (CONNOLLY et al., 1987), ainsi que par la sécrétion de l'activateur du plasminogène, protéase intervenant dans la lyse du collagène, impliqué in vivo dans le mécanisme de l'angiogénèse (MIRA-Y-LOPEZ et al., 1986).

Le FGFb a également un rôle important dans le système nerveux. Il provoque une différenciation des cellules de la lignée PC-12 (phéochromocytome) en neurones sympathiques (RYDEL et GREENE, 1987).

Ainsi, in vitro, le FGFb apparaît comme un agent multifonctionnel provoquant des effets divers et même opposés suivant le type cellulaire cible.

3- Agents modulateurs de l'activité du FGF basique

La matrice extra-cellulaire a un rôle très important dans la régulation de l'activité du FGFb, où il serait emprisonné. L'action de protéases sur la matrice extra-cellulaire libérerait le FGF. BAIRD et LING (1987) ont montré que la matrice extra-cellulaire produite par des cellules endothéliales en culture est riche en FGF.

Le facteur de croissance transformant de type ß, augmente le pouvoir mitogène du FGF sur des ostéoblastes, mais inhibe son activité sur des cellules endothéliales vasculaires (BAIRD et DURKIN, 1986).

4- Effets biologiques in vivo du facteur de croissance fibroblastique basique

le FGFb, présent dans les tissus embryonnaires (RISAU, 1986), provoque la différenciation de tissus ectodermiques d'embryons de grenouille en tissus mésodermiques (SLACK et al., 1987).

Le FGFb intervient dans la régénération des membres chez les amphibiens, probablement en contrôlant la croissance des neurones (GOSPODAROWICZ et MESCHER, 1981).

Le FGFb est angiogène in vivo lorsqu'il est appliqué sur la membrane chorio-allantoïdiène de l'oeuf de Poule.

Présent dans les macrophages, il serait libéré au niveau des plaies et favoriserait la cicatrisation (THOMAS et GIMENEZ-GALLEGO, 1986).

Il intervient dans la réparation des tissus lésés, comme la régénération de l'endothelium de la cornée (LANDSHMAN et al., 1987).

Le FGFb est impliqué dans plusieurs cas pathologiques : dans le développement des tumeurs en favorisant leur vascularisation et en étant mitogène pour certaines cellules tumorales. Le FGFb serait également impliqué dans la rétinopathie-diabétique.

5- Le mécanisme d'action du facteur de croissance fibroblastique basique

Toutes les cellules qui réagissent sous l'effet du FGFb possèdent à leur surface des récepteurs spécifiques de cette molécule. Jusqu'à présent une seule classe de récepteurs a été mise en évidence.Les constantes de dissociation décrites sont de 11 pM (sur des cellules musculaires) à 270 pM (cellules de la lignée BHK-21) et le nombre de récepteurs par cellule est de 2.10^3 à 10^5 (NEUFELD et GOSPODAROWICZ, 1985).

La fixation du ligand sur son récepteur provoque une suite de réactions encore mal connues. Le signal mitogène ne serait pas transmis, contrairement à de nombreux régulateurs, ni par l'hydrolyse des phospho-inositides, ni par l'activation de la protéine kinase C (MAGNALDO et al., 1986). Cependant, on observe la stimulation d'une activité tyrosine kinase, et la phosphorylation d'une protéine cytoplasmique de masse moléculaire de 90 000 (COUGHLIN et al., 1988).

Le FGFb entrerait dans le noyau où il s'accumulerait, et entraînerait l'augmentation du taux de nucléoline et la transcription des gènes ribosomiaux, dans des cellules passant de la phase G0 à la phase G1 (BOUCHE et al., 1987).

Sur les cellules de la lignée CCL 39, une concentration de 50 ng/ml de FGFb provoque une alcalinisation du cytoplasme, augmente la concentration en Ca^{++}, la phosphorylation de la protéine ribosomiale S6, et l'expression de l'oncogène c-myc (MAGNALDO et al., 1986). Sur des cellules BALB/c3T3 en phase G0, le FGFb, provoque un flux positif vers la cellule d'ions potassium par l'intermédiaire du transporteur sensible à la bumétanide (PANET et al., 1986).

Le FGFb provoque la sécrétion de protéines, comme la prolactine et les cathepsines, molécules qui pourraient intervenir dans la stimulation de la croissance cellulaire (BAIRD et al., 1985).

6- Conclusions

Le FGF basique, de part sa distribution ubiquitaire et de la grande variété de ses cellules cibles, intervient dans des processus physiologiques et pathologiques très variés. L'identification récente de

produits d'oncogènes ayant une homologie de séquence avec le FGFb permettra de mieux connaître son rôle dans les processus néoplasiques.

Le mécanisme d'action du FGFb est encore mal élucidé, et différerait des mécanismes d'action des autres facteurs de croissance.

I - LES FACTEURS DE CROISSANCE TRES AFFINES POUR L'HEPARINE

Des peptides ayant des activités mitogènes sont élués, sur colonne d'héparine immobilisée, par des concentrations en NaCl supérieures à 1,6 M. HAUSCHKA et al. (1986) ont étudié les facteurs de croissance de type HBGF de la matrice osseuse et décrivent des peptides mitogènes élués à 1,9 M, 2,0 M et 2,4 M en NaCl. Ces peptides n'ont pas été caractérisés et bien qu'affines pour l'héparine, on ne peut affirmer qu'ils appartiennent à la classe des FGFs. HAMERMAN et al. (1987) ont également mis en évidence dans le liquide synovial humain des peptides mitogènes élués par des concentration en NaCl supérieures à 2,0 M.

II - CONCLUSIONS SUR LES FACTEURS DE CROISSANCE

Les facteurs de croissance sont des molécules régulatrices de la croissance et de la différenciation cellulaire, in vitro et in vivo.

Le rôle d'un facteur de croissance peut-être d'induire un effet soit prolifératif,soit anti-prolifératif, soit autre, suivant le type et l'état de différenciation de la cellule cible. A titre d'exemple, l'EGF est mitogène pour les kératinocytes et les fibroblastes, anti-prolifératif pour les cellules folliculaires des cheveux, et diminue la sécrétion d'acide gastrique dans l'estomac, indépendamment d'un effet prolifératif (SPORN et ROBERTS, 1988).

La croissance et la différenciation cellulaire sont contrôlées par le jeu complexe de plusieurs facteurs de croissance agissant en synergie ou en antagonie. Citons le cas du TGF-ß qui a un effet prolifératif sur des fibroblastes, en présence de PDGF, et un effet anti-prolifératif sur ces même cellules lorsqu'elles sont cultivées en présence d'EGF. (SPORN et ROBERTS, 1988).

Les multiples combinaisons possibles de facteurs de croissance agissant sur une même cellule permettraient de transmettre une grande variété d'informations aux cellules cibles. Le décriptage du "langage cellulaire" conduira à la compréhension de nombreux phénomènes pathologiques. En effet, le dérèglement du fonctionnement des facteurs de croissance conduit à des processus pathologiques, comme par exemple le diabète sucré, le psoriasis, les processus néoplasiques et certaines maladies immunes.

D'ores et déjà, des essais cliniques sont en cours en ophtalmologie et dans le traitement des ulcères avec l'EGF, en chirurgie pour accélérer la cicatrisation avec l'EGF le FGF et le PDGF, pour la revascularisation des tissus lésés avec le FGF. D'autres applications cliniques sont envisagées, comme le traitement de la maladie d'Alzheimer par le NGF.

LES FACTEURS DE CROISSANCE DES LAITS DE MAMMIFERES

I - LES PROPRIETES MITOGENES DES LAITS DE MAMMIFERES

Le sang est un liquide biologique qui renferme les facteurs nécessaires à la nutrition, la croissance et le développement des cellules de l'organisme. Le sérum est universellement utilisé dans les milieux de culture cellulaire. Cependant, le sérum se révèle inadapté pour la culture de certaines cellules.

Comme le sérum, le lait est un liquide biologique intervenant dans la nutrition, la croissance et le développement de l'organisme. C'est en 1978 que KLAGSBRUN mit en évidence l'activité mitogène du lait de Femme, sur des cellules embryonnaires fibroblastiques de souris, lignée Balb/c3T3. Le lait fut ensuite utilisé dans la culture de cellules épitheliales, fibroblastiques, de muscles lisses, et de chondrocytes (KLAGSBRUN, 1980; STEIMER et KLAGSBRUN, 1981; STEIMER et al., 1981; SERENI et BARSEGA, 1981).

SHING et KLAGSBRUN (1984) ont comparé l'activité mitogène, sur des cellules Balb/c3T3, du lait et du sérum d' une même Femme, 30 jours après l'accouchement et du lait et du sérum d'une même Vache au jour du vêlage. Une unité de facteur de croissance, définie comme la concentration en facteur de croissance qui engendre une synthèse d'ADN moitié moindre du maximum, a été obtenue à environ 0,5% (vol/vol) de lait de Femme ou du colostrum de Vache. Par contre, ce même effet a été obtenu avec 3,5% de sérum humain et 6% de sérum de Vache. Il apparaît donc, d'après ces résultats, que le lait a une activité mitogène supérieure à celle du sérum. Le lait de Femme renferme en moyenne 10g/l de protéines solubles contre 70g/l pour le sérum humain. L'activité mitogène en poids de protéines est donc 50 fois plus élevée dans le lait de Femme que dans le sérum.

L'activité mitogène des laits est fonction de la période d'allaitement (SHING et KLAGSBRUN, 1984). Cette activité diminue très rapidement chez la Vache, et est quasiment nulle trois jours après la

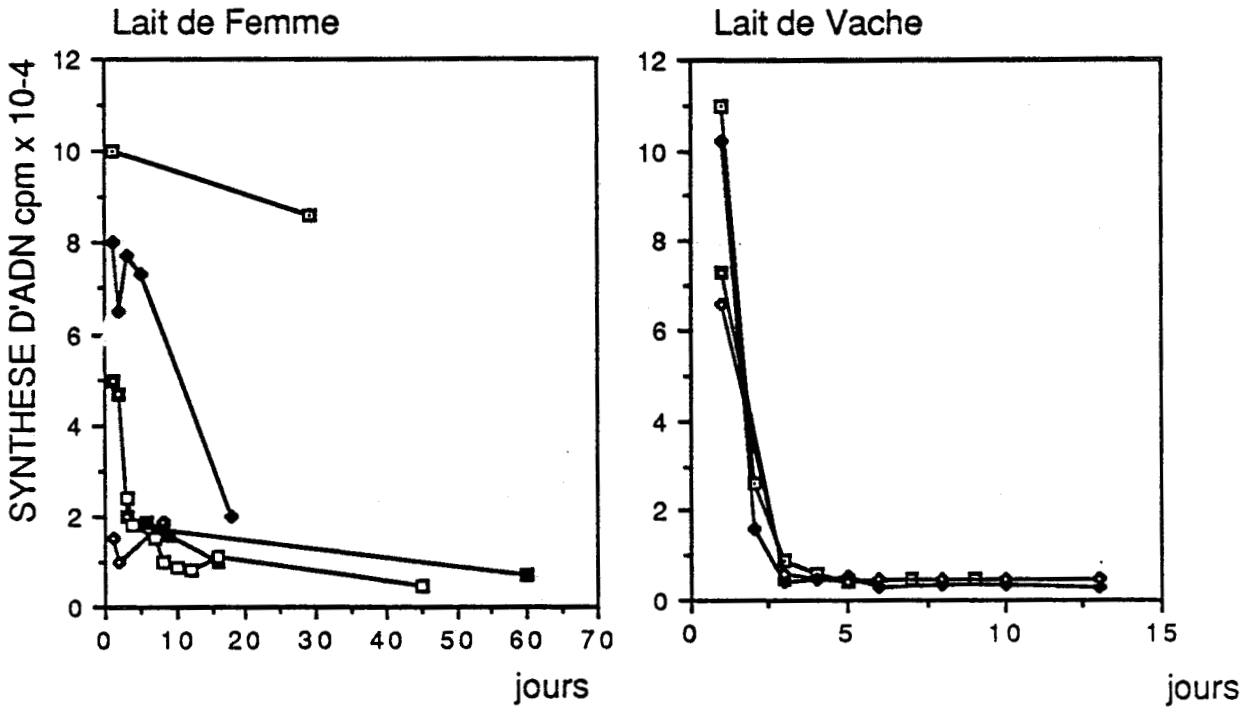

Figure 3 : Activités de facteur de croissance du lait de Femme et du lait de Vache obtenus à différentes périodes d'allaitement. 0,5% (vol/vol) de lait sont inolculés sur des cultures de cellules 3T3. La synthèse d'ADN est mesurée. Comparaisons entre 6 Femmes et 4 Vaches. D'après SHING et KLAGSBRUN, 1984.

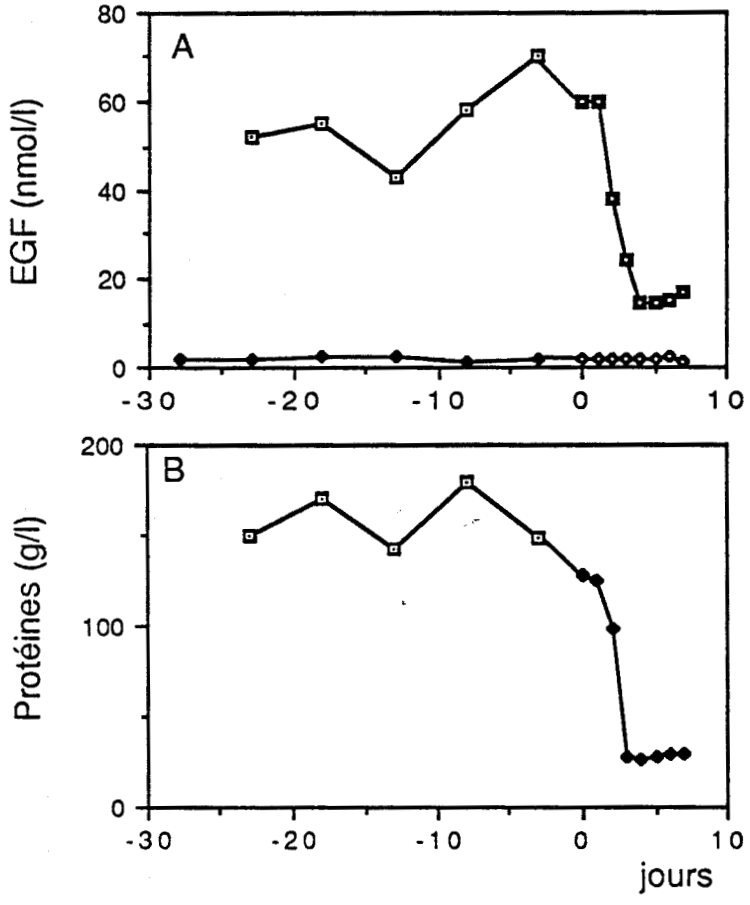

Figure 4 : Concentration en EGF dans le lait (□) et dans les urines (◇) en fonction de la période d'allaitement (A). Concentration en protéines dans le lait au cours de la même période (B). D'après CORPS et al., 1987.

naissance (Fig. 3). Le lait de Femme conserve une forte activité mitogène pendant les 15 premiers jours de l'allaitement et celle-ci est toujours détectable un mois après la naissance (Fig. 4).

II - LES FACTEURS DE CROISSANCE DU LAIT DE FEMME.

Depuis la mise en évidence d'un facteur de croissance semblable à l'EGF par KLAGSBRUN en 1978, plus d'une dizaine de facteurs de croissance différents ont été mis en évidence dans le lait de Femme. Certains de ces facteurs de croissance ont été isolés. C'est le cas de l'EGF et du MDGF-I. D'autres ont été mis en évidence soit par des techniques immunochimiques (IGF-I) ou de radiorécepteur (PDGF), soit par la mise en évidence de leur activité biologique particulière (TGF-α, NGF) (Tableau I).

A - LE FACTEUR DE CROISSANCE EPIDERMIQUE

CARPENTER (1980) a mesuré la stimulation de la synthèse de l'ADN par des cellules incubées en présence de lait de Femme et d'anticorps anti-EGF. Les anticorps diminuent de 67% l'activité mitogène du lait. L'EGF serait donc le facteur de croissance prédominant du lait de Femme.

Sa concentration varie au cours de l'allaitement (TABLEAU II). Des concentrations de 800 ng/ml ont été trouvées dans le précolostrum recueilli 20 jours avant l'accouchement, soit la concentration la plus élevée trouvée dans l'organisme humain (MORAN et al., 1983). Relativement stable avant la naissance, la concentration en EGF chute entre le deuxième et le quatrième jour après l' accouchement (Fig. 4) (CORPS et al., 1987; BEARDMORE et al., 1983). La concentration en EGF dans le colostrum de mères ayant accouchées prématurément (26 à 30 semaines de gestation) est plus élevée que dans le colostrum de mères ayant accouché à terme, soit 480 $\pm$ 90ng/ml contre 320 $\pm$ 42ng/ml (READ et al., 1985).

PETRIDES et al. (1985) ont isolé l'EGF du lait de Femme par chromatographie liquide haute pression en phase inverse. La composition en acides aminés du peptide isolé est identique à celle de l'urogastrone,

TABLEAU I

PROPRIETES DES DIFFERENTS FACTEURS DE CROISSANCE DU LAIT MATERNEL

Facteur de croissance	Pi	Masse Moléculaire ($x10^{-3}$)	Inactivation	Stabilité	Activités biologiques	Concentration en ng/ml	Références
EGF	4,4-4,7	6		trypsine pepsine chymotrypsine	Multiples	colost. 35-340 lait 5-100	CARPENTER (1980) PETRIDES et al. (1985)
α-TGF (3 formes)	6 5				Stimulation de la croissance de cellules en agar mou		PETRIDES et al. (1985) ZWIEBEL et al. (1986)
MDGF I	4,8	62	pepsine	DTT	Stimulation de la synthèse de collagène		BANO et al. (1985)
MDGF II (α-TGF)	4	17	pepsine DTT	30 min à 100°C	Stimulation de la croissance de cellules en agar mou		ZWIEBEL et al. (1986)
PDGF						colost. 10-20 lait 1	RAINES (1986)
IGF-I		7,8 40 150				colost. 17 lait 6-8	BAXTER et al. (1984)
NGF					Provoque la différenciation des cellules PC-12		WRIGHT et GAULL (1983)
CSF-1	4,4-4,9	240-250	Protéases	urée, chlorhydrate de guanidine, DTT	Stimule la formation de colonies de macrophages et de granulocytes		SINHA et YUNIS (1983)
Sans dénomination		adialysable		actif aprés extraction à l'acétone	Stimule la synthèse de prostaglandines par des fibroblastes		SUBBIAH et al. (1985)

TABLEAU II

CONCENTRATIONS EN EGF DANS LE COLOSTRUM ET LE LAIT DE FEMME
en ng/ml

Période d'allaitement	Concentration	Méthode	Références
Colostrum	197 ± 56	RIA	JASPAR et FRANCHIMONT(1985)
Lait stabilisé	107 ± 22		
j. -23	300	RIA	CORPS et al. (1987)
j. 0	360		
j. +2	180		
j. +4	80		
j. +4	25-38	RIA	JANSSON et al. (1985)
j. +30	5,2-11,5		
j. -50	300-600	RIA	BEARDMORE et al. (1983)
j. -20	200-800		
j. 0	35-440		
j. +20	20-110		
Lait stabilisé	35-140	RIA	MORAN et al. (1983)
Accouchement à terme*			
j. +1	320 ± 42	RRA	READ et al. (1985)
j. +2	168 ± 32		
lait stabilisé	30 ± 2		
Accouchement prématuré*			
j. +1	426 ± 90		
j. +2	180 ± 30		
lait stabilisé	54 ± 12		
Accouchement prématuré précoce*			
j. +1	480 ± 80		
j. +2	210 ± 36		
lait stabilisé	96 ± 36		

Les jours sont comptés à prtir du jour de l'accouchement
RIA: radio-immuno-assay; RRA: radio-receptor-assay
* terme: 38-42 semaines de gestation; prématuré: 31-36 semaines de gestation; prématuré précoce: 26-30 semaines de gestation

c'est à dire à l'EGF humain isolé des urines. La microséquence en phase gazeuse révèle une identité de séquence des 17 premiers acides aminés N-terminaux. Il s'agit à notre connaissance de la seule étude portant sur la séquence peptidique d'un facteur de croissance isolé du lait de Femme.

Si l'EGF du lait humain est identique à l'EGF des urines humaines (PETRIDES et al., 1985), des molécules de masse moléculaires supérieures sont immunoréactives vis à vis d'anticorps anti-EGF (PESONEN et al., 1987) et sont compétitives vis à vis du récepteur à l'EGF sur des cellules fibroblastiques lignée 3T3 (CORPS et al., 1987).

B - LE FACTEUR DE CROISSANCE TRANSFORMANT DE TYPE α

Les facteurs de croissance de type TGF-α ont la propriété d'induire la formation de colonies de cellules normales cultivées en Agar mou. Ils se fixent sur le même récepteur que l'EGF. ZWIEBEL et al., (1986) ont identifié, dans le lait de Femme, quatre peptides qui présentent ces deux propriétés. L'activité transformante a été montrée pour des cellules de la lignée NRK, cellules de rein de Rat. La fixation sur des récepteurs a été faite sur des cellules de la lignée A431, carcinome humain. L'un de ces facteurs, baptisé Milk Derived Growth Factor II (MDGF II) a été partiellement purifié. Sa masse moléculaire est de 17 000 et son pI de 4,0. Il est inactif après digestion par la pepsine, et après exposition au dithiothréitol. Par contre, il conserve son activité après ébullition.

C - LE FACTEUR DE CROISSANCE DERIVE DES PLAQUETTES

RAINES (1986) a estimé par une méthode de dosage radioréceptologique que la concentration en PDGF dans le colostrum de Femme est comprise entre 10 et 20ng/ml, et quelle est voisine de 1ng/ml dans le lait stabilisé.

D - LE FACTEUR DE CROISSANCE SEMBLABLE A L'INSULINE DE TYPE I

BAXTER et al. (1984) ont identifié trois formes de Somatomedine C (ou Insulin Like Growth Factor I) par un dosage radioimmunologique

effectué sur des fractions de lait de Femme obtenues par tamisage moléculaire sur Sephadex G-200, de masse moléculaire 150 000, 40 000 et 7 800. Les deux premières formes représentent 80% de l'immunoréactivité totale. Si la chromatographie de tamisage moléculaire est effectuée dans de l'acide acétique 1 M, l'immunoréactivité n'est présente que dans la fraction de masse moléculaire 7 000-8 000. L'IGF-I serait donc essentiellement fixé sur une molécule porteuse. La concentration totale est de 17 ng/ml dans le colostrum et de 6 à 8 ng/ml dans le lait mature.

E - LE FACTEUR DE CROISSANCE NERVEUX

Le facteur de croissance nerveux (NGF) a pour effet, sur les cellules de la lignée PC-12 de stopper la division cellulaire et de provoquer leur différenciation en neurones sympathiques (voir p.7). Incubées en présence de lait de Femme, les cellules PC-12 entrent en phase de différenciation. Par contre, incubées en présence de sérum, elles ne se différencient pas. Des anticorps anti-NGF inhibent le pouvoir de différenciation du lait de Femme (WRIGHT et GAULL, 1983). Ces auteurs en concluent que le lait de Femme renferme du NGF, mais n'ont pas isolé cette molécule.

F - LE FACTEUR DE CROISSANCE STIMULANT LA FORMATION DE COLONIES DE TYPE GRANULO-MONOCYTAIRE

Les facteurs de croissance de type GM-CSF interviennent dans l'hématopoïèse. Ils sont capables d'induire <u>in vitro</u> la culture de moelle osseuse, la prolifération et la différenciation des cellules précurseurs des granulocytes et des macrophages (CFU-GM), qui forment alors des colonies mixtes de macrophages et de granulocytes (voir p.8). En utilisant ce test, SINHA et YUNIS (1983) ont mis en évidence une activité de ce type dans le lait de Femme. La molécule, partiellement purifiée, a une masse moléculaire de 240-250 000, un pI de 4,4-4,9, est inactivée par digestion protéasique mais est résistante à l'action de l'urée, du chlorhydrate de guanidine et du dithiothreitol.

G - LE FACTEUR DE CROISSANCE DERIVE DU LAIT DE TYPE I

BANO et al. (1985) ont isolé du lait de Femme et de tumeurs mammaires un facteur de croissance, baptisé MDGF I, qui serait différent des autres facteurs de croissance connus actuellement. Il interviendrait dans le développement de la glande mammaire, en provoquant une biosynthèse élevée de collagène par les cellules de l'épithélium mammaire, et agirait comme facteur autocrine. Son action ne se limiterait pas à la glande mammaire. En effet, il se fixe sur d'autres types cellulaires (cellules NRK et A431, $K_D = 2.10^{-10}$ M). Sa masse moléculaire est de 62 000, son pI de 4,8.

H - AUTRES ACTIVITES DE TYPE FACTEUR DE CROISSANCE

SUBBIAH et al. (1985) ont montré que le lait de Femme stimule la synthèse des prostaglandines par des fibroblastes du derme en culture. Les facteurs impliqués n'ont pas été identifiés.

III - LES FACTEURS DE CROISSANCE DANS LES LAITS DES AUTRES MAMMIFERES.

A - LES FACTEURS DE CROISSANCE DES LAITS DE RUMINANTS

Les colostrums de Chèvre, de Vache et de Brebis possèdent une forte activité mitogène alors que les laits matures ont une activité mitogène 25 fois inférieure (SHING et KLAGSBRUN, 1984; BROWN et BLAKELEY, 1983).

1 - Les facteurs de croissance du colostrum de Chèvre

BROWN et BLAKELEY (1984) ont partiellement purifié un facteur de croissance de type PDGF du lait de Chèvre, baptisé "Colostric Basic Growth Factor" (CBGF). Très basique, thermostable, de masse moléculaire 35 000, il est cependant capable de déplacer, à 37°C, l'^{125}I-EGF fixé sur des cellules 3T3. A 4°C ce phénomène n'est pas observé. Ces auteurs en concluent que l'inhibition de la fixation de l'EGF n'est pas due à la présence d'un facteur de croissance de type EGF, mais à un phénomène de transmodulation du récepteur de l'EGF provoquée par l'action du CBGF sur les cellules 3T3.

2 - Les facteurs de croissance du colostrum de Vache

HIDEKI et al. (1986) ont estimé par la technique du radiorécepteur que la concentration en EGF dans le lait de Vache est de 342,2 ng/ml. Ce type d'expérience ne permet cependant pas d'affirmer que l'inhibition de la fixation de l'^{125}I-EGF est due à de l'EGF, pour les raisons que nous avons exposées précédemment.

Le tamisage moléculaire du colostrum de Vache montre que l'activité mitogène est concentrée dans les fractions de masses moléculaires apparentes 30-35 000 et que les fractions de masses identiques à l'EGF ne sont pas actives (SHING et KLAGSBRUN, 1984). SHING et KLAGSBRUN (1987) ont isolé du lait de Vache un facteur de croissance de type PDGF constitué de deux sous unités identiques de masse moléculaire 20 000.

FRANCIS et al. (1986) ont identifié l'IGF-I dans le colostrum de Vache, ainsi que plusieurs formes d'IGF-II (FRANCIS et al., 1988).

Il semblerait donc que le facteur de croissance prédominant des colostrums de ruminants soit une forme de PDGF (Tableau III).

B - LES FACTEURS DE CROISSANCE DU LAIT DE TRUIE

Le dosage de l'EGF par une méthode radioréceptologique sur des cellules fibroblastiques a permis à JAEGER et al. (1987) d' estimer à 520 ng/ml la concentration en EGF dans le colostrum de Truie. CERA et al. (1987) ont montré que ni des IgG anti-PDGF ni des IgG anti-EGF ne sont capables d'inhiber l'activité mitogène du lait de Truie et que d'autre part le colostrum de Truie ne permet pas d'inhiber la fixation de ^{125}I-EGF sur des cellules A431. Le facteur prédominant du lait de Truie serait donc distinct du PDGF et de l'EGF.

C - LES FACTEURS DE CROISSANCE DES LAITS DE MURIDES

L'EGF serait le facteur de croissance prédominant des laits de Ratte et de Souris (Tableau III). La concentration en EGF est maximale au huitième jour de l'allaitement chez la Souris (GRUETERS et al., 1985a). Le lait de Souris renferme également du NGF (GRUETERS et al., 1985b).

TABLEAU III

LES FACTEURS DE CROISSANCE DES COLOSTRUMS DE MAMMIFERES

Origine	Concentration en ng/ml	Références
COLOSTRUM DE VACHE		
EGF	Moins de 0,2	SHING et KLAGSBRUN (1984)
EGF	150 à 320 *	HIDEKY et al. (1986)
PDGF	20	SHING et KLAGSBRUN (1987)
IGF I		FRANCIS et al.(1986)
IGF II	10	FRANCIS et al.(1988)
COLOSTRUM DE CHEVRE		
PDGF		BROWN et BLAKELEY (1984)
COLOSTRUM DE TRUIE		
EGF	*	JAEGER et al. (1987) CERA et al. (1987)
LAIT DE RATTE		
EGF	40	THORNBURG et al. (1984)
LAIT DE SOURIS		
EGF	427 (8 j) 130 (22 j)	GRUETERS et al. (1985a)
NGF	32-36	GRUETERS et al. (1985b)

* Les concentrations élevées en EGF, déterminées par dosage en radio-recepteurs, sont dues à un déplacement de l'EGF par une forme de PDGF (voir texte)

IV - SIGNIFICATIONS BIOLOGIQUES DE LA PRESENCE DE FACTEURS DE CROISSANCE DANS LES LAITS DE MAMMIFERES.

Les laits de mammifères sont riches en facteurs de croissance (Tableaux I et III). La concentration de ces facteurs est plus élevée dans le lait ou le colostrum que dans le sérum (KOLDOVSKY et al.,1986) (Tableau IV). Cette observation soulève le problème de l'origine des facteurs de croissance des laits.

A - ORIGINE DES FACTEURS DE CROISSANCE DES LAITS DE MAMMIFERES

L'injection dans l'artère mammaire de Chèvre d'^{125}I-EGF provoque l'apparition d'^{125}I-EGF dans le lait 2h après le début de l'injection, sous forme libre (BROWN et al., 1986). Ceci suggère que le sang serait une source de facteur de croissance pour la glande mammaire. Chez la Souris la glande sous maxillaire secrète abondamment le NGF et l'EGF. L'ablation de cette glande ne modifie cependant pas la teneur en NGF et en EGF dans le lait (GRUETERS et al., 1985a et 1985b). GRESIK et al. (1984) publient un résultat différent: la diminution de la concentration en EGF observée par ces auteurs dans le lait après sialoadenectomie serait en fait due à un faible développement de la glande mammaire et non à une diminution de la teneur en EGF circulant.

La forte diminution au début de la lactation des concentrations en facteurs de croissance suggère un mécanisme d'accumulation au cours du développement de la glande mammaire. Chez la Femme, bien que la concentration en EGF diminue dans le lait au cours de la lactation, son taux reste constant dans les urines (GREGORY et al., 1979). La chute du taux d'EGF au cours des premiers jours de l'allaitement est accompagnée d'une augmentation de la concentration en lactose. Le lactose induirait une augmentation de la pression osmotique qui provoquerait un effet de dilution de l'EGF (BEARDMORE et al., 1983). Il y a également corrélation entre les variations de la concentration en EGF et de la concentration totale en protéines (CORPS et al., 1987) (Fig. 4, p 18).

MORAN et al. (1983) ont montré chez la Femme que la concentration en EGF dans le lait est constante au cours de la journée, alors que le volume de lait sécrété varie, suggérant soit une synthèse d'EGF corrélée avec la sécrétion de lait, soit un transport passif à travers les cellules sécrétrices.

TABLEAU IV

RAPPORT DES CONCENTRATIONS EN HORMONES OU EN FACTEURS DE CROISSANCE ENTRE LE LAIT ET LE SERUM

Hormone ou Facteur de croissance	Espèce	Concentration dans le lait/ Concentration dans le sérum
Prolactine	Vache	5-10*
GnrH	Femme	5-6
Calcitonine	Femme	20-90
cAMP, cGMP	Femme, Rat	8-20
Prostaglandines	Femme	100**
	Vache	0,5-10
Relaxine	Femme	8 et plus
Neurotensine	Femme	5-10
Somatosatine	Femme	5
	Brebis	3
Insuline	Femme	100*
EGF	Femme	100-5 000**
	Souris	50-200
PDGF	Femme	1*

* colostrum/serum

** absent dans les laits maternisés

D'aprés KOLDOVSKY et al. (1986)

La glande mammaire synthétise de l'EGF, car elle renferme des taux importants d'ARN messager codant pour le préproEGF (RALL et al., 1985). Les facteurs de croissance interviendraient dans le développement de la glande mammaire comme facteur autocrine et seraient liés à des tumeurs du sein (BANO et al., 1985). JASPAR et FRANCHIMONT (1985) ont relevé des concentrations d'EGF dans le liquide de kystes mammaires supérieures à celles trouvées dans le colostrum. La synthèse de facteurs de croissance au cours du développement de la glande mammaire contribuerait à la forte teneur en facteurs de croissance du colostrum.

Bien que l'origine des facteurs de croissance du lait ne soit pas clairement établie, il semblerait que leur passage du sang vers le lait, leur accumulation dans la glande mammaire avant la période d'allaitement et la synthèse par la glande mammaire concourent ensemble à provoquer des concentrations supérieures dans le lait que dans le sang.

B - ROLES DES FACTEURS DE CROISSANCE DES LAITS DE MAMMIFERES

De nombreux travaux portent sur l'étude des rôles des facteurs de croissance sur le développement et la maturation du tractus digestif de l'animal allaité. Le chapitre suivant résume quelques unes des études qui ont été réalisées à ce sujet.

ROLES DES FACTEURS DE CROISSANCE DANS LE DEVELOPPEMENT DU TRACTUS DIGESTIF

I - LE COLOSTRUM ET LE LAIT DANS LE DEVELOPPEMENT DU TRACTUS DIGESTIF

Les laits des diverses espèces animales, dont l'Homme, renferment des facteurs de croissance. Ceci a amené de nombreuses études sur les effets de l'allaitement sur la croissance du tractus digestif.
Il a été montré que 24 h après la naissance, l'intestin grêle d'animaux allaités est significativement plus lourd par rapport à des animaux nourris avec des laits synthétiques. Ces travaux ont été effectués chez le Lapin (HALL et WIDDOWSON, 1979), le Chien (HEIRD et al. 1984) et le Porc (WIDDOWSON et al. 1976). Chez le Rat, BERSETH et al. (1983) ont comparé l'effet du colostrum et du lait mature sur le développement du tractus digestif. Alors que dans les deux cas aucune différence dans le poids des organes n'est observée, la quantité d'ADN et l'incorporation de thymidine tritiée est supérieure chez les Rats alimentés au colostrum, au niveau de l'intestin et du pancréas, par rapport aux Rats alimentés au lait stabilisé. Ces effets pourraient être dus aux facteurs de croissance et en particulier à l'EGF.

II - LES ROLES DU FACTEUR DE CROISSANCE EPIDERMIQUE (EGF) DANS LE DEVELOPPEMENT DU TRACTUS DIGESTIF

A - LOCALISATION DE L'EGF

L'EGF est présent dans les glandes sous-maxilaires et les glandes duodénales chez l'Homme (HEITZ et al., 1978). Il est naturellement ingéré car présent dans la salive et le lait. THORNBURG et al. (1984) ont montré que l'EGF, injecté en intra-gastrique était partiellement dégradé au niveau de l'intestin: 50% de l'EGF est dégradé dans

l'intestin de Rat allaité, 30 min après l'injection. Cette dégradation est supérieure chez des Rats sevrés.

B - ROLES DE L'EGF SUR LE TRACTUS DIGESTIF DES MURIDES

L'EGF administré par injection agit sur la maturation du tractus digestif chez le foetus (CALVERT et al., 1982). Chez l'animal allaité l'EGF agit à des doses faibles sur la maturation du tractus digestif (FELDMAN et al., 1978 ; OKA et al., 1983 ; GREENE et al., 1987). A des doses plus importantes, administrées pendant un temps plus long, l'EGF agit sur le développement du tractus digestif (augmentation de l'activité mitotique de l'épithélium, augmentation du poids des organes) (MALO et MENARD, 1982 ; MAJUMDAR, 1984).

Afin de déterminer si l'EGF ingéré par le lait chez les animaux allaités provoque des effets analogues, plusieurs auteurs ont développé pour des Rats des aliments synthétiques pourvus ou dépourvus d'EGF. L'EGF aurait un effet sur le développement du tractus digestif (FALCONER, 1987 ; BERSETH, 1987 ; PUCCIO et LEHY, 1988) et sur la maturation (GREENE et al., 1987).

Chez l'animal adulte, l'effet de l'EGF serait principalement trophique. Présent dans la salive, il aurait un rôle de maintenance du tractus digestif (AL-NAFUSSI et WRIGHT, 1982 ; DEMBINSKY et al., 1982).

L'EGF agit à tous les niveaux du tractus digestif, à l'exception de l'oesophage, et son action trophique est plus marquée au niveau du colon et du rectum (SCHEVING et al., 1979 ; SCHEVING et al., 1980).

C - ROLES DE L'EGF SUR LA PROTECTION DES MUQUEUSES DIGESTIVES

L'injection d'EGF permet de diminuer de façon très significative la surface des ulcères (KONTUREK et al., 1981). Le HMGF III, facteur de croissance isolé du lait et homologue de l'EGF (SHING et KLAGSBRUN, 1984) a un effet semblable (DAI et al., 1985).

III - ETUDES IN VITRO DE L'ACTION DE DIFFERENTS MODULATEURS SUR LE TRACTUS DIGESTIF

A - LES ROLES DES DIFFERENTS ELEMENTS PROTEIQUES DU LAIT

A notre connaissance, seul l'EGF a fait l'objet d'études in vivo. Plusieurs équipes ont développé des méthodes in vitro sur des cellules intestinales. Ainsi NICHOLS et al. (1987) ont montré que la lactotransferrine provoquait, après une à quatre heures d'incubation, une augmentation de l'incorporation de thymidine tritiée dans des cellules de cryptes intestinales. Après des temps aussi brefs, l'EGF n'a par contre pas d'effet trophique décelable. CHOPRA et al., (1987), ont utilisé des cellules de colons de foetus humains pour étudier l'action de l'insuline et de l'EGF. Alors que l'insuline provoque une multiplication cellulaire, l'EGF permet le maintien de la différenciation cellulaire au cours de la culture. L'action mitogène de l'EGF sur les cellules IEC-6 (lignée établie de cellules de la muqueuse intestinale de Rat) est inhibée par la somatostatine, hormone présente dans le lait (CONTEAS et MAJUMDAR, 1987). L'insuline, l'IGF et le PDGF ont également un effet mitogène. Par contre le TGF-ß a une action inhibitrice mais provoque l'apparition d'activité sucrase et serait donc un agent de différenciation (KUROKAWA et al., 1987).Un effet chimiotactant de l'EGF a été mis en évidence sur les cellules RIE-1 (cellules de la muqueuse intestinale de Rat) (CORPS et BROWN, 1987 ; BLAY et BROWN, 1985).

B - ROLES D'ELEMENTS NON-PROTEIQUES DU LAIT

Les prostaglandines ont un effet similaire à l'EGF dans le traitement des ulcères (KONTUREK et al., 1981), ont un effet trophique (JOHANSSON et al., 1983) et inhibent la sécrétion gastrique (BEFRITS et JOHANSSON, 1985).

IV - ETUDE DE LA FIXATION DES FACTEURS DE CROISSANCE SUR LES CELLULES INTESTINALES

Chez l'Homme, les entérocytes présentent des récepteurs à l'EGF dès la 12ème semaine de gestation (POTHIER et MENARD, 1988). Chez le Rat adulte, l'EGF se fixe spécifiquement sur les cellules épithéliales des villosités, des cryptes et sur les cellules à mucus (CHABOT et al., 1987).

L'insuline se fixe spécifiquement sur les entérocytes des villosités, particulièrement au niveau de la membrane basolatérale (GALLO-PAYET et HUGON, 1984).

La lactotransferrine, molécule découverte pour la première fois dans le lait de Femme (MONTREUIL et al., 1960) n'est que partiellement dégradée au cours de la digestion: SPIK et al. (1982) ont montré que les selles des nourrissons alimentés au lait de Femme renferment de la lactotransferrine non-hydrolysée. De ce fait, elle pourrait se fixer sur son récepteur spécifique qui a été mis en évidence sur la bordure en brosse d'entérocytes (MAZURIER et al., 1985; HU et al., 1988).

V - CONCLUSIONS

L'EGF est un stimulateur de la croissance pour de nombreux tissus et types cellulaires. Présent dans le lait et apporté à différents niveaux le long du tractus digestif, il agirait différentiellement sur le développement et la maturation du tractus digestif.

L'étude de l'action des autres facteurs de croissance du lait n'a été qu'abordée. Pourtant il a été montré que l'EGF n'est pas le seul facteur de croissance du lait ayant une action sur le développement et la maturation de la muqueuse intestinale.

LE SYSTEME CYCLOPHILINE - CICLOSPORINE A

La mise en évidence, au cours de nos travaux, d'un facteur de croissance analogue à la cyclophiline qui, à notre connaissance, n'a jamais été décrit par ailleurs, nous amène à faire le point sur les connaissances actuelles concernant le système cyclophiline - cyclosoprine A.

I - LA CICLOSPORINE A

A - STRUCTURE

La ciclosporine A est un polypeptide cyclique neutre et hydrophobe de 11 acides aminés (dont un nouvel acide aminé à 9 atomes de carbone : le N-méthyl-(4R)-4-((E)-2-butenyl)-4-méthyl-L-thréonine (MeBmt) (Fig. 5), produit par Trichoderma polysporum (BOREL, 1976).

B - UTILISATIONS CLINIQUES

La ciclosporine A est immunosuppresseur, antiparasitaire, antifongique et anti-inflammatoire (BOREL et al., 1976).Elle est utilisée lors des greffes d'organes pour éviter le rejet, ainsi que dans le traitement des maladies autoimmunes (les rhumatismes, le diabète sucré). Cependant, les effets secondaires (néphrotoxicité, hépatotoxicité, troubles du système nerveux central) en limitent son utilisation.

C - EFFETS CELLULAIRES

Le pouvoir immunosuppresseur de la ciclosporine A s'exercerait par l'inhibition de l'activation des lymphocytes T. Ainsi, la ciclosporine A inhibe la production d'Interleukine 2 par les lymphocytes T au niveau de la transcription de l'ARNm (ELLIOT et al., 1984), inhibe la production

ou la sécrétion de l'Interféron-Γ, de l'Interleukine 3 et de l'Interleukine 4 (KALMAN et KLIMPEL, 1983 ; REEM et al., 1983 ; MURAGUSHI et al., 1983 ; ABBUD-FILHO et al., 1984). La sensibilité des lymphocytes T "helper-inducer" à l'Interleukine 1 diminue (BUNJES et al., 1981; ANDRUS et LAFFERTY, 1982). La ciclosporine A empêche l'expression des récepteurs de l'Interleukine 2 par les lymphocytes T cytosoliques précurseurs (PALACIOS et MOLLER, 1981). La ciclosporine A empêche plus généralement la différenciation et la prolifération des lymphocytes B et T effecteurs (PALACIOS, 1982; BUNJES et al., 1981; HESS et al., 1980; MINGARI et al., 1984) et des macrophages (THOMSON et al., 1983), par altération de l'action des lymphokines (Fig.6).

La ciclosporine A a peu d'effet sur l'activation et la prolifération des lymphocytes T suppresseurs (HESS et al., 1981) ainsi que sur la sensibilité des lymphocytes T primitifs à l'Interleukine 2 (HESS et al., 1982).

Par contre, la ciclosporine A stimule la sécrétion de rénine (BAXTER et al., 1984) et de prolactine (CARDON et al., 1984) mais inhibe l'induction de l'ornithine décarboxylase par la prolactine (RUSSELL et al., 1984).

La ciclosporine A agit donc à la fois sur la production, la sécrétion et sur l'expression des récepteurs des facteurs de croissance intervenant dans la réponse immunitaire, mais de manières diverses suivant le type cellulaire et le degré de différenciation.

D - MECANISME D'ACTION

Certains auteurs ont émis l'hypothèse suivant laquelle la ciclosporine A se fixerait sur des récepteurs membranaires spécifiques (RYFFEL et al., 1982). Selon d'autres auteurs (LEGRUE et al., 1983) la ciclosporine A diffuserait passivement à travers la membrane et se fixerait sur des protéines cytosoliques. En utilisant un dérivé photoactivable de la ciclosporine, ZIEGLER et al. (1986) ont montré que la ciclosporine se fixerait sur un ensemble de protéines dont les masses moléculaires seraient comprises entre 20 000 et 200 000. COLOMBANI et al.(1985) ont montré que la calmoduline fixe la ciclosporine A avec une constante de dissociation de 10^{-6} à 10^{-7} M. Cependant, la fixation de la ciclosporine sur la calmoduline n'inhibe pas la fonction de transport du calcium.

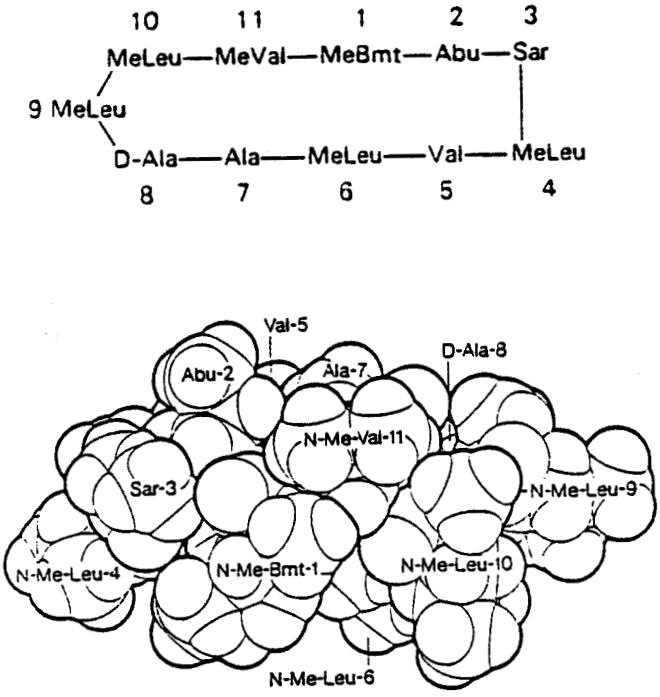

Figure 5 : Structure primaire et modèle moléculaire de la ciclosporine A.N-Me-Bmt-1:N-methyle-(4r)-4-[(E)-2-butenyle]-4-methyle-L-thréonine; Abu : acide a-aminobutirique; sar : sarcosine. D'après QUESNIAUX et al., 1987.

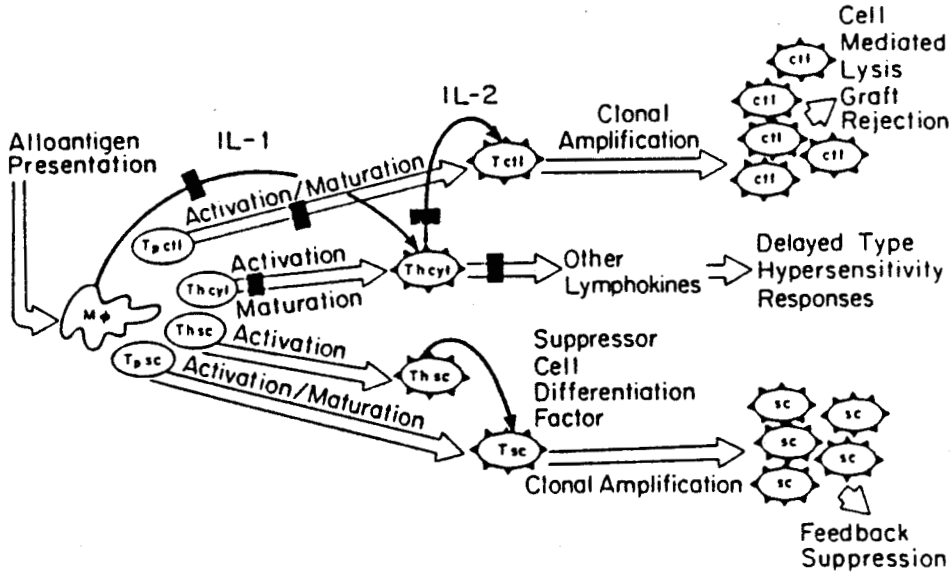

Figure 6 : Illustration schématique des effets de la cicolsporine A sur les cellules immunitaires. Mf : macrophage; Tctl : lymphocyte T cytotoxique; Tsc lymphocyte T suppresseur; Thcyt : lymphocyte T "helper-inducteur" pour les cellules T cytotoxiques; Thsc : lymphocyte T "helper" suppresseur inducteur; IL-1 : interleukine 1; IL-2 : interleukine 2; p : précurseur; les rectangles noirs indiquent les événements inhibés par la ciclosporine A. D'après HESS et COLOMBANI, 1986.

MERKER et al.,(1983) puis HANDSCHUMACHER et al.,(1984) ont mis en évidence puis purifié une protéine cytosolique dénommée cyclophiline fixant la ciclosporine avec une constante de dissociation de 0,05 - 2 10^{-7} M, qui semblerait être le récepteur spécifique de la ciclosporine A.

II - LA CYCLOPHILINE

La cyclophiline a été isolée en premier lieu à partir de thymocytes bovins (HANDSCHUMACHER et al., 1984), puis de rate humaine (HARDING et al., 1986). Des études immunochimiques ont montré que la cyclophiline est ubiquitaire (KOLETSKY et al., 1986). La cyclophiline représente de 0,1 à 0,4% des protéines cytosoliques (HARDING et al.,1986).

A - PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES

La masse moléculaire apparente en gel de polyacrylamide est de 15.000, et le point isoélectrique de 6,8 et 8,6 (il existe deux variants).

La capacité de fixation de la ciclosporine disparaît après incubation pendant 10 min à 56°C, ou à pH 4 à 25°C, ou à pH 9,5. Par contre, l'activité est conservée après incubation en présence de dithiothréitol (HANDSCHUMACHER et al., 1984).

B - STRUCTURE DE LA CYCLOPHILINE

HARDING et al., (1986) ont déterminé la séquence complète de la cyclophiline isolée de thymus bovin. La cyclophiline bovine est un polypeptide de 163 acides aminés, monocaténaire, de masse moléculaire 17 737. La séquence des 72 acides aminés NH_2- terminaux de la cyclophiline humaine est identique à celle de la cyclophiline bovine.

La séquence nucléotidique de l'ADNc dérivé de l'ARNm codant pour la cyclophiline a été déterminée chez l'Homme (HAELDLER et al., 1987) (Fig. 7) et chez le Rat (DANIELSON et al., 1988). Les séquences peptidiques déduites montrent que les séquences des cyclophilines humaine, bovine et de Rat sont quasiment identiques. Ces séquences ne présentent ni de séquence signal, ni de terminaison hydrophobe.

```
           1                  15                  30
GTGTACTATT AGCC AT    C
                 G GTT AAC CCC ACC GTG TTC TTC GAC ATT GCC GTC GAC GGC
                MET Val Asn Pro Thr Val Phe Phe Asp Ile Ala Val Asp Gly

  45                  60                  75                  90
GAG CCC TTG GGC CGC GTC TCC TTT GAG CTG TTT GCA GAC AAG GTC CCA AAG ACA
Glu Pro Leu Gly Arg Val Ser Phe Glu Leu Phe Ala Asp Lys Val Pro Lys Thr

        105                 120                 135                 150
GCA GAA AAT TTT CGT GCT CTG AGC ACT GGA GAG AAA GGA TTT GGT TAT AAG GGT
Ala Glu Asn Phe Arg Ala Leu Ser Thr Gly Glu Lys Gly Phe Gly Tyr Lys Gly

                165                 180                 195
TCC TGC TTT CAC AGA ATT ATT CCA GGG TTT ATG TGT CAG GGT GGT GAC TTC ACA
Ser Cys Phe His Arg Ile Ile Pro Gly Phe MET Cys Gln Gly Gly Asp Phe Thr

    210                 225                 240                 255
CGC CAT AAT GGC ACT GGT GGC AAG TCC ATC TAT GGG GAG AAA TTT GAA GAT GAG
Arg His Asn Gly Thr Gly Gly Lys Ser Ile Tyr Gly Glu Lys Phe Glu Asp Glu

            270                 285                 300
AAC TTC ATC CTA AAG CAT ACG GGT CCT GGC ATC TTG TCC ATG GCA AAT GCT GGA
Asn Phe Ile Leu Lys His Thr Gly Pro Gly Ile Leu Ser MET Ala Asn Ala Gly

315                 330                 345                 360
CCC AAC ACA AAT GGT TCC CAG TTT TTC ATC TGC ACT GCC AAG ACT GAG TGG TTG
Pro Asn Thr Asn Gly Ser Gln Phe Phe Ile Cys Thr Ala Lys Thr Glu Trp Leu

        375                 390                 405                 420
GAT GGC AAG CAT GTG GTG TTT GGC AAA GTG AAA GAA GGC ATG AAT ATT GTG GAG
Asp Gly Lys His Val Val Phe Gly Lys Val Lys Glu Gly MET Asn Ile Val Glu

                435                 450                 465
GCC ATG GAG CGC TTT GGG TCC AGG AAT GGC AAG ACC AGC AAG AAG ATC ACC ATT
Ala MET Glu Arg Phe Gly Ser Arg Asn Gly Lys Thr Ser Lys Lys Ile Thr Ile

    480                 495             508         518         528
GCT GAC TGT GGA CAA CTC GAA TAA GTTTGACTTG TGTTTTATCT TAACCACCAG
Ala Asp Cys Gly Gln Leu Glu

       538         548         558         568         578         588
ATCATTCCTT CTGTAGCTCA GGAGAGCACC CCTCCACCCC ATTTGCTCGC AGTATCCTAG


       598         608         618         628         638         648
AATCTTTGTG CTCTCGCTGC AGTTCCCTTT GGGTTCCATG TTTTCCTTGT TCCCTCCCAT


       658         668         678         688         698           708
GCCTAGCTGG ATTGCAGAGT TAAGTTTATG ATTATGAAAT AAAAACTAAA TAA CAA TTGT C
```

Figure 7 : Séquence nucléotidique et séquence peptidique déduite d'un cDNA codant pour la cyclophiline humaine. (d'après HAENDLER et al.,1987)

Des analyses en "Northern blot" ont montré, chez le Rat la présence d'ARNm codant pour la cyclophiline dans le cerveau, le foie, le poumon, la rate, le thymus, la glande pituitaire antérieure, les glandes adrénaliennes, les ovaires et les testicules (DANIELSON et al., 1988).

L'ARNm de la cyclophiline a également été mis en évidence dans le cerveau et le foie de Souris (FORSS-PETTER et al., 1986) et dans des lignées cellulaires (STAEHELI et al., 1986 ; MCKINNON et al., 1987). Par contre Escherichia coli en serait dépourvu.

Des analyses en "Southern blot" de l'ADN de Rat (DANIELSON et al., 1988), et de l'ADN humain (HAENDLER et al., 1987) ont montré que le génome contient environ 20 copies du gène ou de pseudo-gènes de la cyclophiline.

III - L'INTERACTION CYCLOPHILINE - CICLOSPORINE A

A - SITES DE FIXATION

Les études en Résonance Magnétique Nucléaire du proton à 490 MHz de la cyclophiline bovine ont montré une région hydrophobe constituée de 11 acides aminés aromatiques sur les 22 que compte la molécule: le résidu de tryptophane en position 120, 2 résidus d'histidine, un résidu de tyrosine, et 7 résidus de phénylalanine (DALGARNO et al., 1986). Cette région constituerait le site de fixation de la ciclosporine A.

La fixation de la ciclosporine A sur la cyclophiline augmente la fluorescence intrinsèque du tryptophane, indiquant qu'il se trouve dans un environnement plus hydrophobe. Ce test de fluorescence a permis d'estimer à 2.10^{-7} la constante de dissociation du complexe ciclosporine A - cyclophiline (HANDSCHUMACHER et al., 1984). Chaque molécule de cyclophiline est capable de fixer une seule molécule de ciclosporine A (HARDING et al., 1986).

La cyclophiline interagit préférentiellement avec les résidus 1, 2, 10 et 11 de la ciclosporine A (Fig. 5) (QUESNIAUX et al., 1987).

B - SPECIFICITE DE L'INTERACTION CYCLOPHILINE - CICLOSPORINE A

La quantité de ciclosporine A accumulée dans les lymphocytes de patients, traités à raison de 0,05-0,2 µg/ml de plasma, est en accord

avec la quantité de cyclophiline cytoplasmique et la constante de dissociation cyclosporine-cyclophiline. La cyclophiline constituerait donc, dans la cellule, le principal accepteur de la ciclosporine A (HARDING et al., 1986).

HANDSCHUMACHER et al., (1984) ont testé l'affinité de 10 dérivés de la ciclosporine A pour la cyclophiline ainsi que leur activité immunosuppressive sur des lymphocytes, et ont montré qu'il y a une relation directe entre l'affinité et l'activité immunosuppressive.

Alors qu'il a été suggéré que la calmoduline pourrait être le récepteur de la ciclosporine A (COLOMBANI et al., 1985), il n'y a pas de relation entre l'affinité de différents dérivés de la ciclosporine pour la calmoduline et leur activité immunosuppressive (QUESNIAUX et al., 1988).

IV - CONCLUSIONS

La cyclophiline serait le récepteur spécifique cytosolique de la ciclosporine. La caractérisation de l'activité de la cyclophiline permettra de mieux connaître le mécanisme d'action des facteurs de croissance intervenant tant au niveau de l'activation des lymphocytes T qu'au niveau de l'ensemble des cellules de l'organisme.

De plus, l'effet différentiel de la ciclosporine A entre la production d'Interleukine 2, l'expression des récepteurs de l'Interleukine 2 sur les lymphocytes T d'une part, et son incapacité de bloquer la différenciation des lymphocytes T activés d'autre part, implique que soit la cyclophiline soit les facteurs de croissance ont des rôles différents suivant le type ou l'état de différenciation de la cellule cible.

La fixation de la ciclosporine sur la cyclophiline permettrait ou empêcherait la fixation de la cyclophiline sur un ligand non encore déterminé.

Le fait que certains auteurs aient mis en évidence une fixation spécifique de la ciclosporine sur la membrane cellulaire pourrait s'expliquer par la présence d'une forme circulante homologue de la cyclophiline et affine pour la ciclosporine. Il est tout à fait plausible que de telles formes existent puisqu'il a été montré que le

génome humain renferme une vingtaine de copies du gène ou de pseudogènes codant pour la cyclophiline ou une protéine homologue.

HARDING et al. (1986) ont émis l'hypothèse que le rôle fonctionnel de la cyclophiline mettrait en jeu un signal de transduction, débouchant sur l'induction coordonnée de gènes spécifiques, essentiel pour l'activation et la prolifération des lymphocytes T.

La distribution ubiquitaire de la cyclophiline dans les différents tissus et sa très grande distribution philogénique suggèrent qu'elle joue un rôle essentiel dans la réponse cellulaire à différents stimuli induisant la différenciation ou la prolifération cellulaire.

TRAVAUX PERSONNELS

ETUDE DES ACTIVITES MITOGENES DU COLOSTRUM ET DU LAIT DE FEMME

I - INTRODUCTION

Le tamisage moléculaire du lactosérum sur colonne de Sephadex G-100 a permis a SHING et KLAGSBRUN (1984) de mettre en évidence trois fractions mitogènes de masses moléculaires 100-120 000, 30-35 000,et 5 6 000, dénommées respectivement HMGF I, HMGF II et HMGF III. Cette dernière fraction représente 75% de l'activité mitogène totale, et renfermerait essentiellement de l'EGF.

A notre connaissance, aucune étude portant sur la répartition des activités mitogènes du colostrum par tamisage moléculaire n'a été décrite. Or le colostrum a une activité mitogène spécifique supérieure à celle du lait stabilisé, en partie due à la concentration plus élevée en EGF dans le colostrum (SHING et KLAGSBRUN, 1984; CORPS et al., 1987).

Afin de déterminer si la différence entre les activités mitogènes du colostrum et du lait stabilisé est uniquement quantitative, ou également qualitative, nous avons établi d'une manière comparative les profils chromatographiques du lactosérum et du colostrosérum obtenus après tamisage moléculaire sur une colonne de Sephadex G-75.

II - MATERIELS ET METHODES

A - LE LAIT ET LE COLOSTRUM DE FEMME

Le lait de Femme provient du lactarium régional, Institut Pasteur, Lille. Il est conservé à -20°C avant emploi.

Le colostrum de Femme est recueilli entre le premier et le troisième jour après l'accouchement

Chacun des lots fractionné est constitué par le mélange des colostrums et des laits de dix mères au moins.

B - PREPARATION DU LACTOSERUM

Le lait est décongelé à 4°C, délipidé par centrifugation à 30 000 x g à 4°C pendant 30 minutes dans une centrifugeuse J2-21 (Beckman). Les lipides et les débris cellulaires sont éliminés. Le lait délipidé est amené à pH 4,6 par ajout de HCl concentré, puis dialysé contre de l'eau. Les protéines précipitées (caséine) sont éliminées après centrifugation à 30 000 x g.

C - FRACTIONNEMENT DU LACTOSERUM ET DU COLOSTROSERUM PAR TAMISAGE MOLECULAIRE

500 ml de lactosérum ou 300 ml de colostrosérum sont lyophilisés, puis resuspendus dans 50 ml de NH_4HCO_3 et déposés sur une colonne de tamisage moléculaire de Sephadex G-75 Superfine (Pharmacia) (3,5 x 100 cm) équilibrée dans du NH_4HCO_3 0,1 M. La chromatographie est effectuée a un débit de 10 ml/h avec le tampon d'équilibrage comme éluent. La densité optique est déterminée en continu à 280 nm. Des fractions de 8 ml sont recueillies.

Chaque fraction est dialysée séparément contre de l'eau et lyophilisée.

La colonne de tamisage moléculaire est étalonnée par la chromatographie de lactotransferrine, d'albumine sérique bovine et d' α-lactalbumine.

D - MESURE DE L'ACTIVITE MITOGENE

1- Cultures cellulaires

Les cellules de la lignée CCL 39 (fibroblastes de poumon de Hamster chinois) sont repiquées au 1/10ème deux fois par semaine dans du milieu MEM (sels de Earle) (Gibco) contenant 10% de sérum de Veau foetal (Gibco), 0,4% de pénicilline, 0,4% de streptomycine et 0,5% de fungizone. Les cultures sont incubées à 37°C dans une atmosphère à 5% de

CO_2. Tous les deux mois, des cellules sont décongelées et mises en culture.

2- Mesure de la synthèse d'ADN

L'incorporation de méthyl-thymidine tritiée est quantifiée selon la méthode décrite par PLOUET et al., (1984) avec quelques modifications. Les cellules sont ensemencées dans des plaques de 24 puits (Limbro, Flow laboratories) à raison de 40 000 cellules dans 0,5 ml de milieu de culture par puits. Après 72 heures d'incubation les cellules sont lavées avec le milieu de culture dépourvu de sérum de Veau, puis incubées dans ce milieu pendant 20 heures. Les cellules sont alors à confluence dans une phase d'arrêt de croissance. Les fractions à tester sont inoculées à raison de 20 µg/ml de milieu de culture. Chaque fraction est testée en triple. Les plaques sont incubées pendant 24 heures. 1µCi de méthyl-thymidine tritiée (Amersham) dans 10 µl de PBS est ajoutée. Après 4 heures d'incubation, l'incorporation de thymidine est stoppée par lavage des cellules par du PBS. Les cellules sont fixées par 0,5 ml d'acide trichloroacétique à 5% pendant 30 minutes, lavées à l'eau courante puis lysées par 0,5 ml de soude 0,1 M pendant 2 heures à 37°C. 0,45 ml du lysat est placée dans une fiole à scintillation, 3 ml de liquide scintillant (Aqualite, Baker) sont rajoutées. La radioactivité est mesurée avec un compteur de radioactivité ß (Beckman).

III - RESULTATS

A - PROFIL CHROMATOGRAPHIQUE DU COLOSTROSERUM PAR TAMISAGE MOLECULAIRE

Le fractionnement par tamisage moléculaire sur colonne de Sephadex G-75 du colostrum permet d'obtenir trois pics majeurs ayant une activité de facteur de croissance: dans les fractions contenant des protéines de masses moléculaires comprises entre 60 000 et 75 000, entre 9 000 et 14 000 et entre 4 000 et 6 000, ainsi qu'un pic mineur contenant des protéines de masses moléculaires comprises entre 30 000 et 40 000 (Fig. 8A).

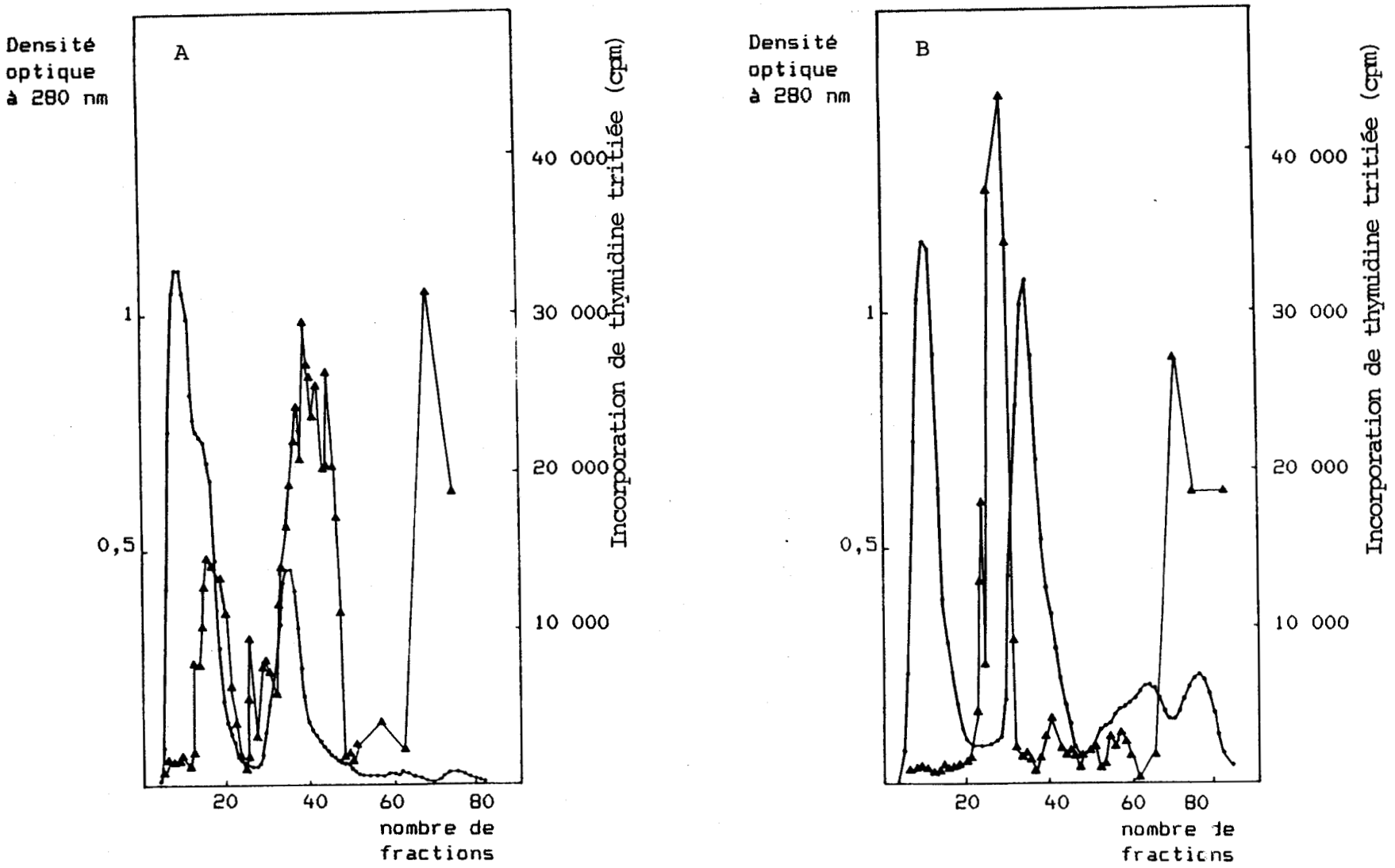

Figure 8: chromatographie de colostrosérum (A) et de lactosérum de Femme (B) :le lyophilisat de 300 ml de colostrosérum ou de 500 ml de lactosérum sont sont suspendus dans 50 ml de NH_4HCO_3 0,1 M et déposés sur une colonne de Sephadex G-75 (3,5 x 100 cm) équilibrée dans le tampon de l'échantillon. Des fractions (8 ml) sont collectés et leur activité mitogène testée à raison de 20 µg/ml de milieu de culture.
(●) densité optique; (▲) incorporation de méthyl-thymidine tritiée

B - PROFIL CHROMATOGRAPHIQUE DU LACTOSERUM PAR TAMISAGE MOLECULAIRE

Le fractionnement par tamisage moléculaire sur colonne de Sephadex G-75 du lactosérum permet d'obtenir deux fractions majeures ayant une activité de facteur de croissance, l'une contenant des protéines de masses moléculaires comprises entre 30 000 et 50 000, l'autre contenant des protéines de masses moléculaires comprises entre 4 000 et 6 000. Une fraction, contenant des protéines de masses moléculaires comprises entre 9 000 et 14 000 possède une faible activité mitogène (Fig. 8B).

C - DISCUSSION

Le tamisage moléculaire du lactosérum et du colostrosérum sur colonne de Sephadex G-75 permet de mettre en évidence quatre fractions mitogènes:

- Une fraction contenant des protéines de masses moléculaires comprises entre 60 000 et 75 000, présente uniquement dans le colostrosérum. Cette fraction pourrait renfermer le MDGF I, facteur de croissance isolé du lait de Femme par BANO et al. (1985), de masse moléculaire 62 000.

- Une fraction contenant des protéines de masses moléculaires comprises entre 30 000 et 40 000, partiellement résolue en deux pics. Faiblement représentée dans le colostrosérum, elle est très abondante dans le lactosérum. Son activité est partiellement résistante à l'ébullition pendant 15 minutes, et pourrait contenir du PDGF. Cette fraction correspond au MDGF II décrit par SHING et KLAGSBRUN (1984) dans le lait de Femme.

- Une fraction contenant des protéines de masses moléculaires comprises entre 9 000 et 14 000, très abondante dans le colostrosérum, faiblement représentée dans le lactosérum.

- Une fraction contenant des protéines de masses moléculaires comprises entre 4 000 et 6 000, très abondante dans le colostrosérum et dans le lactosérum. Cette fraction correspond au HMGF III décrit par SHING et KLAGSBRUN (1984) et contiendrait essentiellement de l'EGF.

Le profil chromatographique obtenu avec le lactosérum est similaire à celui décrit par SHING et KLAGSBRUN (1984), avec quelques différences: absence de HMGF I, facteur de croissance de masse moléculaire comprise

entre 100.000 et 120.000, et abondance de HMGF II. Ces différences pourraient s'expliquer par la méthode utilisée pour déterminer les activités mitogènes: nous avons déterminé l'activité mitogène à concentration en protéines constante, alors que ces auteurs l'ont déterminée à volume constant. Il en résulte par notre méthode une diminution de la réponse mitogène pour les fractions fortement concentrées en protéines (cas du HMGF I) et une augmentation pour les fractions faiblement concentrées en protéines (cas du HMGF II).

A l'exception de la fraction contenant des protéines de masses moléculaires comprises entre 60 000 et 75 000, toutes les fractions mitogènes du colostrosérum sont présentes dans le lactosérum, mais en proportions différentes.

Les activités mitogènes entre le colostrum et le lait stabilisé présentent donc des différences non seulement quantitatives, mais également qualitatives.

IV - CONCLUSION

Si la chromatographie de tamisage moléculaire permet d'obtenir plusieurs fractions mitogènes, cette technique est inadaptée comme technique préparative de fractionnement du lactosérum total. Nous nous sommes donc orienté vers des techniques semi-préparatives fondées sur l'affinité ou sur l'échange d'ions.

D'autre part, la faible quantité de colostrum disponible ne nous a pas permis d'entreprendre, malgré son grand intérêt, la purification des facteurs de croissance à partir de cette source.

FRACTIONNEMENT DU LACTOSERUM PAR CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE SUR COLONNE D'HEPARINE IMMOBILISEE

I - INTRODUCTION

La chromatographie du lactosérum sur colonne d'héparine immobilisée permet de purifier la lactotransferrine (BLACKBERG et HERNELL, 1980), de fractionner le lactosérum en sIgA, lysozyme et lactotransferrine (BOESMAN-FINKELSTEIN et FINKELSTEIN, 1982; WANG et KLOER, 1984). Les sIgA ne sont pas retenues sur la colonne, le lysozyme est élué à une concentration de 0,3 M en NaCl et la lactotransferrine de 0,7 M en NaCl.

La chromatographie d'affinité sur colonne d'héparine immobilisée a été utilisée pour isoler les facteurs de croissance fibroblastiques (FGF) qui possèdent une forte affinité pour l'héparine et qui sont dénommés également "heparin-binding growth factors" (voir p. 10).

A notre connaissance, aucune étude portant sur les facteurs de croissance du lait affines pour l'héparine n'a été décrite.

Nous avons entrepris, dans un premier temps, l'étude des facteurs de croissance ayant une affinité faible pour l'héparine (molarité d'élution inférieure à 1 M en NaCl) par chromatographie du lactosérum sur colonne d'héparine immobilisée.

Dans un second temps, nous avons étudié les facteurs de croissance ayant une forte affinité pour l'héparine (molarité d'élution supérieure à 1 M). Afin d'éviter une saturation de la colonne par les protéines ayant une affinité faible, en particulier par la lactotransferrine, nous avons chromatographié du lactosérum contenant 0,8 M de NaCl.

II - MATERIELS ET METHODES

A - LE LAIT ET LE LACTOSERUM

Le lait et le lactosérum ont été obtenus comme décrit p. 42.

B - FRACTIONNEMENT DU LACTOSERUM PAR CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE SUR COLONNE D'HEPARINE IMMOBILISEE - ELUTION PAR UN GRADIENT CONTINU

200 ml de lactosérum sont déposés sur une colonne d'héparine immobilisée sur Sepharose CL-6B (Pharmacia) (2 x 20 cm) équilibrée dans un tampon Tris 10 mM, HCl, pH 7. Après l'injection, la colonne est rincée par 500 ml du même tampon et éluée par un gradient linéaire de 0 à 3 M en NaCl sur un volume total de 400 ml, à un débit de 30 ml/h. Des fractions de 15 ml sont recueillies. La densité optique est lue en continu à 280 nm.

Les fractions correspondant aux différents pics sont rassemblées, dialysées contre de l'eau pendant 48 h à 4°C et lyophilisées.

C - FRACTIONNEMENT DU LACTOSERUM PAR CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE SUR COLONNE D'HEPARINE IMMOBILISEE - ELUTION PAR UN GRADIENT DISCONTINU

1 l de lactosérum sont déposés sur une colonne d'héparine immobilisée comme décrit au paragraphe précédent. Les protéines sont éluées par passages successifs de solutions renfermant, dans le tampon Tris 10 mM, HCl, pH 7, des concentrations croissantes en NaCl de 0,25 M, 0,35 M, 0,6 M et 1 M. Chaque fraction obtenue est diluée au 1/4 par de l'eau désionisée et injectée sur la même colonne, précédemment équilibrée dans le tampon Tris 10 mM ,HCl, pH 7 contenant 0,15 M de NaCl. Les protéines sont éluées de la même manière que lors de la première chromatographie. Les fractions obtenues sont dialysées contre de l'eau pendant 48 h à 4°C puis lyophilisées.

D - FRACTIONNEMENT DU LACTOSERUM CONTENANT 0,8 M DE NaCl PAR CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE SUR COLONNE D'HEPARINE IMMOBILISEE

10 l de lactosérum auxquels on a ajouté du NaCl pour obtenir une concentration de 0,8 M, et après ajustement à pH 7, sont déposés sur une colonne d'héparine immobilisée (2 x 20 cm) précédemment équilibrée dans un tampon Tris 10 mM, HCl, pH 7 contenant 0,8 M en NaCl. La colonne est ensuite lavée par 500 ml de ce même tampon, puis éluée par des solutions en NaCl à 1 M et 3M dans le tampon Tris.

La fraction éluée par la solution de NaCl 3 M est diluée au 1/4 par de l'eau désionisée et déposée sur une colonne d'héparine immobilisée (0,8 x 1,5 cm) et éluée par passages successifs de solutions (dans le tampon Tris) en NaCl à 1,2 M, 1,5 M, 1,8 M, 2,1 M, 2,4 M, 2,7 M, et 3 M, à un débit de 0,5 ml/min.

Chaque fraction obtenue (2 ml) subit une série de concentrations -à l'aide d'un microconcentrateur de type Centricon (Amicon) (seuil de coupure: molécules de masse moléculaire d'environ 10 000)- et de dilutions par de l'eau désionisée. A chaque étape de concentration le microconcentrateur est centrifugé à 5 000 x g (centrifugeuse J2-21, rotor JA-20, Beckman) pendant une heure à 4°C. Chaque fraction est ainsi concentrée 10 fois et diluée 9 fois. Les fractions concentrées sont stockées à 4°C.

E - DETERMINATION DES ACTIVITES MITOGENES

Les activités mitogènes sont déterminées par mesure de l'incorporation de méthyl-thymidine tritiée, comme décrit p. 44. Chaque fraction est analysée en triple et à différentes concentrations en protéines, afin d'obtenir une courbe dose-réponse.

Une unité d'activité mitogène est définie comme la quantité de protéines requise pour provoquer une incorporation de méthyl-thymidine tritiée égale à la moitié de l'incorporation maximum par les cellules cibles.

Chaque série de déterminations des activités mitogènes comporte d'une part au moins trois témoins négatifs constitués par la mesure de l'incorporation de méthyl-thymidine tritiée par des cellules sur lesquelles sont inoculés 10 µl de PBS, et d'autre part la détermination

de la courbe dose-réponse d'une gamme de concentration en EGF, de 0,2 à 20 ng/ml.

F - METHODES ELECTROPHORETIQUES

1- Electrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS

Les électrophorèses sont réalisées dans un appareil vertical en plaques (1,5x140x180 mm) (BioRad) dans le système tampon préconisé par LAEMMLI (1970).

Le gel de séparation est constitué par de l'acrylamide à 15% polymérisé, dans un tampon Tris-glycocolle, HCl, pH 8,9. Le gel de concentration est à 4% en acrylamide dans un tampon Tris-glycocolle, HCl, pH 6,8. Le tampon d'électrophorèse et les gels d'acrylamide contiennent 0,1% de SDS.

Les échantillons (0,5 à 5 µg de protéines par dépôt) sont solubilisés dans 20 µl de tampon Tris-HCl, 10 mM, pH 8,9 contenant 1% de SDS et 10% de glycérol et placés au bain marie à 100°C pendant 3 min. 10µl de la solution échantillon sont déposées sur le gel d'acrylamide.

La détermination des masses moléculaires apparentes des protéines est effectuée par comparaison avec la migration de protéines étalons.

L'électrophorèse est réalisée à 100 V pendant la nuit, sous réfrigération d'eau froide. Après la migration, les protéines sont révélées soit au bleu de Coomassie, soit au nitrate d'argent.

2- Electrotransfert sur feuille de nitrocellulose (Western blotting)

Les protéines, séparées par électrophorèse en gel de polyacrylamide, sont ensuite transférées par électrophorèse (cellule de transfert BioRad) sur feuille de nitrocellulose (Schleicher et Schüll) dans le tampon Tris 25 mM, glycocolle 192 mM, pH 8,4, contenant 20% (v/v) de méthanol selon la méthode décrite par TOWBIN et al. (1979) et BURNETTE (1981). L'électrophorèse est réalisée à 200 mA, à 4°C pendant 3 h.

Après le transfert, les protéines fixées sur la nitrocellulose sont révélées par immuno-révélation.

G - METHODES IMMUNOLOGIQUES

1 - Préparation d'un immunsérum anti-lactotransferrine

L'immunsérum est obtenu par immunisation d'un Lapin par injection d'une solution de lactotransferrine à 1 p. 1 000 dans du PBS additionnée d'adjuvant de Freund dans la proportion 1/1 (v/v).

La solution antigènique est injectée par piqûre intramusculaire dans les pattes arrières d'un Lapin. Un cycle d'injections consiste en une injection par semaine pendant 1 mois. Le Lapin est saigné, une semaine après la dernière injection, par incision de la veine marginale de l'oreille.

2 - Antisérum anti-lysozyme

L'antisérum anti-lysozyme est fournis par Boehringer (Marburg, RFA) et a été préparé chez le Lapin.

3 - Immunodiffusion simple

Cette méthode fut développée par OUCHTERLONY (1949) et ELEK (1948).

Sur une plaque de verre, une solution d'Agarose à 37°C à 1% est coulée de manière à former un gel de 3 mm d'épaisseur. Après solidification des puits sont creusés en cercle, avec un puits au centre du cercle. Le puits central reçoit 10 µl d'antisérum. Les puits formant le cercle reçoivent les antigènes à analyser.

La plaque est ensuite incubée dans un humidificateur à température ambiante pendant 48 h. Lorsque les arcs de précipitation sont formés, la plaque est lavée dans du sérum physiologique, séchée sous papier Whatman, puis colorée à l'Amidoschwartz.

4- Immunorévélation après électrotransfert

Après l'électrotransfert, les protéines fixées sur la nitrocellulose sont incubées 1 min dans un tampon TBS, pH 7,8 contenant 2% de Tween 20 (Merck), puis lavées dans ce même tampon contenant 0,5% de Tween 20. Suivent 4 h d'incubation dans une solution au 1/1 000

d'anticorps anti-facteur de croissance fibroblastique basique (R&D systems, Minneapolis USA).

La nitrocellulose est ensuite lavée par du TBS contenant 0,5% de Tween 20, puis incubée 2h à 20°C avec des IgG anti-IgG de Lapin, préparées chez la Chèvre (Pasteur Productions) sur lesquels est couplée la peroxydase du radis noir, diluées au 1/2000 dans le TBS contenant 0,5% de Tween 20. Après une série de lavages dans du TBS l'activité peroxydasique est révélée par un réactif à la DAB (3,3'-diaminobenzidine tétrahydrochloride) (Fluka) : 40 mg de DAB pour 100 ml de TBS et addition d'1 ml d'eau oxygénée à 30% (p/p) (à préparer extemporanément). La nitrocellulose est immergée dans le réactif à la DAB jusqu'à apparition de bandes de couleur marron puis lavée abondamment à l'eau et conservée à l'abri de la lumière.

H - DOSAGE DES PROTEINES

Les concentrations en protéines sont déterminées par la méthode de BRADFORD (1976). 0,8 ml de la solution à doser est placé dans un tube, puis 0,2 ml de colorant concentré (Bio-Rad protein assay, Bio-Rad, RFA) sont rajoutées. Le tube est agité et après 5 min la densité optique est lue à 595 nm.

La concentration en protéines est déterminée par comparaison de la densité optique à une gamme étalon d'albumine bovine sérique allant de 1 à 25 µg/ml.

III - RESULTATS

A - CHROMATOGRAPHIE DU LACTOSERUM SUR COLONNE D'HEPARINE IMMOBILISEE - ELUTION PAR UN GRADIENT CONTINU EN NaCl

Le profil chromatographique obtenu lors du fractionnement des protéines du lactosérum sur colonne d'héparine immobilisée eest donné dans la figure 9. Deux pics d'activités mitogènes sont mis en évidence, l'un élué entre 0,2 et 0,6 M en NaCl, l'autre à une concentration en NaCl supérieure à 1 M en NaCl.

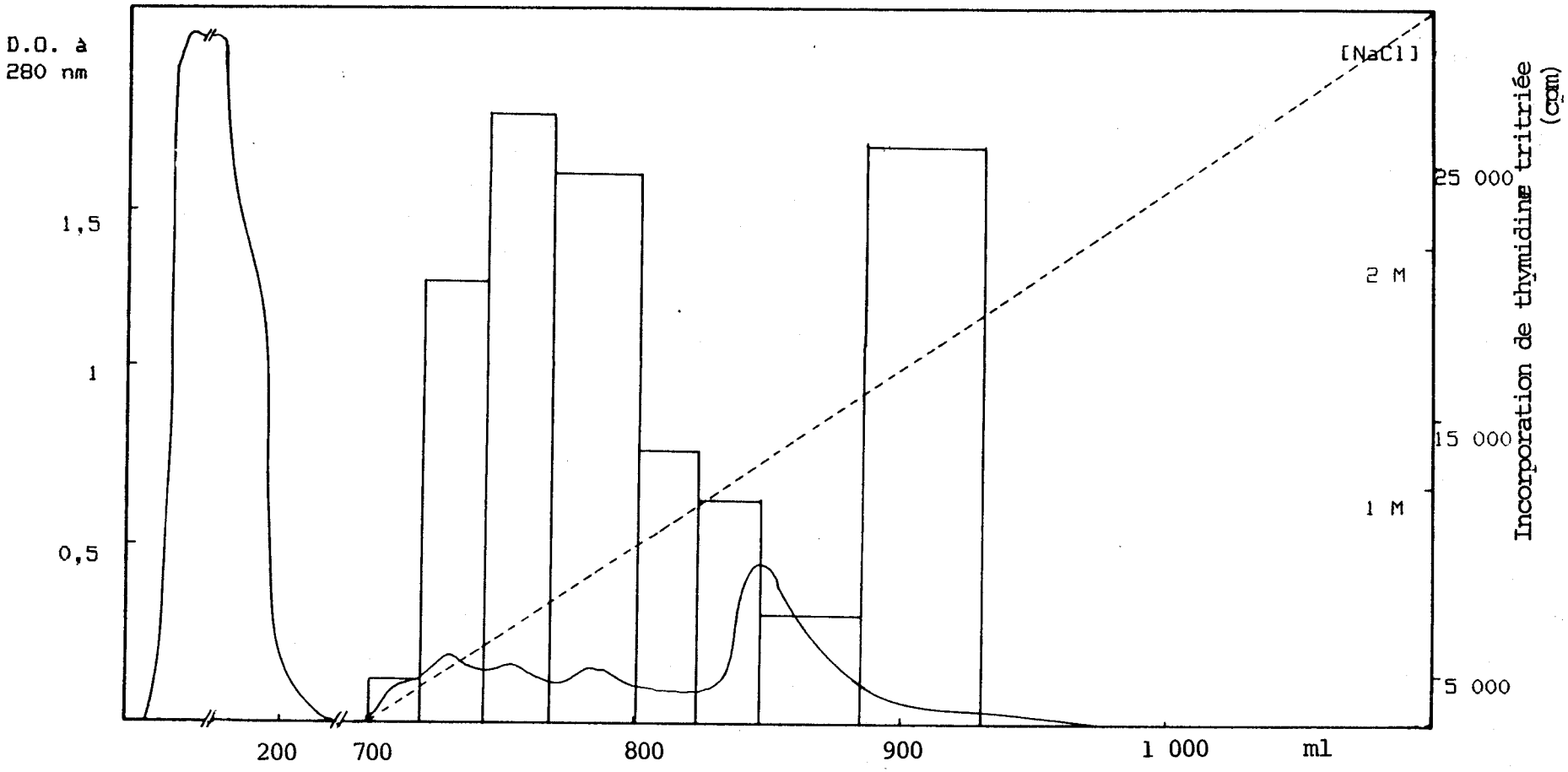

Figure 9: Chromatographie d'affinité sur colonne d'héparine immobilisée (2 x 20 cm) de 200 ml de lactosérum humain. La densité optique est lue à 280 nm (ligne continue). Le profil d'élution est réalisé par un gradient linéaire en NaCl (ligne discontinue). L'incorporation de méthyl-thymidine tritiée par les cellules CCL 39 (mesurée pour chaque pic) est représentée par des rectangles.

Cependant, afin de mieux localiser les activités mitogènes et leur molarité d'élution, nous avons procédé, dans une deuxième expérience, à l'élution par paliers des protéines retenues lors de la chromatographie.

B - CHROMATOGRAPHIE DU LACTOSERUM SUR COLONNE D'HEPARINE IMMOBILISEE - ELUTION PAR PALIERS

Ce type d'élution nous a permis d'obtenir une fraction non-retenue et 4 fractions éluées à 0,25 M, 0,35 M, 0,6 M et 1 M en NaCl (Fig.10).

1 - Analyse protéique des fractions

L'analyse en immuno-diffusion simple des fractions précédentes indique la présence de lysozyme dans la fraction éluée à 0,25 M en NaCl et de lactotransferrine dans les fractions éluées à 0,35 M, 0,6 M et 1 M en NaCl (Fig.11).

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) montre que la fraction éluée à 0,6 M en NaCl est constituée de lactotransferrine pratiquement pure (Fig.12).

2 - Détermination des activités mitogènes

Les fractions éluées à 0,25 M, 0,35 M et 1 M en NaCl se sont révélées mitogènes sur les cellules CCL-39 alors que la fraction éluée à 0,6 M en NaCl ne possède pas d'activité mitogène significative.

L'incorporation de méthyl-thymidine tritiée est fonction de la concentration en protéines (Fig.13). La moitié de l'incorporation maximale est obtenue à des concentrations en protéines de 0,7 µg/ml pour la fraction éluée à 0,25 M en NaCl, de 1 µg/ml pour la fraction éluée à 0,35 M en NaCl et de 3 µg/ml pour la fraction éluée à 1 M en NaCl. 12,2% des protéines et 18,4% des activités mitogènes du lactosérum sont retenues sur la colonne.

La fraction éluée à 0,25 M en NaCl renferme 87% de l'activité mitogène retenue sur la colonne (16,1% de l'activité totale du lactosérum). La fraction éluée à 0,35 M en NaCl renferme 1,5 % de l'activité mitogène totale du lactosérum. La fraction éluée à 1 M en NaCl ne renferme que 0,8% de l'activité mitogène du lactosérum (Tableau V).

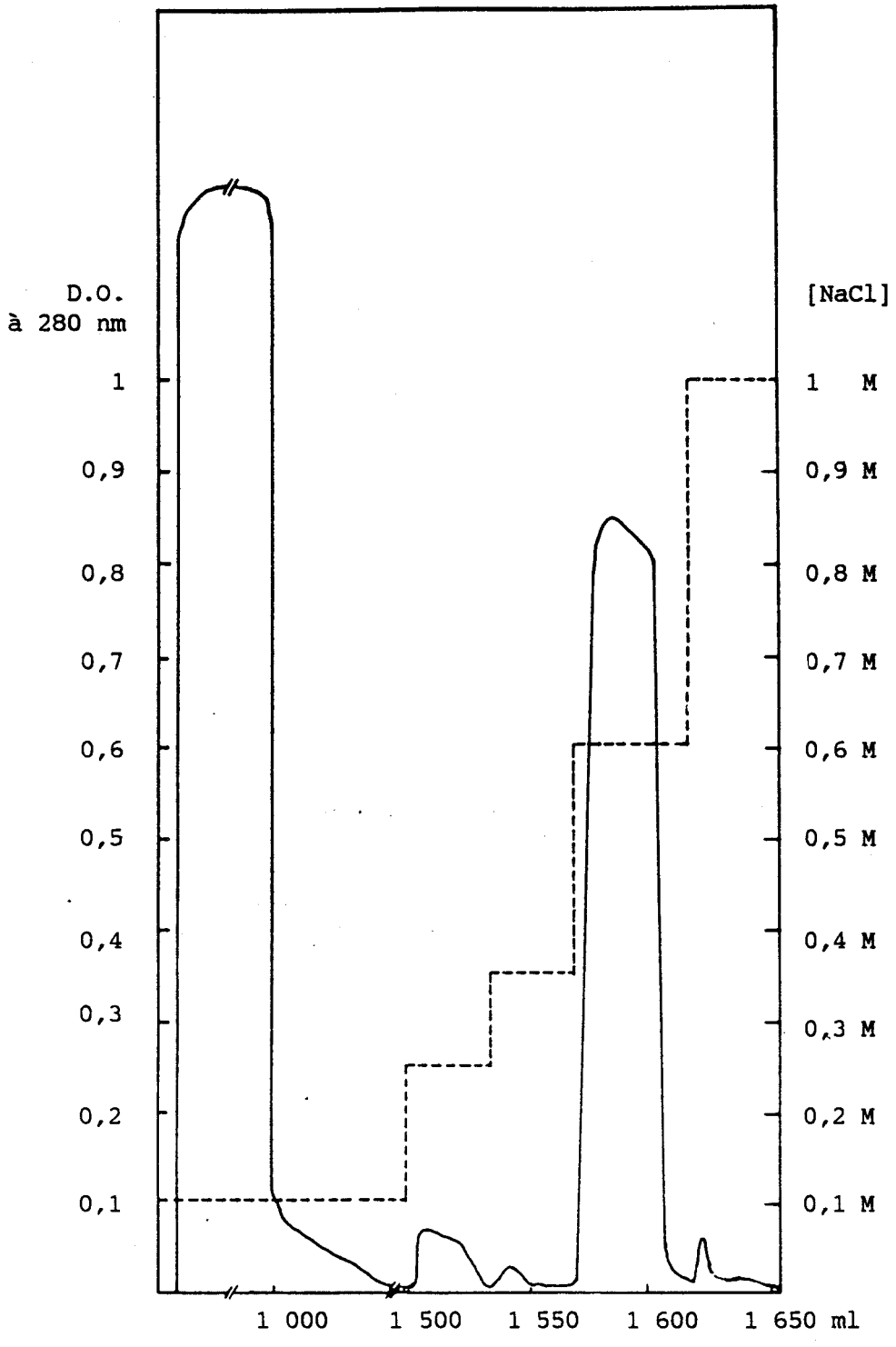

Figure 10: Chromatographie d'affinité sur colonne d'héparine immobilisée (^{2} x 20 cm) de 1 000 ml de lactosérum humain. La densité optique est lue à 280 nm (ligne continue). Le profil d'élution est réalisé par un gradient continu en NaCl (ligne pointillée). Chaque fraction correspondant aux différentes concentrations en NaCl sont diluées au 1/4 par de l'eau désionisée et rechromatographiées séparément sur la même colonne, dialysées et lyophilisées.

Tableau V

Les activités de facteur de croissance des fractions obtenues par chromatographie d'affinité sur colonne d'héparine immobilisée de 1 l de lactosérum

Etape	Protéines totales (mg)	Activité spécifique* (Unités/mg)	Activité totale* (Unités)	% d'activité récupérée
Lactosérum	10 000	13	130 000	100
Fraction éluée à 0,25 M NaCl	15	1 400	21 000	16,1
Fraction éluée à 0,35 M NaCl	2	1 000	2 000	1,5
Fraction éluée à 0,6 M NaCl	1 200	< 10	-	-
Fraction éluée à 1 M NaCl	3	330	1 000	0,8

* Une unité est définie comme la concentration (en mg/ml) en protéines qui provoque une incorporation de méthyl-thymidine tritiée égale à la moitié de l'incorporation maximum par les cellules cibles.

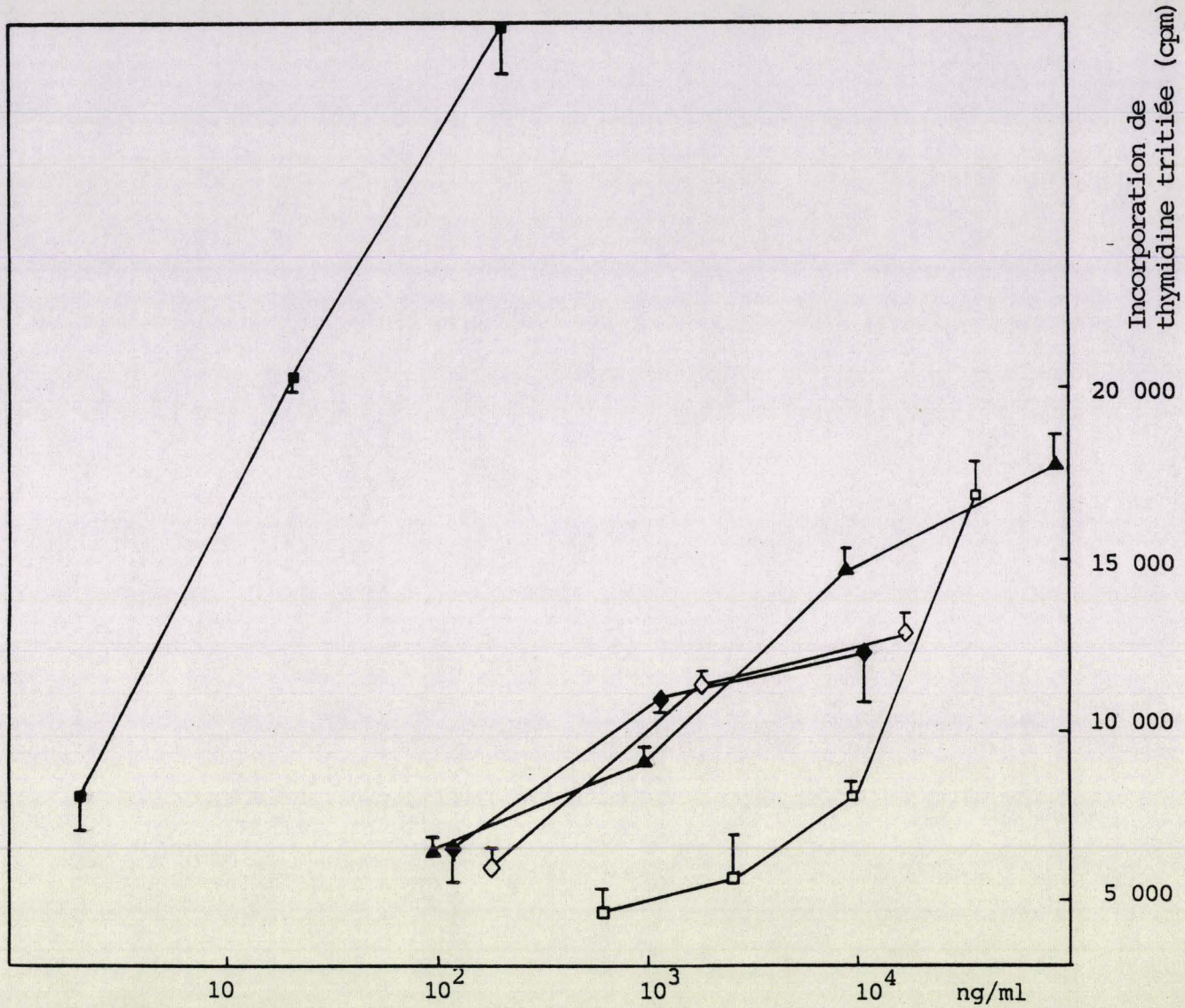

Figure 13: Courbes dose réponse obtenues par mesure de l'incorporation de méthyl-thymidine tritiée sur les cellules CCL 39 stimulées par: de l'EGF (■), du lactosérum (□), les fractions éluées à 0,25 M en NaCl (◆), 0,35 M en NaCl (◇) et 1 M en NaCl (▲).

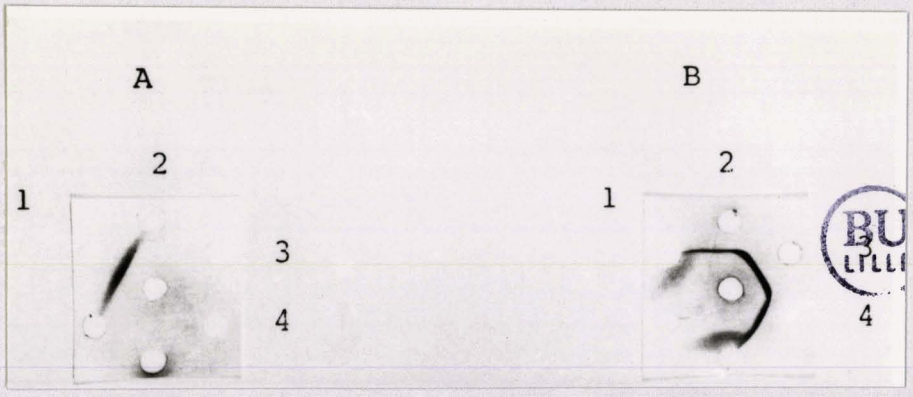

Figure 11 : Immunodiffusion radiale contre un immunsérum anti-lysozyme (A) et anti-lactotransferrine (B) des fractions obtenues par chromatographie d'affinité sur colonne d'héparine immobilisée de lactosérum. 1 à 4 : fractions éluées respectivement à 0,25 M, 0,35 M, 0,6 M et 1 M en NaCl.

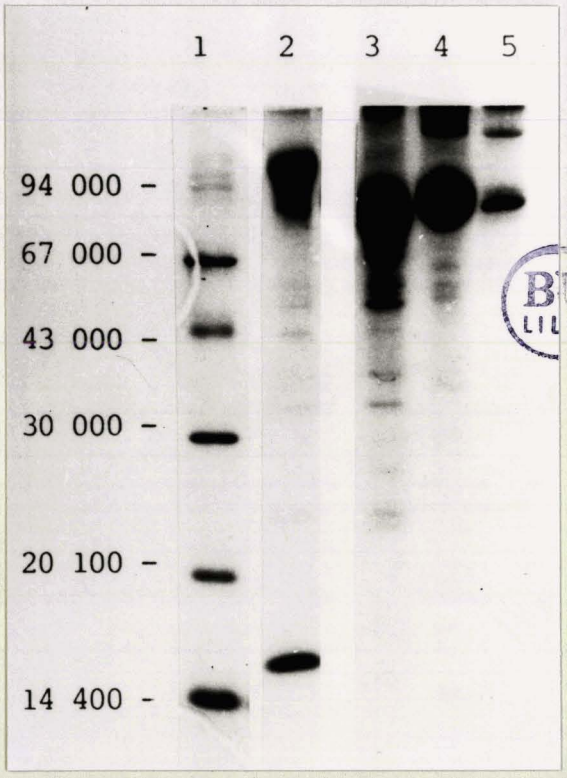

Figure 12 : Electrophorèse en gel à 15 % de polyacrylamide. Coloration au bleu de Coomassie. Bande 1 : témoins de masse moléculaire; bandes 2 à 5 : fractions de lactosérum éluées respectivement à 0,25 M, 0,35 M, 0,6 M et 1 M en NaCl sur colonne d'héparine immobilisée.

C - CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE D'HEPARINE IMMOBILISEE DU LACTOSERUM CONTENANT 0,8 M DE NaCl

Le fractionnement du lactosérum enrichi à 0,8 M en NaCl sur colonne d'héparine immobilisée nous a permis d'obtenir une fraction mitogène éluée par une solution de NaCl 3 M. Cette fraction, après dilution au 1/4 par de l'eau désionisée, a été chromatographiée sur colonne d'héparine immobilisée, et éluée par des concentrations croissantes en NaCl (Fig.14).

1- Analyse de la fraction éluée à 2,4 M en NaCl par électrophorèse (SDS-PAGE)

L'analyse en SDS-PAGE révèle la présence d'un peptide de masse moléculaire apparente de 17 000 (Fig.15). Après électrotransfert sur feuille de nitrocellulose, ce peptide n'est pas coloré par immuno-révélation avec un anticorps polyclonal anti-FGF basique.

2- Activités mitogènes

La fraction éluée à 2,4 M en NaCl possède une activité mitogène (Fig.16). La moitié de l'incorporation maximale est obtenue à une concentration de 4 ng/ml. L'incorporation maximale est double par rapport au contrôle.

A une concentration élevée (4 ng/ml), on observe un effet toxique (incorporation de méthyl-thymidine tritiée inférieure au contrôle).

A partir de 10 l de lactosérum, nous avons purifié 5 µg de facteur pur. La concentration dans le lait stabilisé serait de l'ordre de 0,5 ng/ml, ce qui correspond à 0,125 Unités/ml, soit 0,1% de l'activité mitogène totale du lactosérum.

D - DISCUSSION

Le lait de Femme renfermerait quatre polypeptides mitogènes affines pour l'héparine, élués à des concentrations en NaCl de 0,25 M, 0,35 M, 1 M et 2,4 M.

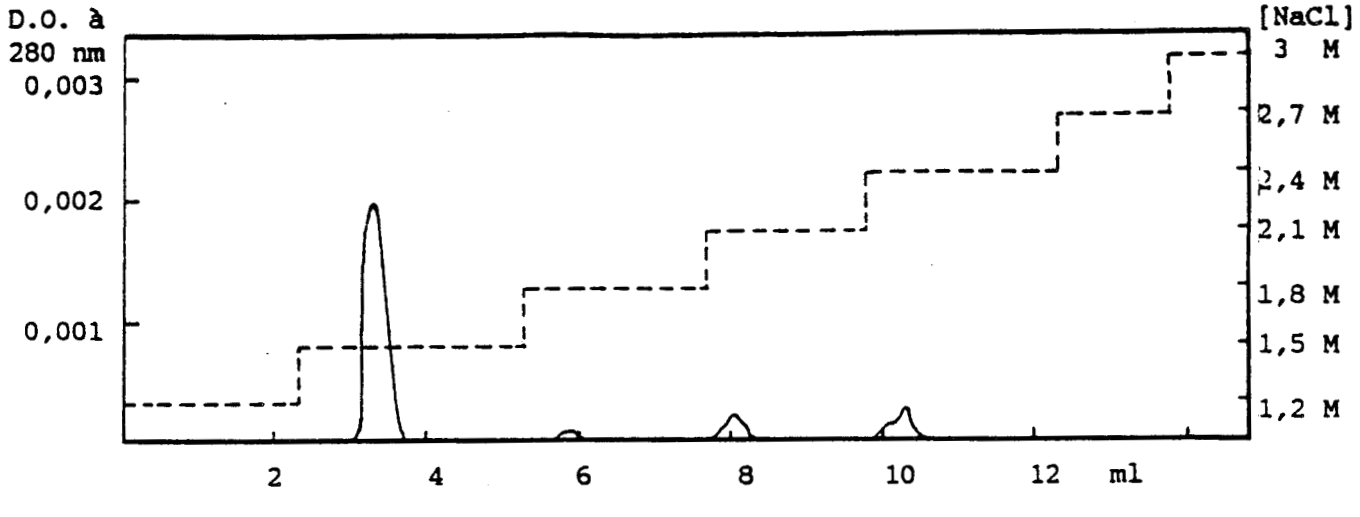

Figure 14: Chromatographie d'affinité sur colonne d'héparine immobilisée (1,5 x 0,8 cm) de la fraction éluée à 3 M en NaCl. La densité optique est lue à 280 nm (ligne continue). La colonne est éluée par un gradient discontinu en NaCl de 1,2 à 3 M (ligne pointillée). Les fractions sont dessalées et concentrées, puis leur activité mitogène est déterminée.

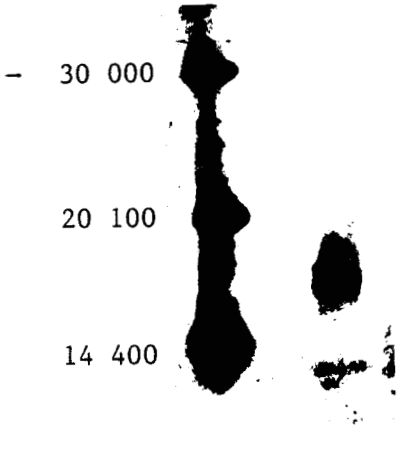

Figure 15 : Electrophorèse en gel à 15 % de polyacrylamide de la fraction éluée à 2,4 M en NaCl de la colonne d'héparine immobilisée. Coloration au nitrate d'argent. Bande de gauche : témoins de masse moléculaire.

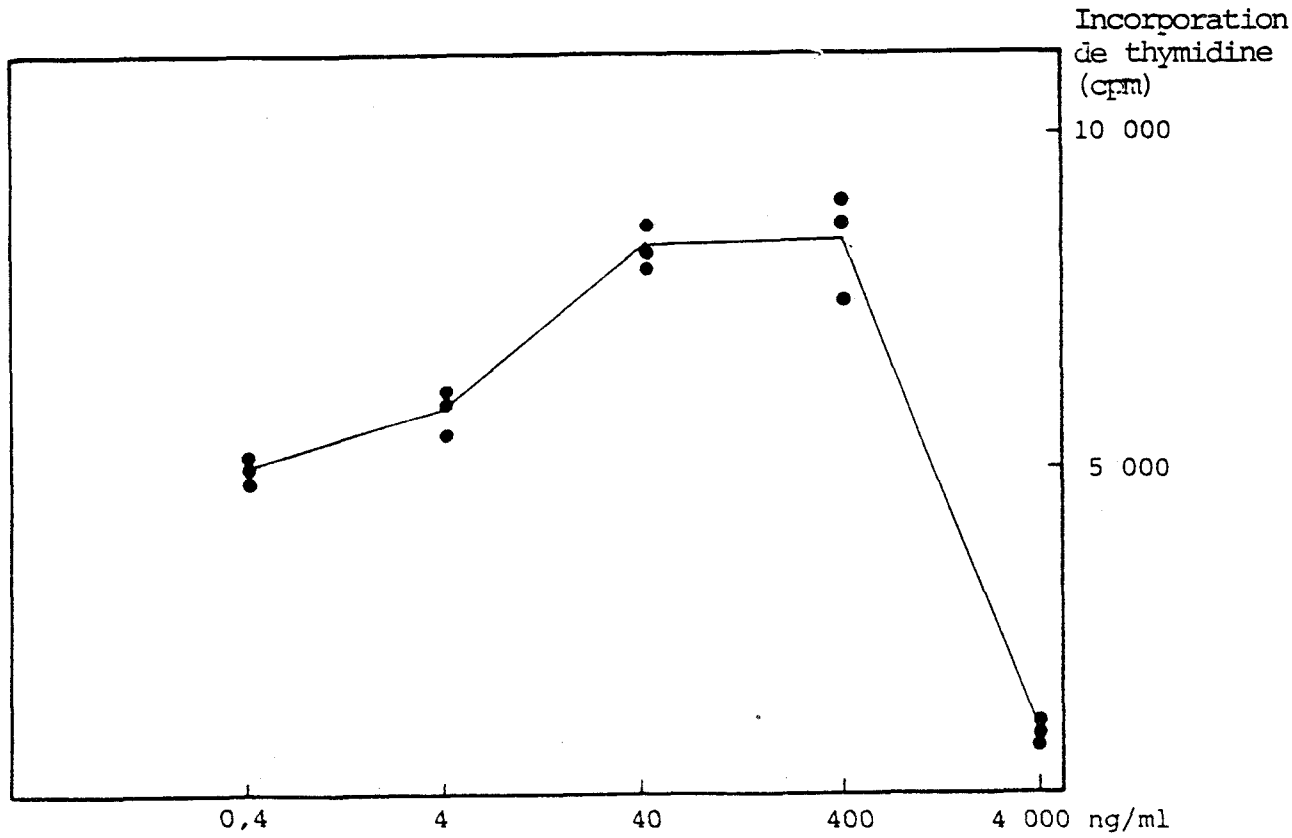

Figure 16: Courbe dose réponse obtenue par mesure de l'incorporation de méthyl-thymidine tritiée sur les cellules CCL 39 stimulées par la fraction éluée à 2,4 M en NaCl sur la colonne d'héparine immobilisée.

18,4% de l'activité mitogène totale du lactosérum est retenue sur héparine. Comparé à d'autres tissus (cerveau, matrice osseuse) ce taux est faible. Ceci est probablement du au fait que l'EGF, qui constitue environ 70% de l'activité mitogène totale du lait de Femme, n'est pas retenu sur héparine.

La fraction éluée à 0,25 M en NaCl renferme la majeure partie de l'activité mitogène retenue sur la colonne. La nature du ou des peptides responsables de cette activité n'a pas été déterminée.

La fraction éluée à 0,35 M en NaCl pourrait renfermer des facteurs de croissance basiques. En effet, l'héparine se comporte comme un échangeur de cations du fait de la présence de groupements sulfate. Parmi les facteurs de croissance basiques, citons le PDGF, qui a été identifié dans le lait de Femme par un dosage radioréceptologique (RAINES, 1986) ou le TGF-ß.

La fraction éluée à 1 M en NaCl pourrait contenir du FGF acide, bien que la présence de FGF acide dans le lait de Femme n'a jamais été signalée. La concentration de ce facteur est très faible, de l'ordre de 0,1 unité mitogène par ml de lactosérum. Cette concentration est inférieure à une dose physiologique.

Le lait de Femme renferme un facteur de croissance affine pour l'héparine dont la molarité d'élution est particulièrement élevée (fraction éluée à 2,4 M en NaCl). Ce facteur de croissance ne serait pas reconnu par un anticorps polyclonal anti-FGF basique.

A notre connaissance, deux études font état de facteurs de croissance ayant un comportement similaire, mis en évidence dans la matrice osseuse (HAUSCHKA et al., 1986) et dans le liquide synovial (HAMERMAN et al., 1987). Ces peptides n'ayant pas été caractérisés, il n'est pas possible de dire si ils appartiennent ou non à la famille des facteurs de croissance fibroblastiques.

La concentration totale en facteur de croissance de ce type est très faible dans le lait de Femme, inférieure à une dose physiologique. Seul il n'aurait pas d'effet. Néanmoins, il pourrait agir en synergie avec d'autres facteurs de croissance.

Le FGF basique serait absent du lait de Femme. En effet, les fractions éluées entre 1 M et 1,8 M en NaCl n'ont pas d'activité mitogène. Ceci est en accord avec les travaux réalisés par Klagsbrun sur la recherche des facteurs de croissance fibroblastiques dans le lait de Femme (communication personnelle).

IV - CONCLUSION

Le fractionnement par chromatographie d'affinité sur colonne d'héparine immobilisée est une méthode de choix pour purifier les facteurs de croissance possédant une très forte affinité pour l'héparine.

Alors que les facteurs de croissance fibroblastiques sont très étudiés, à notre connaissance aucune recherche n'a été engagée pour caractériser les facteurs de croissance très affines pour l'héparine (molarité d'élution supérieure à 2 M en NaCl). Bien que ces facteurs soient très peu abondants, ils pourraient jouer un rôle biologique important, par exemple en agissant en synergie avec d'autres facteurs de croissance.

A l'inverse, les facteurs de croissance ayant une activité faible pour l'héparine pourraient être isolés par d'autres méthodes chromatographiques, en particulier par des chromatographie d'échange de cations qui permettent de fractionner les protéines basiques.

Nous présentons dans le chapitre suivant la purification d'un facteur de croissance basique par chromatographie d'échange de cations.

FRACTIONNEMENT DU LAIT DE FEMME PAR CHROMATOGRAPHIE D'ECHANGE DE CATIONS

I - INTRODUCTION

A notre connaissance, tous les protocoles de purification de facteurs de croissance à partir du lait de Femme décrits dans la littérature comportent au moins une étape d'acidification, réalisée sur le lait écrémé afin de précipiter les caséines et d'obtenir le lactosérum (PETRIDES et al., 1985; ZWIEBEL et al., 1986; BAXTER et al., 1984; SINHA et YUNIS, 1983; SHING et KLAGSBRUN, 1984).

Afin de rechercher des peptides ayant des activités de facteurs de croissance qui seraient acido-sensibles, nous avons mis au point un protocole de fractionnement au cours duquel le pH est maintenu strictement au dessus de 6. En particulier, l'étape de décaséination a été supprimée.

II - MATERIELS ET METHODES

A - FRACTIONNEMENT DU LAIT DE FEMME

1- Préparation du lait écrémé

60 l de lait de Femme sont décongelés à 4°C et délipidés par centrifugation à 30 000 x g à 4°C pendant 30 min. Les lipides et les débris cellulaires sont retirés.

2- Chromatographie d'échange de cations en batch

Le lait écrémé et non décaséiné est chromatographié en batch sur un échangeur de cations: 100 g de SP-Sephadex C-50 (Pharmacia) sont

mélangés au lait et agités pendant une nuit à 4°C à l'aide d'une hélice de type marine. L'échangeur de cations est recueilli dans un filet de nylon posé dans un büchner et lavé abondamment par 20 l d'une solution d'acétate de sodium 0,22 M, pH 7.

Les protéines sont éluées par des passages successifs de 2 l de solutions à 0,6 M et 1,5 M en acétate de sodium.

3- Chromatographie d'échange de cations sur colonne

La fraction éluée par la solution 0,6 M en acétate de sodium est diluée par de l'eau désionisée jusqu'à 6 l, puis injectée sur une colonne d'échange de cations de type S-Sepharose (Pharmacia) (5 x 10 cm) préalablement équilibrée dans une solution d'acétate de sodium 0,22 M.

Après l'injection, la colonne est abondamment rincée par 5 l de la solution d'équilibrage, puis les protéines sont éluées par des passages successifs de 0,3 l de solutions de 0,4 M, 0,5 M, et 1,5 M en acétate de sodium.

La fraction éluée par la solution d'acétate 0,4 M est concentrée jusqu'à 50 ml à l'aide d'un concentrateur à cartouche de fibres creuses (seuil de coupure: molécules de masse moléculaire d'environ 10 000) (Amicon).

4- Tamisage moléculaire de la fraction éluée par de l'acétate de sodium 0,4 M

La totalité de la fraction est déposée sur une colonne de tamisage moléculaire de Sephadex G-75 Superfine (Pharmacia) (3,5 x 100 cm) équilibrée dans du NH_4HCO_3 0,1 M. La chromatographie est effectuée à un débit de 30 ml/h avec le tampon d'équilibrage comme éluent. La densité optique est lue en continu à 280 nm. Des fractions de 20 ml sont recueillies. Les fractions correspondant au pic élué au volume d'élution de 620 ml sont rassemblées (volume total des fractions: 60 ml), dialysées contre de l'eau et lyophilisées.

5- Chromatographie d'échange de cations par "F.P.L.C."

La fraction mitogène précédemment obtenue par tamisage moléculaire est suspendue dans un tampon phosphate 20 mM, pH 6,6, à 10 mg de

protéines par ml. 200 µl sont injectés sur une colonne d'échange de cations Mono S HR 5/5 (Pharmacia) précédemment équilibrée dans le tampon de l'échantillon.

Les protéines sont éluées avec le même tampon par un gradient discontinu en NaCl de 0 à 1 M, à un débit de 1 ml/min, à l'aide d'un appareil chromatographique "Fast Protein Liquid Chromatography" (Pharmacia). La densité optique est lue en continu à 280 nm. Chaque pic obtenu est recueilli séparément, concentré dans une centrifugeuse sous vide (SpeedVac, Savant Instruments), et congelé.

B - METHODES ELECTROPHORETIQUES

1- Electrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS

L'électrophorèse est réalisée dans un gel à 15% de polyacrylamide comme décrit p. 51.

Les échantillons sont suspendus dans le tampon échantillon avec ou sans agent réducteur (50 mM dithiothréitol, Sigma).

Après la migration les protéines sont transférées sur feuille de nitrocellulose.

2- Electrotransfert sur feuille de nitrocellulose (Western blotting)

Les protéines, séparées par électrophorèse en gel de polyacrylamide, sont ensuite transférées par électrophorèse comme décrit p. 51.

Après le transfert, les protéines fixées sur la nitrocellulose sont révélées soit par le bleu de Coomassie, soit par immuno-révélation.

3- Isoélectrofocalisation analytique

Les protéines sont séparées en fonction de leur point isoélectrique sur gel de polyacrylamide contenant des ampholytes. Les échantillons sont déposés en solution aqueuse ou saline sur un gel PhastGel IEF 3-9 (Pharmacia) à raison de 0,5 µg de protéines par dépôt de 1 µl.

L'isoélectrofocalisation est effectuée à 2 000 V maximum et à 2,5 mA pendant 75 Vh à l'aide d'un appareil d'électrophorèse PhastSystem (Pharmacia).

Après la focalisation les protéines sont colorées au bleu de Coomassie.

C - IMMUNO-REVELATION APRES ELECTROTRANSFERT

Après l'électrotransfert, les protéines fixées sur la nitrocellulose sont révélées par un anticorps polyclonal anti-FGF-basique comme décrit p. 52.

D - CHROMATOGRAPHIES LIQUIDES A HAUTE PRESSION

1- Chromatographie liquide à haute pression en phase inverse

La chromatographie est réalisée sur une colonne en phase inverse µ-Bondapack (3,9 x 300 mm) (Waters), à un débit de 1 ml/min à température ambiante. La densité optique est lue en continu à 214 nm. Les échantillons sont suspendus dans de l'eau contenant 0,1% d'acide trifluoroacétique (v/v) (Solvant A), et injectés. La colonne est éluée par un gradient linéaire segmenté de solvant A et de solvant B (solvant B: acétonitrile contenant 0,08% d'acide trifluoroacétique) de la manière suivante: au temps 0, 90% de solvant A et 10% de solvant B, au temps 10 min, 75% de solvant A et 25% de solvant B, au temps 40 min, 50% de solvant A et 50% de solvant B, au temps 45 min, 40% de solvant A et 60% de solvant B. Les fractions obtenues sont évaporées à l'aide d'une centrifugeuse sous vide (SpeedVac, Savants Instruments).

2- Chromatographie liquide de tamisage moléculaire à haute pression

La chromatographie est réalisée sur une colonne de tamisage moléculaire GF-250 (Dupont) (4 x 250 mm). La densité optique est lue en continu à 214 nm. Les échantillons sont suspendus dans un tampon phosphate de sodium 200 mM, pH 7, et injectés. La colonne est éluée par ce même tampon, à un débit de 1 ml/min à température ambiante. L'étalonnage de la colonne est réalisé par la chromatographie d'albumine

sérique bovine, d'ovalbumine, de chymotrypsinogène A et de ribonucléase A.

E - DETERMINATION DE LA SEQUENCE PEPTIDIQUE

Les séquences peptidiques ont été déterminées au Laboratoire de Chimie des Biomolécules (Prof. A. Tartar, Institut Pasteur, Lille) par Mlle P. Maes à l'aide d'un microséquenceur en phase gazeuse (Applied Biosystems 470 A et Applied Biosystems 120). Les dégradations au bromure de cyanogène ont été effectuées sur pastille en phase vapeur.

F - DOSAGE DES PROTEINES

Les concentrations en protéines sont déterminées par la méthode de BRADFORD (1976) comme décrit p. 53. L'albumine sérique bovine est utilisée comme témoin.

G - DETERMINATION DES ACTIVITES BIOLOGIQUES

1- Mesure de l'activité mitogène

L'activité mitogène des fractions est déterminée par la mesure de l'incorporation de méthyl-thymidine tritiée par des cellules de la lignée CCL 39, comme décrit p. 44.

2- Etude de la stabilité des activités mitogènes

Les fractions ayant des activités mitogènes sont mises en solution dans :

-Urée 6 M (Merck)
-Chlorhydrate de guanidine 4 M (Merck)
-HCl 1 M (pH 1)
-Dithiothréitol 0,65 mM (Sigma)
-PBS

Après une période d'incubation de 2h à température ambiante, 0,5 ml de chaque solution est équilibré dans du PBS par tamisage moléculaire sur une colonne de Sephadex G-25 de type PD-10 (Pharmacia).

Au volume d'élution de 3 ml, 0,5 ml de la solution est collecté. Une fraction aliquote est prélevée, et son activité mitogène est mesurée à différentes dilutions comme décrit p. 44.

Afin de déterminer la résistance des activités mitogènes à l'ébullition, une fraction aliquote est placée dans un bain marie à 100°C pendant 15 minutes, puis son activité mitogène déterminée comme décrit précédemment.

3- Recherche d'une affinité spécifique des protéines mitogènes pour l'héparine

Les protéines sont solubilisées dans un tampon phosphate 20 mM contenant 0,65 M de NaCl et déposées sur une colonne d'héparine immobilisée sur du Sepharose 6B (Pharmacia) équilibrée dans le même tampon. La fraction non retenue est recyclée trois fois sur la colonne, puis recueillie. La fraction retenue est éluée avec un tampon phosphate 20 mM pH 7 contenant 2,5 M en NaCl. La fraction non retenue et la fraction retenue sont dessalées par gel filtration et leur activité mitogène déterminée comme décrit p. 44.

4- Détermination de l'activité angiogène

Les activités angiogènes ont été déterminées sur la membrane chorio-allantoïdienne de l'oeuf de Poule par la méthode de KNIGHTON et al., (1977) avec quelques modifications. Les oeufs de Poule fécondés proviennent de l'élevage de Bersée (Nord, France). Après 24 heures à température ambiante en position horizontale ils sont placés en couveuse à 38°C. 2 ml d'albumine sont aspirés après 3 jours d'incubation. Au 4ème jour des fenêtres de 1 x 1 cm sont percées et refermées par du ruban adhésif. L'échantillon à analyser est suspendu dans une solution à 1% de méthylcellulose (Prolabo) dans de l'eau désionisée. 10 µl de cette solution est séchée sous courant d'air stérile. Les pastilles ainsi obtenues sont déposées au 9ème jour d'incubation sur la membrane chorio-allantoïdienne de l'oeuf, à travers la fenêtre. Au 11ème jour la membrane est observée à la loupe binoculaire. La réponse est positive lorsque l'on observe un réseau de capillaires sanguins autour de la pastille en conformation de rayons de roue de bicyclette.

L'échantillon est testé sur 10 oeufs simultanément. Des pastilles de méthylcellulose sans échantillon sont appliquées sur un groupe de 10 oeufs témoins.

III - RESULTATS

A - PURIFICATION DES FACTEURS DE CROISSANCE

Les étapes de la purification des facteurs de croissance sont suivies par la mesure des activités mitogènes.

Environ 1% de l'activité mitogène totale du lait écrémé est éluée à 0,4 M en acétate de sodium de la colonne de S-Sepharose Fast-Flow.

Cette fraction est chromatographiée par tamisage moléculaire sur colonne de Sephadex G-75 (Fig.17). La majorité de l'activité mitogène est localisée dans les fractions correspondant aux protéines de masses moléculaires comprises entre 15 000 et 40 000 (pic A).

Ces fractions sont rassemblées et refractionnées par chromatographie d'échange de cations sur colonne de Mono S. Huit pics sont obtenus. L'activité mitogène est localisée dans le pic 4 et le pic 5 (Fig.18).

Ces deux fractions représentent 0,4% de l'activité mitogène de départ et 0,0002% des protéines totales du lait écrémé (Tableau VI).

Leur concentration est estimée à 25 ng/ml de lait stabilisé.

B - CARACTERISATION BIOCHIMIQUE DES FACTEURS DE CROISSANCE

1- Détermination de la masse moléculaire

Les polypeptides du pic 4 migrent en une bande majeure de masse moléculaire apparente de 19 000 et en une bande mineure de masse moléculaire apparente de 37 000 lors de l'électrophorèse en gel de polyacrylamide, en conditions réductrices ou non-réductrices (Fig. 19).

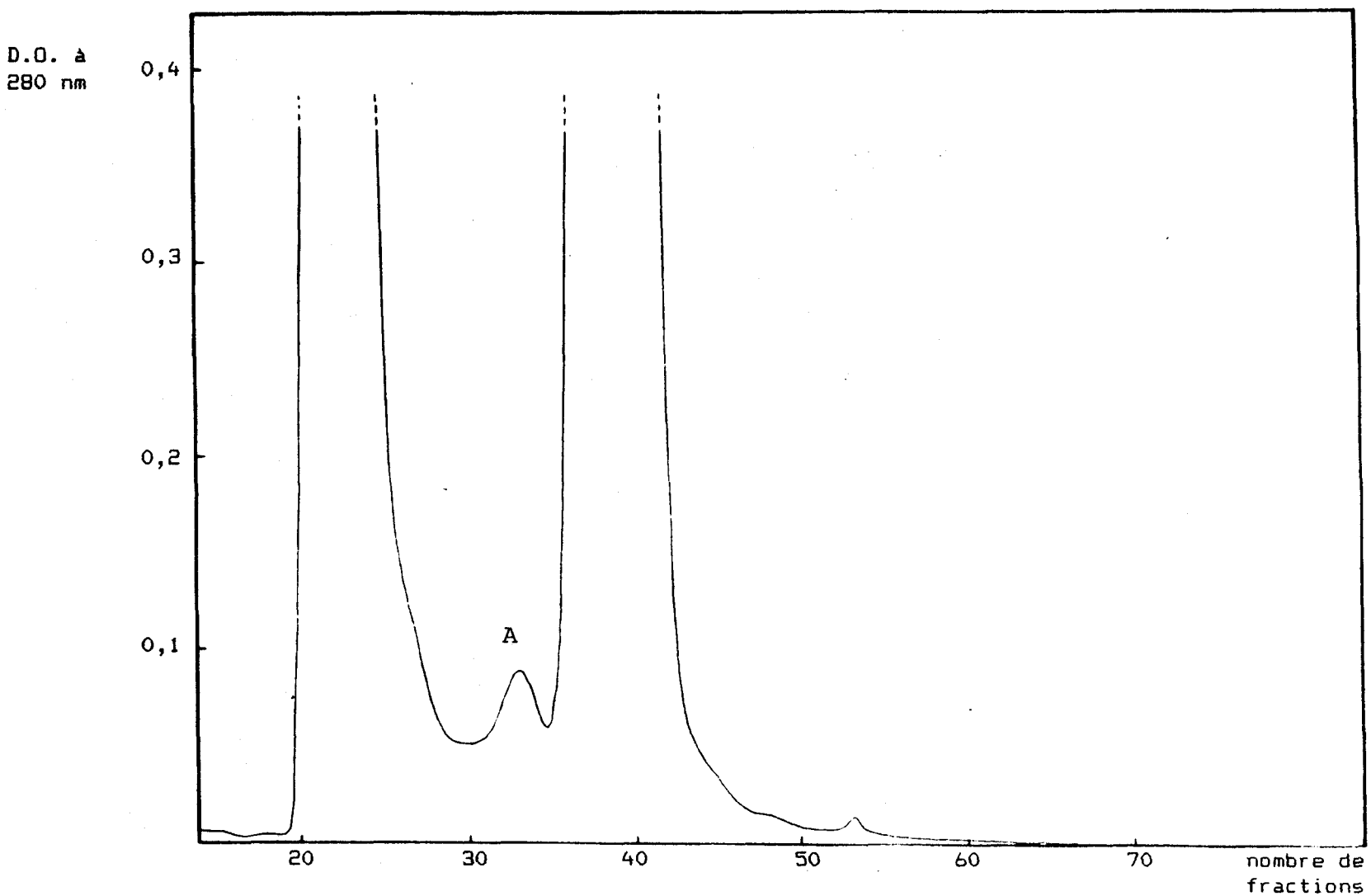

Figure 17: Chromatographie de tamisage moléculaire de la fraction éluée à 0,4 M en acétate de sodium sur colonne de S-Fast-Flow. La fraction, concentrée à 50 ml est déposée sur une colonne de Sephadex G-75 (3,5 x 100 cm) équilibrée dans du NH_4HCO_3 0,1 M. La colonne est éluée dans ce même tampon à un débit de 30 ml/h. Des fractions de 20 ml sont recueillies.

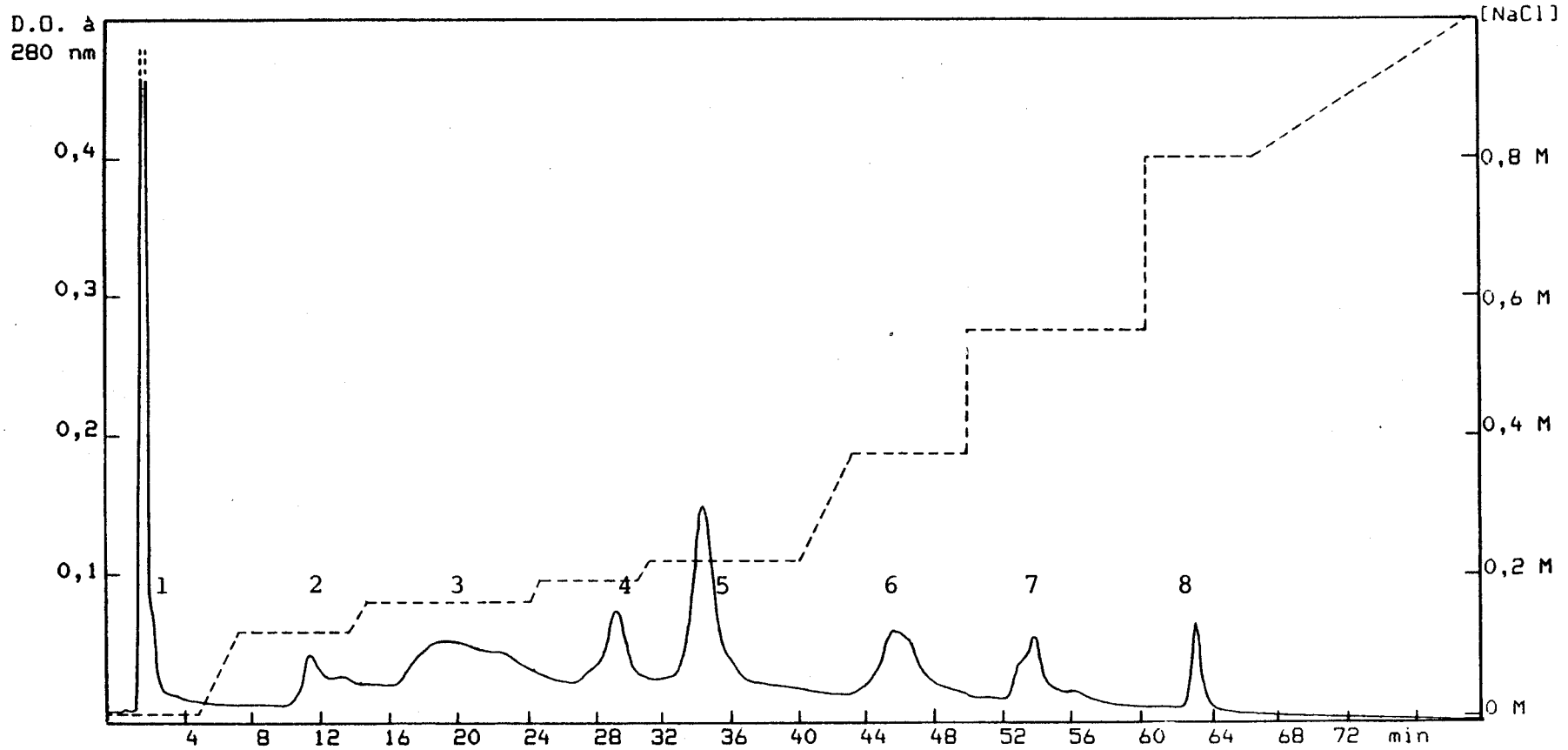

Figure 18: Chromatographie d'échange de cations de la fraction mitogène obtenue par tamisage moléculaire. 200 µl d'une solution à 12,5 mg de protéines /ml sont injectés sur une colonne d'échange de cations Mono S HR 5/5, équilibrée dans un tampon phosphate 20 mM, pH 6,6. Le profil d'élution est obtenu par un gradient discontinu en NaCl de 0 M à 1 M (ligne pointillée). La densité optique est lue à 280 nm (ligne continue).

Tableau VI

Purification de facteurs de croissance basiques
à partir de 60 l de lait de Femme

Etape	Protéines totales (mg)	Activité spécifique* (Unités/mg)	Activité totale* (Unités)	% d'activité récupérée
Lait écrémé	732 000	10.7	7 800 000	100
SP-Sephadex 0,6M CH_3COONa	11 000	ND	ND	ND
S-Sephadex-Fast-Flow 0,4M CH_3COONa	1 150	56	65 000	0.83
Tamisage moléculaire G-75	18	2 500	45 000	0.58
Echange de cations Mono S:				
-pic 4	0.64	20 000	32 000	0.4
-pic 5	0.94			

* Une unité d'activité est définie comme la concentration en mg/ml en protéines qui provoque une incorporation de méthyl-thymidine tritiée égale à la moitié de l'incorporation maximum par les cellules cibles.
N.D. : non déterminé

Les polypeptides du pic 5 migrent en une bande majeure de masse moléculaire apparente de 19 600 et en une bande mineure de masse moléculaire apparente de 38 700, en conditions réductrices ou non réductrices (Fig. 19).

Dans les deux cas les composants de masse moléculaire élevée seraient des dimères des composants de masse moléculaire faible.

Les polypeptides des pics 4 et 5 sont élués à des temps de rétention de 9,8 min lors de la chromatographie de tamisage moléculaire à haute pression. Par comparaison avec les temps de rétention des protéines étalons, on estime que leur masse moléculaire est comprise entre 16 000 et 20 000 (Fig. 20).

2- Détermination du point isoélectrique

L'isoélectrofocalisation analytique montre que ces polypeptides sont très basiques. Ils migrent au front lors de la focalisation, indiquant que leur point isoélectrique est supérieur à 9.

3- Détermination du caractère hydrophobe

La chromatographie liquide à haute pression en phase inverse sur C_{18} du pic 4 ou du pic 5 donne un seul pic élué à 45% en acétonitrile (Fig. 21 A et B).

C - IMMUNOREVELATION APRES ELECTROTRANSFERT

Les bandes obtenues en gel de polyacrylamide sont révélées, après électrotransfert, sur feuille de nitrocellulose, par un anticorps anti-FGF basique (Fig. 19).

Si la révélation est effectuée en omettant soit l'anticorps anti-FGF basique, soit l'anticorps anti-IgG de Lapin, aucune bande n'est révélée.

La coloration par la diaminobenzidine n'est donc pas due soit à une activité peroxydasique, soit à une reconnaissance par l'anticorps anti-IgG de Lapin des polypeptides, mais bien par une reconnaissance par l'anticorps anti-FGF basique.

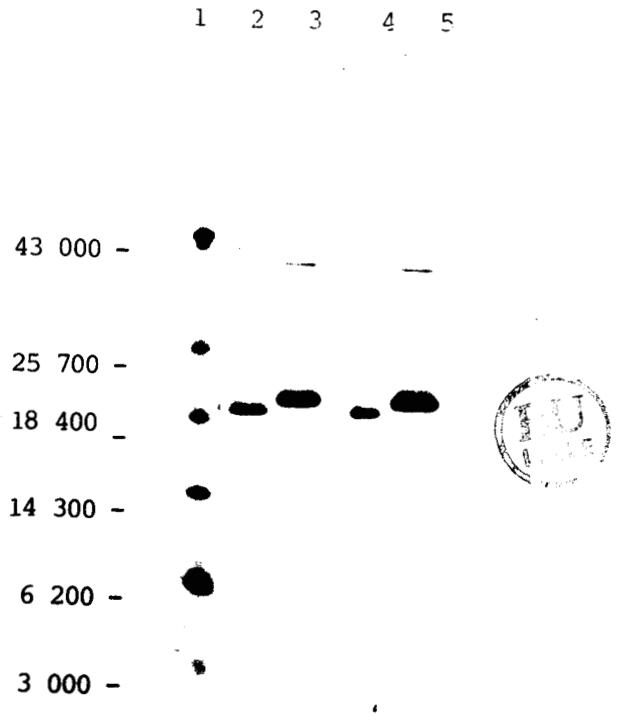

Figure 19: Electrophorèse en gel à 15% de polyacrylamide. Après la migration, les protéines sont transférées sur feuille de nitrocellulose. Bandes 1 à 3: coloration au bleu de Coomassie. Bandes 4 et 5: révélation à la diaminobenzidine après incubation avec des anticorps anti-FGF basique et anticorps anti IgG de Lapin couplés à la peroxydase. Bande 1: témoins de masse moléculaire. Bandes 2 et 4: pic 4, Bandes 3 et 5: pic 5.

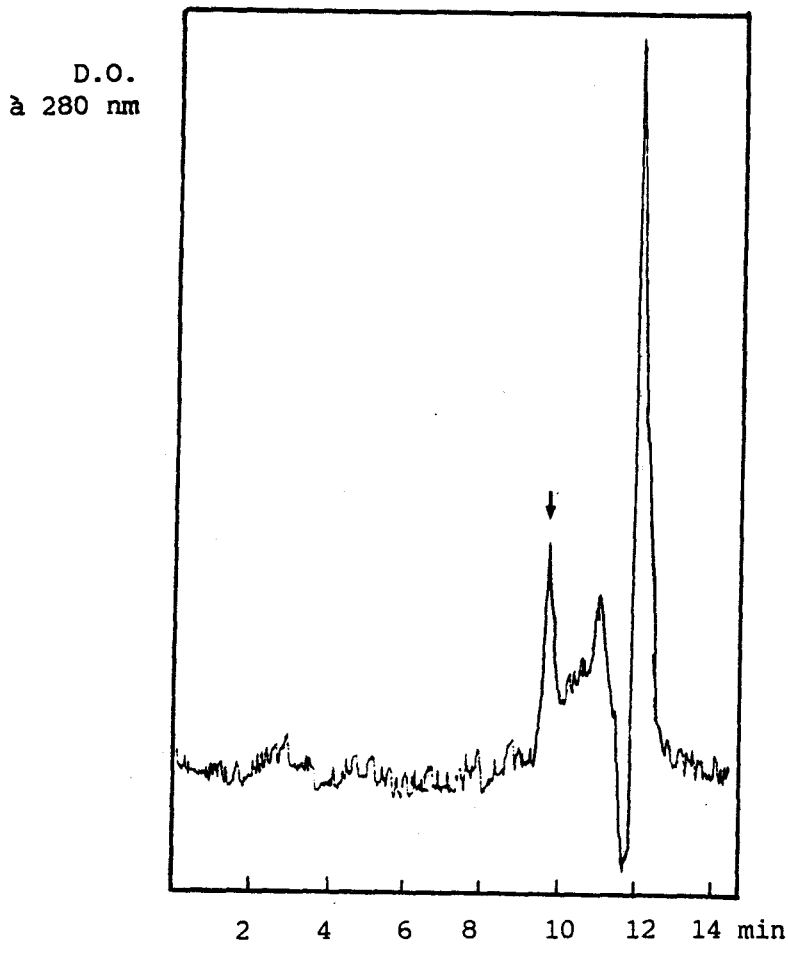

Figure 20: Chromatographie liquide à haute pression de tamisage moléculaire du pic 4. 50 µl sont injectés sur une colonne GF-250 (4 x 250 mm) équilibrée dans un tampon phosphate 200 mM, pH 7. La densité optique est lue à 280 nm, sensibilité de 0,08; atténuation de 32.

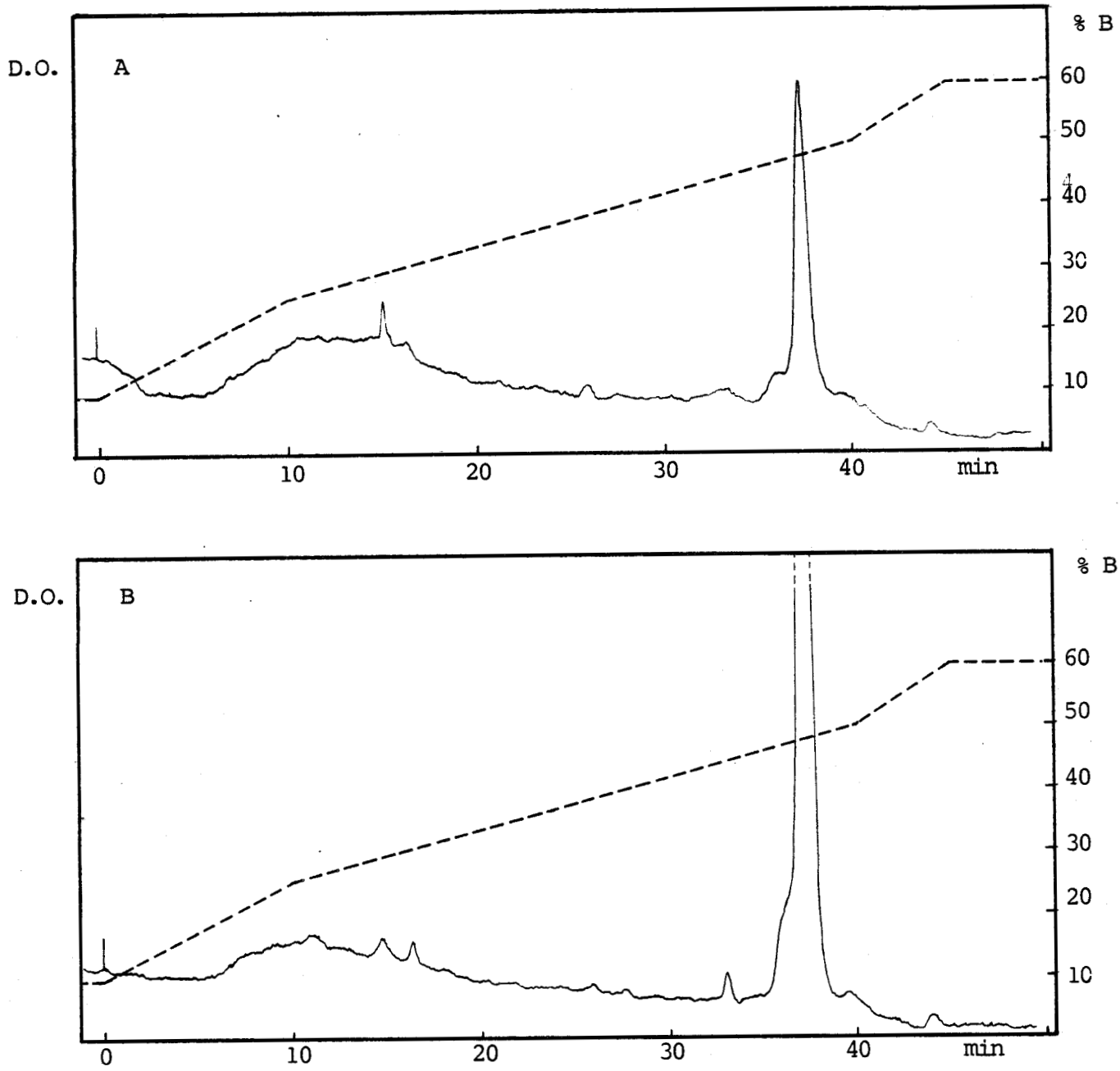

Figure 21: Chromatographie liquide à haute pression en phase inverse du pic 4
4 (A) et du pic 5 (B). 100ul sont injectés sur une colonne u-Bondapack C_{18}
(3,9 x 300 mm). Le profil d'élution est obtenu par un gradient linéaire segmenté
de 10% à 60% d'acétonitrile contenant 0,08% d'acide trifluoroacétique (solvant B)
dans l'eau (v/v) contenant 0,1% d'acide trifluoroacétique (ligne pointillée).
La densité optique est lue à 214 nm (ligne continue), sensibilité de 0,08;
atténuation de 32.

D - SEQUENCES PEPTIDIQUES PARTIELLES DES FACTEURS DE CROISSANCE

L'analyse par microséquençage du polypeptide du pic 4 n'a permis d'obtenir aucune séquence, soit que la quantité d'échantillon etait insuffisante, soit que son extrémité N-terminale est bloquée. 52 cycles de dégradation du polypeptide du pic 5 ont permis de déterminer sa séquence N-terminale (Fig. 22). L'interrogation des banques de données NBRF et GENPRO a permis de mettre en évidence une homologie de séquence avec la cyclophiline. La cyclophiline est une molécule cytoplasmique capable de fixer la ciclosporine A et impliquée dans le mécanisme de la division et de la différenciation cellulaire (voir chapitre "Le système ciclosporine A-cyclophiline" p. 34).

Le clivage sur pastille au bromure de cyanogène du polypeptide du pic 4 a permis d'obtenir à chaque cycle de dégradation deux ou trois résidus. Le clivage au bromure de cyanogène du polypeptide du pic 5 donne des résultats voisins. Apparaissent en plus les résidus de l'extrémité N-terminale (Tableau VII).

Ceci permet de conclure que l'extrémité N-terminale du polypeptide du pic 4 est bloquée.

Les polypeptides du pic 4 et du pic 5 seraient donc très fortement homologues. Il s'agit probablement de deux formes de la même molécule, l'une ayant son extrémité N-terminale tronquée et bloquée.

Le clivage au bromure de cyanogène coupe les chaînes polypeptidiques après un résidu de méthionine. Les séquences hypothétiques des peptides ont été établies par comparaison avec la séquence de la cyclophiline: un résidu est positionné sur la chaîne polypeptidique de la cyclophiline s'il se trouve à la même position après l'un des résidus de méthionine.

Deux séquences sont ainsi proposées, à partir de la méthionine 60 et de la méthionine 99 (Fig. 22).

Certains résidus obtenus après clivage au bromure de cyanogène n'ont pu être positionnés. Ceci suggère que l'extrémité C-terminale des facteurs de croissance est peu ou pas homologue à celle de la cyclophiline.

Tableau VII

Acides aminés identifiés par microséquençage des fragments peptidiques obtenus par coupure au BrCN des polypeptides du pic 4 et du pic 5

Cycle n°	pic 4	pic 5
1	Ala, Glu, Ile	X, Ala, Ile, **Asp**
2	Asn, Gln, Val	Asn, Gln, Val, **Glu**
3	Gly, Ala	Gly, Ala, Val, **Lys**
4	Gly, Arg,	Gly, Arg, **Lys**
5	Trp, Asp	Asp, **Lys**
6	Asp, Phe, Val	Asp, Phe, **Gly**
7	Thr, Glu	Thr, Glu, **Pro**
8	Asn, Ser, Arg	Asn, Ser, Arg, **Lys**
9	Gly	Gly, His, **Val**
10	Asp	Asp, Ser, **Thr**
11		Gln, **Val**
12		Phe, **Lys**
13		Ser, Phe, Gly, **Val**
14		Gly, **Tyr**
15		**Phe**
16		Ser, **Asp**
17		**Leu**
18		Leu, Tyr
19		Ser, Gly, **Ile**
20		Asp, **Gly**
21		**Asp**
22		Glu
23		Pro
24		**Val**
25		**Gly**
26		Asn

Les acides aminés en caractère gras sont retrouvés dans la séquence N-terminale

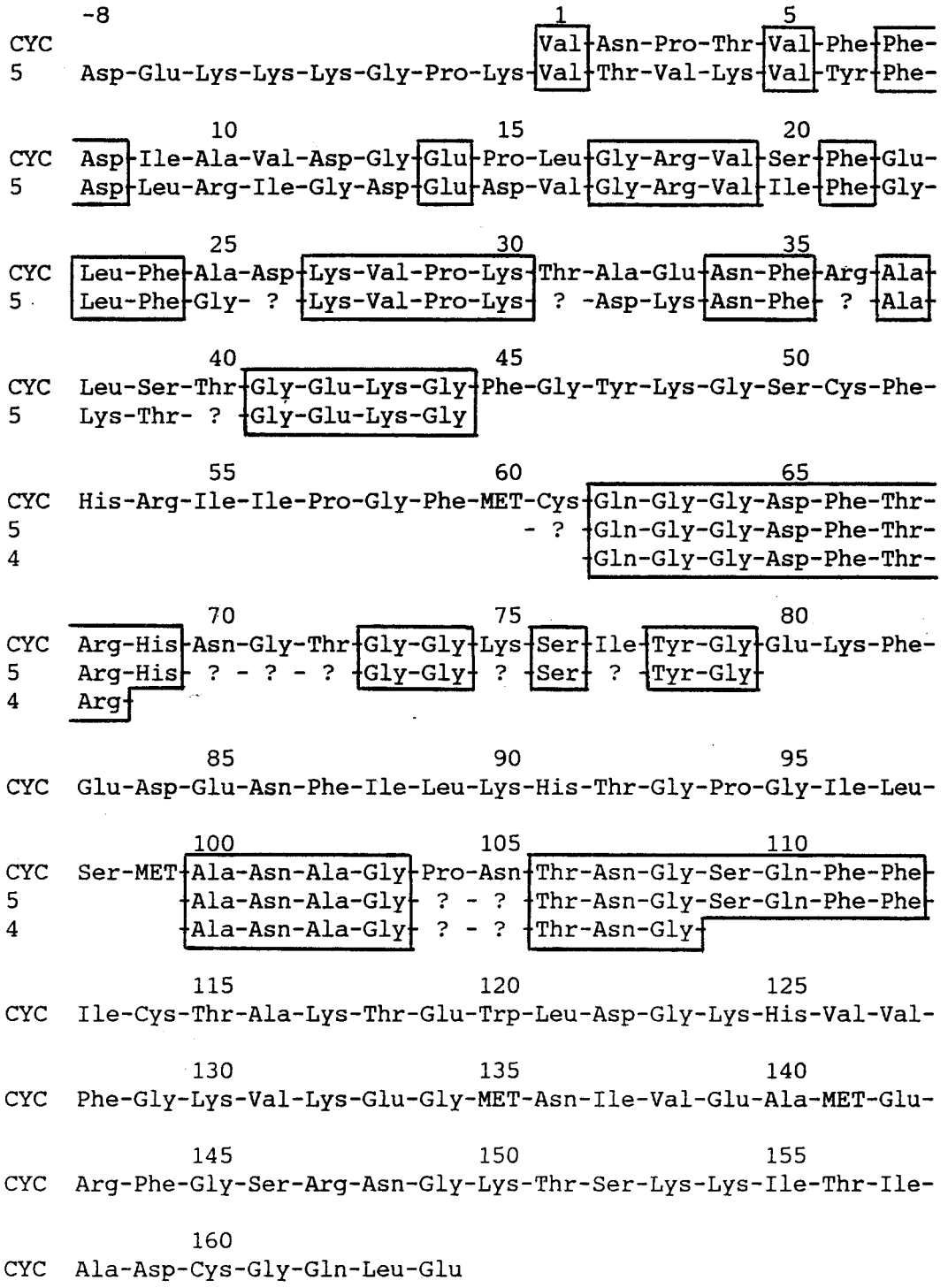

Figure 22: Séquence peptidique de la cyclophiline humaine (CYC). Séquence N-terminale du polypeptide du pic 5 (5),(résidus -8 à +44). Séquence, reconstituée en fonction de la séquence de la cyclophiline, à partir des résidus obtenus aux différents cycles de microséquence des polypeptides du pic 4 (4) et du pic 5 (5) dégradés au BrCN. La numérotation est celle de la cyclophiline.

E - DETERMINATION DES ACTIVITES BIOLOGIQUES

1- L'activité mitogène est fonction de la concentration en protéines

Les polypeptides de chacun des pics ont des activités mitogènes identiques. La stimulation de la synthèse d'ADN est dose dépendante: la moitié de l'incorporation maximale de méthyl-thymidine tritiée est obtenue à une concentration de 50 ng/ml (Fig. 23). L'incorporation maximale est 4 fois plus élevée que celle obtenue pour le contrôle. A une concentration de 2 ng/ml, les polypeptides sont encore actifs, avec une incorporation de 30% supérieure à celle du contrôle.

2- Stabilité des activités mitogènes

Les essais de stabilité des activités mitogènes ont été réalisés avec le pic 5.

L'urée 6 M réduit l'activité mitogène spécifique de 84%, le chlorhydrate de guanidine de 75% et l'acide chlorhydrique 1 M (pH = 1) de 99%. Après ébullition pendant 15 min, l'activité mitogène est complètement détruite. A l'inverse le dithiothréitol n'affecte pas l'activité mitogène.

3- Recherche d'une affinité pour l'héparine

Lorsque le pic 4 ou le pic 5 sont déposés sur une colonne d'héparine immobilisée, l'activité mitogène est présente exclusivement dans la fraction non-retenue. Les peptides n'ont donc pas d'affinité spécifique pour l'héparine.

4- Activité angiogène

Nous avons testé l'activité angiogène, sur la membrane chorio-allantoïdienne de l'oeuf de poule, de la fraction obtenue après tamisage moléculaire sur Sephadex G-75 (voir tableau VI), à raison de 1 µg de protéine par oeuf.

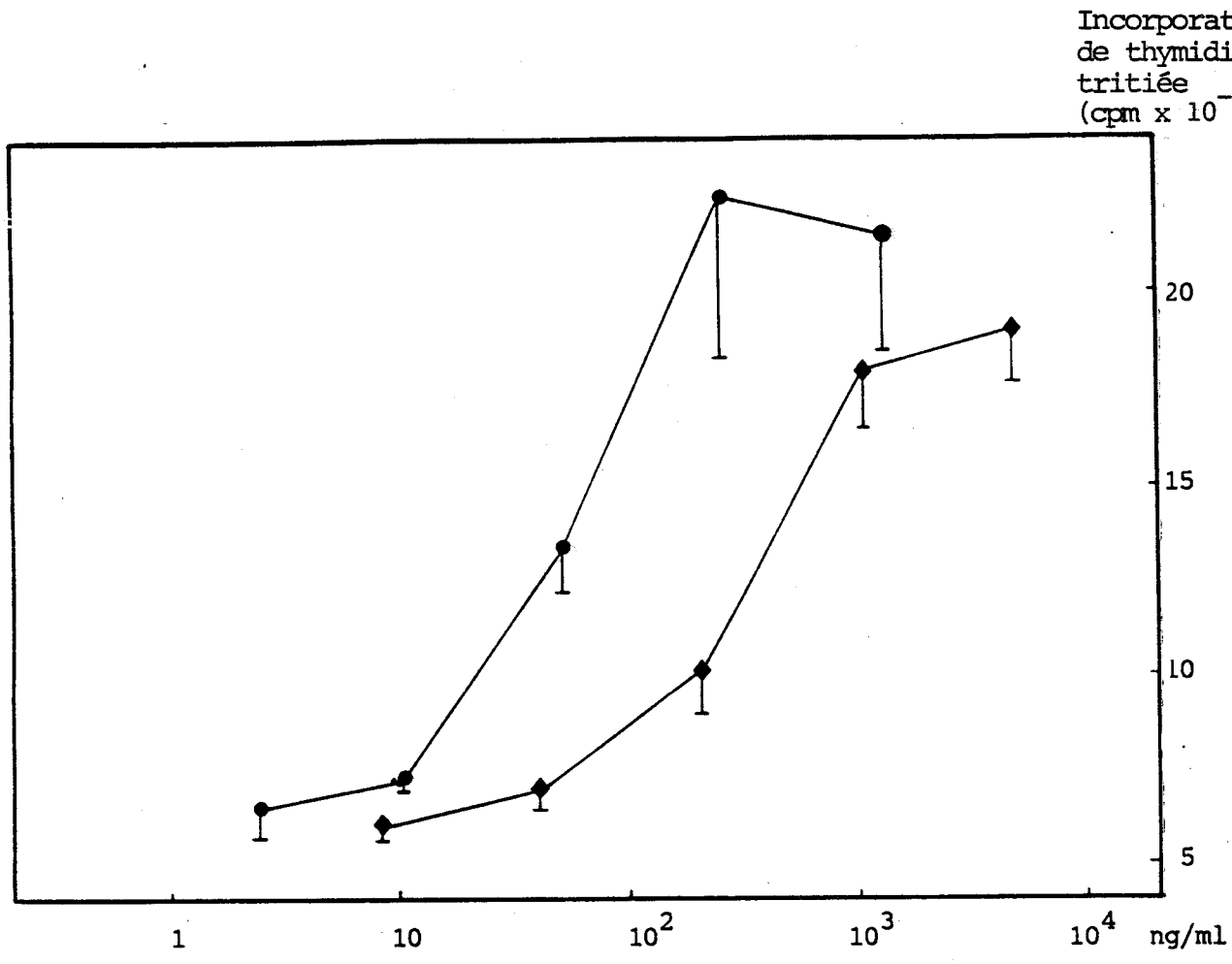

Figure 23: Courbes dose-réponse obtenues par la mesure de l'incorporation de méthyl-thymidine tritiée sur les cellules CCL 39 stimulées par les protéines du pic 4 (●) et de la fraction mitogène obtenue par tamisage moléculaire sur Sephadex G-75 (◆).

Sur les 10 oeufs ayant reçu l'échantillon, 7 ont présenté une réaction positive, alors que les 10 oeufs témoins n'ont présenté aucune réaction positive.

IV - CONCLUSIONS

Les polypeptides à activité de facteur de croissance sont purs après la chromatographie d'échange de cations sur Mono S, d'après l'électrophorèse en gel de polyacrylamide (une bande majeur et une forme dimèrique) et la chromatographie en phase inverse (un pic représentant 95% de la densité optique totale intégrée).

Les deux polypeptides sont très basiques (point isoélectrique supérieur à 9). A notre connaissance, les facteurs de croissance ayant un point isoélectrique supérieur à 9 sont le PDGF, le TGF-ß et le FGF basique. Les polypeptides que nous avons isolés diffèrent du PDGF par leur sensibilité à la chaleur, du PDGF et du TGF-ß par leur résistance aux agents réducteurs, par leur masse moléculaire inférieure (19 000 au lieu de 35 000 et 25 000 respectivement) et par leur structure monocaténaire. De masse moléculaire voisine du FGF basique, ils en diffèrent par leur manque d'affinité pour l'héparine.

Leur activité mitogène est caractéristique d'un facteur de croissance: elle dépend de la concentration en protéines, et la moitié de l'incorporation maximale de méthyl-thymidine tritiée par les cellules de la lignée CCL 39 est obtenue à une concentration de 50 ng/ml. Cette concentration est de 1 à 100 fois plus élevée à celles rencontrées habituellement pour les facteurs de croissance.

Il s'agit, à notre connaissance, de la première caractérisation de facteurs de croissance de ce type, qui ne peuvent-être rattachés à aucune famille de facteur de croissance.

On ne peut que suspecter un rapport entre ces facteurs de croissance et le FGF basique. La révélation par des anticorps préparés

par injection de FGF basique à un Lapin est inexpliquée. Elle pourrait être due soit à des épitopes communs entre le FGF basique et les polypeptides que nous avons isolés, soit à la présence d'anticorps dirigés contre eux, présents en mélange dans la préparation. Ces anticorps auraient été fabriqués par le Lapin par injection de ces polypeptides ou de polypeptides voisins en même temps que le FGF basique, bien que le fabriquant notifie que les anticorps ont été préparés par injection de FGF basique pur. Si tel est le cas, ces polypeptides seraient associés au FGF et ne serait pas détectés lorsqu'il sont en mélange avec du FGF.

La concentration de ces deux facteurs de croissance est relativement importante, de l'ordre de 25 ng/ml de lait stabilisé, soit plus que le PDGF et que l'IGF-I, mais moins que l'EGF.

Leur rôle biologique est inconnu. Comme l'EGF, ils pourraient être impliqués dans le développement de la glande mammaire et dans le développement du tractus digestif.

La détermination des séquences peptidiques des polypeptides du pic 4 et du pic 5 a confirmé que ces deux molécules sont très proches. Ils pourrait s'agir de deux variantes d'une même molécule ayant subi des modifications post-transcriptionelles, ou une dégradation partielle au cours de la lactation ou de la purification.

Seules de très courtes séquences communes avec le FGF ont été mises en évidence. La présence de ces séquences ne permet pas d'exclure que le FGF partage un épitope avec les peptides des pics 4 et 5. Cependant ils n'appartiennent pas à la famille du FGF.

L'interrogation des banques de données NBRF et GENPRO a permis de mettre en évidence une importante homologie de séquence avec la cyclophiline. L'homologie est faible du côté N-terminal, serait très élevée à partir du résidu de glycine de la cyclophiline n° 17. D'après les résidus obtenus après clivage au bromure de cyanogène, l'extrémité C-terminale serait différente de celle de la cyclophiline. On note une extension N-terminale comportant une séquence particulière "Lys-Lys-Lys".

Outre l'homologie de séquence, on remarque que la cyclophiline et les facteurs qui lui sont homologues ont des caractéristiques physico-chimiques semblables: leur point isoélectrique est supérieur à 9, ils sont de masse moléculaire voisine, leur activité est résistante aux agents réducteurs et sensible à pH acide.

La cyclophiline est une molécule cytoplasmique capable de fixer la ciclosporine A. A notre connaissance, il n'a jamais été montré que la cyclophiline possède une activité mitogène.

Ceci soulève plusieurs questions:

-Les facteurs de croissance que nous avons caractérisé sont-ils capables de fixer la ciclosporine A?

-Si oui, la ciclosporine inhibe-t-elle l'activité mitogène?

-la cyclophiline a-t-elle une activité mitogène?

-Quels relations physiologiques existe-t-il entre la cyclophiline et les facteurs de croissance qui lui sont homologues? et entre ces derniers et le FGF?

Nous présentons dans le chapitre suivant nos travaux personnels réalisés pour tenter de répondre aux questions posées ci-dessus.

INFLUENCE DE LA CICLOSPORINE SUR L'ACTIVITE BIOLOGIQUE DE DIVERS FACTEURS DE CROISSANCE

I - INTRODUCTION

En premier lieu, nous montrerons que les facteurs de croissance précédemment isolés fixent la ciclosporine A. En mesurant les activités mitogènes de ces facteurs de croissance en absence et en présence de ciclosporine A, nous verrons que la ciclosporine A inhibe leur activité mitogène. Nous vérifierons que cette inhibition n'est pas due à un effet cytotoxique de la ciclosporine A. En particulier nous verrons que la ciclosporine A n'inhibe pas l'activité mitogène d'autres facteurs de croissance. Enfin, nous étudierons une éventuelle synergie d'action entre les facteurs de croissance homologues à la cyclophiline et l'EGF, le FGF acide et le FGF basique.

II - MATERIELS ET METHODES

A - MISE EN EVIDENCE D'UNE AFFINITE DES PROTEINES POUR LA CICLOSPORINE A

La mise en évidence d'une affinité des protéines pour la ciclosporine A a été réalisée par la méthode décrite par HANDSCHUMACHER et al. (1984). Cette méthode utilise le caractère hydrophobe de la ciclosporine A: sur une colonne hydrophobe de Sephadex LH-20 (Pharmacia), l'élution en phase aqueuse de la ciclosporine A est retardée. Si la ciclosporine A est fixée sur une protéine moins hydrophobe, elle est éluée au volume mort de la colonne.

L'échantillon à analyser est suspendu dans 90 µl d'un tampon Tris 20 mM, HCl, pH 7,2 contenant 5 mM de 2-mercapto-éthanol, 0,02% d'azide

de sodium et 7,5% de sérum de Veau nouveau né, dans un tube en verre. Après l'addition de 10 µl de ciclosporine A tritiée (51 µg/ml, 450 µCi/ml) (Sandoz), le tube est agité. 20 µl de l'échantillon sont placés dans une fiole à scintillation contenant 3 ml de liquide scintillant (Aqualyte, Baker), et la radioactivité est mesurée par un compteur ß (Beckman). 50 µl sont déposés sur une colonne de 1,8 ml de LH-20. Celle-ci est éluée par un tampon Tris et la radioactivité des fractions est mesurée.

B - ETUDE IN VITRO DU ROLE DE LA CICLOSPORINE A DANS LA MODULATION DE L'ACTIVITE MITOGENE

1- Détermination des courbes dose-réponse

Le FGF acide, préparé à partir de cerveau de Boeuf, nous a été fourni par le Laboratoire de Biologie des Facteurs de Croissance, Université des Sciences et Techniques de Lille (Prof. B. BOILLY).

Le FGF basique, préparé à partir de cerveau de Boeuf, nous a été fourni par le Laboratoire du Prof. FRUCHART, Institut Pasteur, Lille.

L'EGF, préparé à partir de glandes sous-maxillaires de Souris nous a été fourni par la société Boehringer, Grenoble, France.

Le FGF acide est testé à des concentrations de 800 ng/ml, 80 ng/ml, 8 ng/ml et 0,8 ng/ml.

Le FGF basique est testé à des concentrations de 160 ng/ml, 16 ng/ml, 1,6 ng/ml et 0,16 ng/ml.

L'EGF est testé à des concentrations de 200 ng/ml, 20 ng/ml, 2 ng/ml et 0,2 ng/ml.

Le facteur de croissance homologue à la cyclophiline de masse moléculaire 19 600 est testé à des concentrations de 10 000 ng/ml, 1 000 ng/ml, 100 ng/ml et 10 ng/ml.

Chaque détermination est effectuée en triple.

2- Détermination des courbes dose-réponse en présence de ciclosporine A.

La ciclosporine A nous a été fourni par le Dr VERNILLET, Sandoz, France. 2 µl d'une solution de ciclosporine A dans l'éthanol à 40% (vol/vol) sont inoculés dans chaque puits (concentration finale en

ciclosporine A: 0,5 µg/ml). Simultanément, les facteurs de croissance sont inoculés comme décrit plus haut.

La ciclosporine A seule est inoculée dans trois puits témoins. 2 µl d'un mélange d'éthanol à 40% dans l'eau (vol/vol) sont inoculés dans trois autres puits.

3- Détermination des courbes dose-réponse en présence du facteur de croissance homologue à la cyclophiline.

Les courbes dose-réponse du FGF acide et du FGF basique sont déterminées comme décrit précédemment, en présence de 20 ng/ml de facteur de croissance homologue à la cyclophiline.

III - RESULTATS

A - MISE EN EVIDENCE D'UNE AFFINITE DES FACTEURS DE CROISSANCE POUR LA CICLOSPORINE A

La mise en évidence d'une fixation de la ciclosporine A sur les facteurs de croissance a été réalisée par chromatographie sur colonne de LH-20.

Lorsque la cyclophiline est déposée seule ou en présence de 60 µg d'albumine sérique bovine, moins de 1,5% de la ciclosporine est éluée au volume mort (Fig.24 A).

Dans un premier temps, nous avons testé la fraction mitogène obtenue après chromatographie de tamisage moléculaire sur Sephadex G-75.

La proportion de ciclosporine éluée au volume mort de la colonne est de 75% lorsque 70 µg de protéines sont mélangés à 10 µl de ciclosporine, de 51% avec 7 µg et de 1,6% avec 0,14 µg (Fig.24 A).

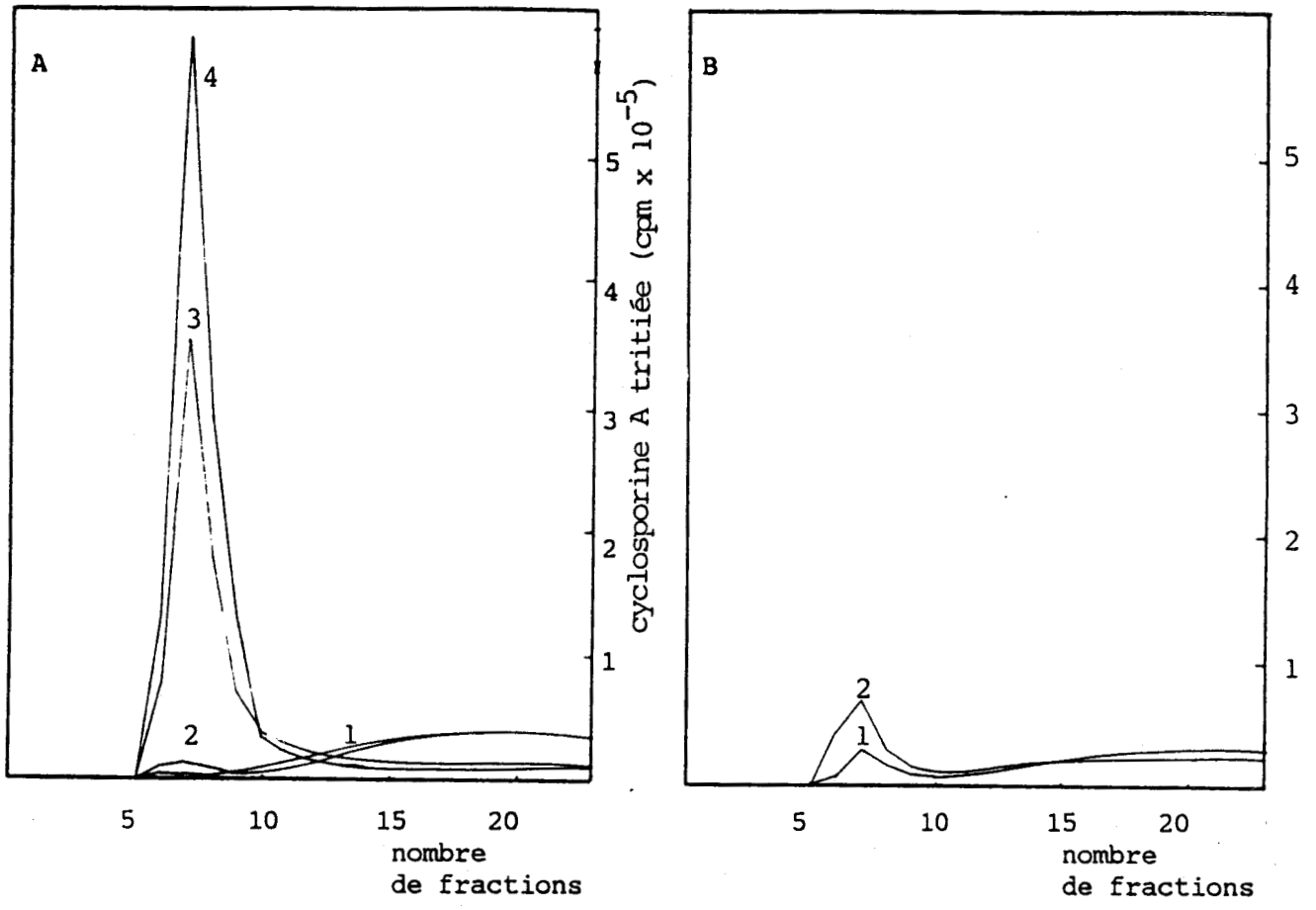

Figure 24 : Profils d'élution de la cyclosporine A sur colonne de LH-20. 10 µl de cyclosporine (51 µg/ml, 450 µCi/ml) sont déposés seule ou en présence de 60 µg d'albumine sérique bovine (Figure A, ligne 1), ou en présence de 0,14 µg (Fig. A, ligne 2), de 7 µg (Fig. A, ligne 3), de 70 µg (Fig. A, ligne 4) de la fraction mitogène éluée sur Sephadex G-75, ou en présence de 0,5 µg des polypeptides du pic 4 (Fig. B, ligne 1) ou de 1,9 µg des polypeptides du pic 5 (Fig. B, ligne 2).

La proportion de ciclosporine éluée au volume mort est de 5,8% avec 0,5 µg du polypeptide du pic 4, soit 0,89 mole de ciclosporine A fixée par mole de polypeptide, et de 16% avec 1,9 µg du polypeptide du pic 5, soit 0,75 mole de ciclosporine A fixée par mole de polypeptide (Fig.24 B).

Bien que la séquence peptidique des facteurs de croissance soit légèrement différente de celle de la cyclophiline, ils ont la même capacité de fixer la ciclosporine.

Nous proposons de dénommer ces facteurs "facteurs de croissance semblables à la cyclophiline", ou "cyclophilin-like growth factors" et d'utiliser l'abréviation CGF.

B - ETUDE IN VITRO DU ROLE DE LA CICLOSPORINE A DANS LA MODULATION DE L'ACTIVITE MITOGENE DES FACTEURS DE CROISSANCE

1- Inhibition de l'activité mitogène du CGF par la ciclosporine A

Nous avons en premier lieu montré que la ciclosporine A n'est pas cytotoxique: lorsque sont inoculés sur les cellules soit de la ciclosporine A, soit le solvant de la ciclosporine A (10 µl d'éthanol à 40% vol/vol) soit 10 µl de PBS, l'incorporation de méthyl-thymidine tritiée est inchangée.

En absence de ciclosporine A, l'incorporation de méthyl-thymidine augmente lorsque la concentration en CGF augmente, avec un plateau entre 100 et 10 000 ng/ml (Fig. 25).

En présence de 0,5 µg/ml de ciclosporine A, l'activité mitogène du CGF est inhibée lorsque la concentration molaire en facteur de croissance est inférieure à la concentration molaire en ciclosporine A:

- A une concentration en CGF de 10 µg/ml, le CGF, en excès (1,4 mole de CGF/mole de ciclosporine A), conserve son activité mitogène.

- A une concentration de 1 µg/ml, la ciclosporine A est en excès (7 mole de ciclosporine A/ mole de CGF). On observe cependant une activité mitogène résiduelle. L'incorporation de méthyl-thymidine tritiée, diminuée de 90% par rapport à la valeur obtenue à la même concentration en CGF et en absence de ciclosporine A, correspond à celle qui serait

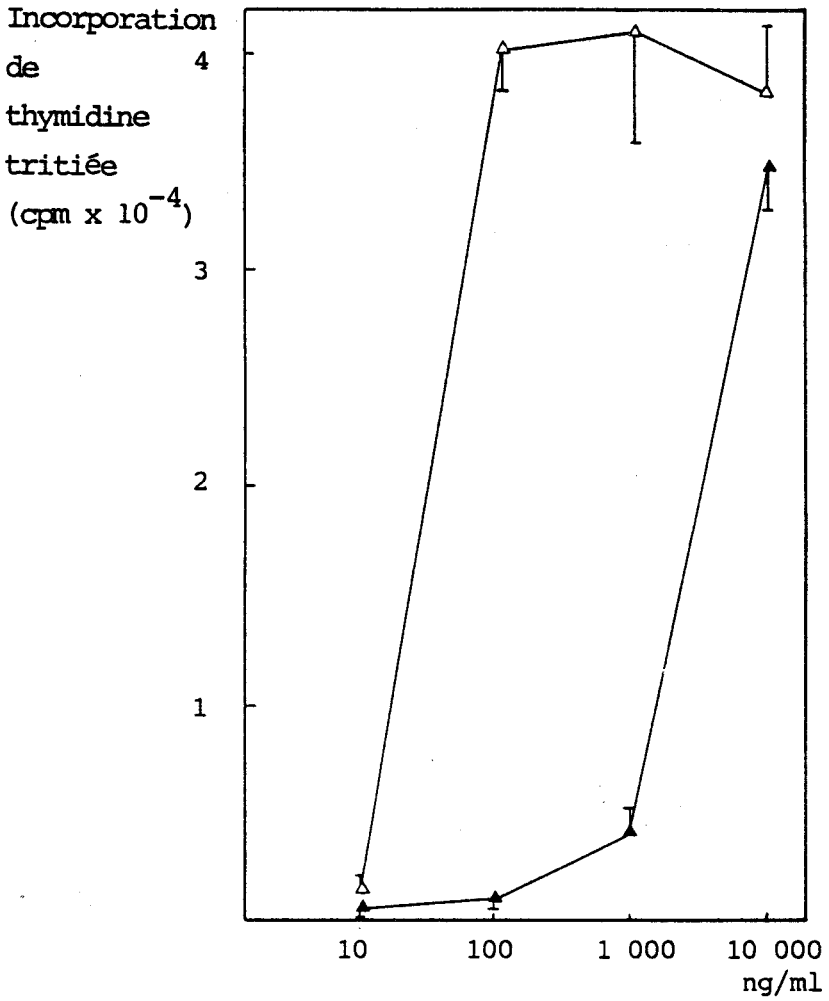

Figure 25: courbes dose-réponse du CGF (variant de masse moléculaire 19,600) en absence (△) ou en présence (▲) de 0,5 µg/ml de cyclosporine A.

obtenue à 15 ng/ml de CGF. Ceci est probablement dû à ce que la fixation de la ciclosporine A sur le CGF obéit à une loi d'équilibre.

- A une concentration de 100 ng/ml, la ciclosporine est 70 fois en excès. L'activité mitogène est totalement inhibée (Fig. 25).

Des résultats identiques sont obtenus lorsque le CGF et la ciclosporine A sont mélangés avant d'être inoculés sur les cellules.

Enfin, nous avons incubé les cellules avec du milieu de culture contenant de la ciclosporine A pendant une heure à 37°C. Les cellules ont ensuite été rincées par du milieu ne contenant pas de ciclosporine A, puis le CGF est inoculé comme précédemment. Dans ce cas, nous n'observons pas d'inhibition de l'activité mitogène.

Il semble donc que l'inhibition de l'activité mitogène du CGF soit due à la fixation de la ciclosporine A sur la molécule de CGF.

2- Etude de la modulation de l'activité de divers facteurs de croissance par le CGF et par la ciclosporine A

La figure 26 montre les courbes dose-réponse du FGF basique, du FGF acide et de l'EGF soit seuls, soit en présence de CGF, soit en présence de ciclosporine A.

La ciclosporine A n'a pas d'effet inhibiteur ni sur le FGF basique, ni sur le FGF acide. L'incorporation de méthyl-thymidine tritiée provoquée par la stimulation des cellules par de l'EGF serait légèrement atténuée en présence de ciclosporine A.

En présence ou en absence d'une dose faiblement mitogène de CGF (20 ng/ml), le FGF basique et le FGF acide ont la même activité mitogène. Le CGF n'agirait donc pas en synergie avec les facteurs de croissance fibroblastiques.

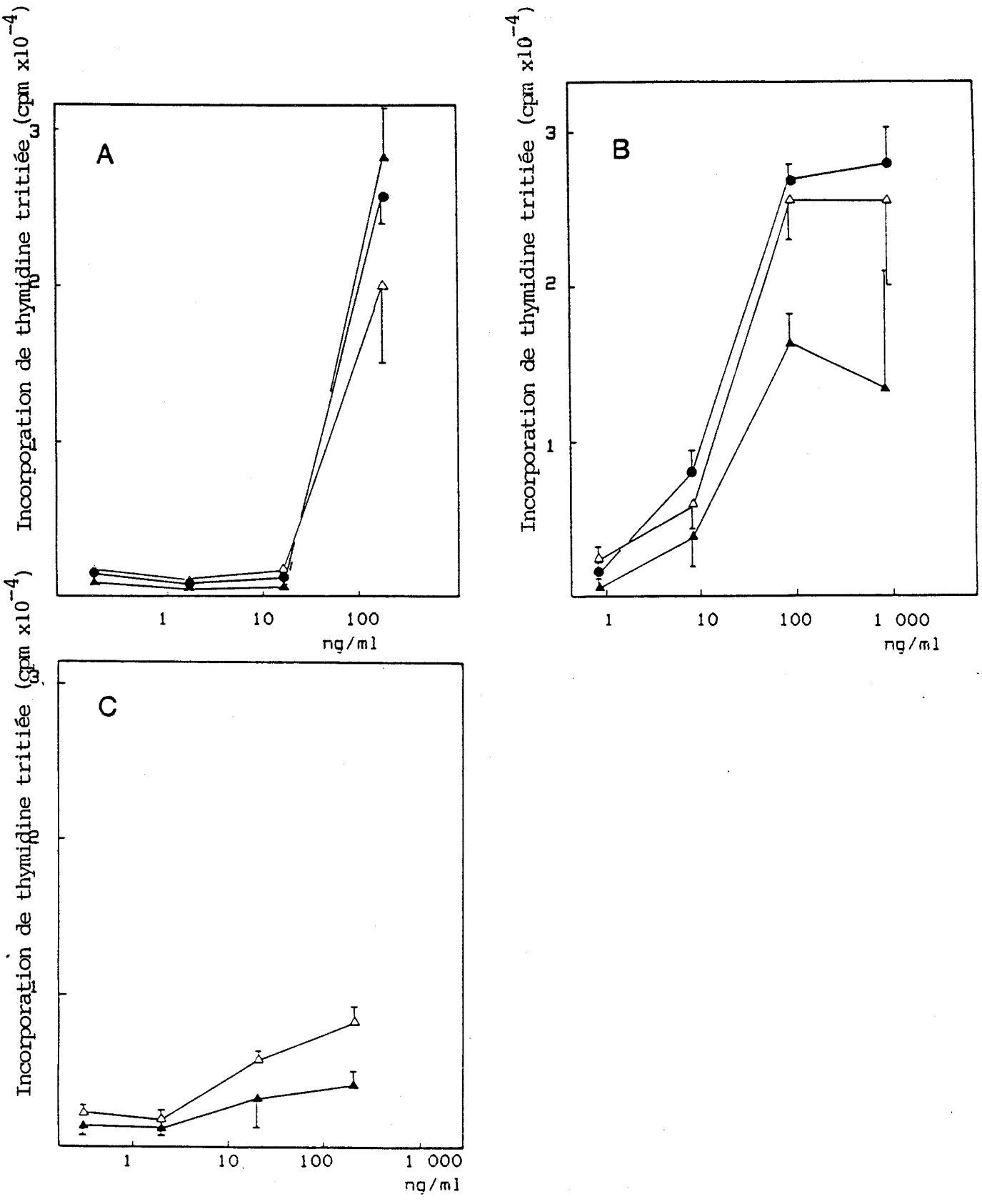

Figure 26: courbes dose-réponse du FGF basique (A), du FGF acide (B) et de l'EGF (C) seuls (△) ou en présence de 0,5 µg/ml de cyclosporine A (▲) ou de 20 ng/ml de CGF (●)

IV - CONCLUSIONS

Nous avons montré d'après le test sur colonne de LH-20 que le CGF et la cyclophiline fixent la ciclosporine A de la même manière. Il conviendrait de mesurer la constante de dissociation entre le CGF et la ciclosporine A et de comparer cette valeur à la constante de dissociation entre la cyclophiline et la ciclosporine A.

Des études en Résonance Magnétique du Proton à 480 MHz ont montré que le site de fixation de la ciclosporine A sur la cyclophiline serait constitué par un groupe de résidus aromatiques comprenant 7 résidus de phénylalanine, le résidu de tryptophane, un résidu de tyrosine et 2 résidus d'histidine (DALGARNO et al., 1986).

La séquence partielle du CGF montre que les résidus de phénylalanine de la cyclophiline 7, 21, 24, 35, 67, 111, 112 sont conservés dans la molécule de CGF. Le résidu de phénylalanine 6 est remplacé par une tyrosine. La détermination de la séquence peptidique totale des deux variantes moléculaires du CGF permettra, par comparaison avec la séquence de la cyclophiline, de préciser le site de fixation de la ciclosporine A sur les molécules de la famille de la cyclophiline.

La structure de la molécule de cyclophiline est très conservée au cours de l'évolution des espèces (HARDING et al., 1986; HAENDLER et al., 1987; DANIELSON et al., 1988). Ceci laisse supposer que la totalité de la molécule est nécessaire à son activité biologique. La caractérisation d'une molécule qui est homologue à la cyclophiline, mais différente, suggère qu'elle a un rôle biologique différent. Premièrement, le CGF pourrait posséder une séquence peptidique signal pour la sécrétion, qui est absente dans la cyclophiline (DANIELSON et al., 1988). Deuxièmement, le CGF a une activité de facteur de croissance. A notre connaissance, l'activité mitogène de la cyclophiline n'a jamais été démontrée. Cependant,l'abondance de la cyclophiline dans la cellule (0,1 à 0,4% des protéines cytosoliques, HARDING et al., 1986) laisse-t-à penser que la cyclophiline n'a pas d'activité de facteur de croissance.

Plusieurs hypothèses ont été avancées quant au rôle de la cyclophiline. HARDING et al. (1986) proposent que la cyclophiline est impliquée dans la transduction du signal mitogène des facteurs de

croissance intervenant dans la réponse immunitaire, en provoquant l'expression de gènes spécifiques. La cyclophiline pourrait fixer un ligand naturel (HANDSCHUMACHER et al., 1984). La ciclosporine A serait un compétiteur du ligand naturel de la cyclophiline. Ce ligand ne serait ni l'EGF, ni les FGFs acide et basique puisque la ciclosporine n'inhibe pas leur activité mitogène.

Quels sont les relations biologiques entre le CGF et la cyclophiline?

Nous suggérons que le CGF aurait un mécanisme d'action similaire à celui de la cyclophiline dans la transduction du signal mitogène:

- Le CGF agirait, comme tous les facteurs de croissance, après s'être fixé sur un récepteur membranaire spécifique.

- Il serait alors internalisé, et jouerait dans la cellule le même rôle que la cyclophiline, par exemple en se fixant sur un récepteur de la membrane nucléaire.

- La ciclosporine A inhiberait la fixation du CGF et/ou de la cyclophiline sur ce récepteur

- La cyclophiline serait emprisonnée dans le cytoplasme et ne pourrait se fixer sur son récepteur nucléaire qu'après avoir été libérée de son compartiment cytoplasmique.

- La cyclophiline serait libérée au cours de la transduction d'un signal mitogène particulier.

- La fixation de la cyclophiline et/ou du CGF sur le récepteur de la membrane nucléaire provoquerait la duplication de l'ADN et la division de la cellule.

La ciclosporine A pourrait également empêcher la fixation du CGF sur son récepteur membranaire. La cyclophiline, de part sa structure voisine du CGF, pourrait se fixer sur le récepteur membranaire du CGF, mais avec une constante de dissociation plus élevée. La cyclophiline aurait alors une activité de type facteur de croissance, mais seulement à une concentration élevée. In vivo, un tel scénario est envisageable lors de la mort et de la lyse des cellules. La cyclophiline, libérée, agirait dans la réparation des tissus lésés.

Afin de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse, il conviendrait de rechercher une activité de type facteur de croissance de la cyclophiline, d'entreprendre l'étude du récepteur membranaire du CGF,

d'étudier la fixation de la cyclophiline et du CGF, libres ou fixés à la ciclosporine A, sur le récepteur membranaire et de rechercher un récepteur nucléaire de la cyclophiline et du CGF.

La ciclosporine A, en tant qu'inhibiteur de l'activité mitogène du CGF, constitue un outil unique pour l'étude des activités biologiques et du mécanisme d'action du CGF.

A l'inverse, l'étude des activités biologiques du CGF permettra de mieux connaître les effets de la ciclosporine A. En particulier, les effets secondaires de la ciclosporine A lors d'un traitement immunosuppresseur pourraient être mieux contrôlés.

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE

Nos travaux s'inscrivent dans la thématique du Laboratoire du Professeur G. SPIK concernant l'étude des composés biologiquement actifs du lait de Femme. Les travaux réalisés antérieurement concernent, d'une part, le rôle du lait maternel dans la protection du tractus digestif contre les infections et, d'autre part, le rôle immunostimulant de composés protéiques du lait.

Au sein de cette thématique, nous étions chargé d'introduire, au Laboratoire, l'étude des facteurs de croissance qui possèdent, entre autres, la propriété d'accélérer la maturation du tractus digestif.

En effet, dès 1980, CARPENTER avait montré que le facteur de croissance épidermique (EGF) était le facteur le plus abondant dans le lait de Femme (il représente plus des 2/3 de l'activité mitogène totale). Parallèlement, plusieurs travaux ont montré que l'EGF joue un rôle important dans la maturation de l'épithélium du tube digestif.Par la suite, entre 1983 et 1985, près d'une dizaine de facteurs de croissance différents ont été mis en évidence dans le lait de Femme.

Compte tenu de ces données qui font état de l'existence d'une grande variété des molécules mitogènes dans le lait de Femme,nous avons axé nos travaux sur l'isolement et la caractérisation de facteurs de croissance nouveaux.

Dans ce but, nous avons mis en oeuvre trois procédés différents de fractionnement du lait:

- La chromatographie de tamisage moléculaire, qui permet de fractionner les facteurs de croissance en fonction de leur masse moléculaire. Nous l'avons appliquée au colostrum et au lait stabilisé.

- La chromatographie d'affinité sur colonne d'héparine immobilisée. Cette méthode, à notre connaissance, n'avait jamais été appliquée pour la purification des facteurs de croissance du lait de Femme. Elle permet de mettre en évidence les molécules basiques et d'isoler les facteurs de croissance affines pour l'héparine, en particulier les facteurs de croissance fibroblastiques.

- La chromatographie d'échange de cations, afin d'isoler les facteurs de croissance basiques.

La purification des facteurs de croissance a été contrôlée par la mesure de l'incorporation de méthyl-thymidine tritiée par les cellules fibroblastiques de la lignée CCL 39.

Les résultats obtenus nous ont permis de vérifier la diversité des facteurs de croissance du lait de Femme. Ils peuvent se résumer de la manière suivante:

1-La chromatographie de tamisage moléculaire montre que le colostrum renferme trois grandes catégories de facteurs de croissance, de masses moléculaires comprises entre 60.000-75.000, 9.000-14.000 et 4.000-6.000, alors que le lait stabilisé n'en renferme que deux. Les facteurs de croissance de masse moléculaire faible: 4.000 à 6.000, semblent identiques à ceux présents dans le colostrum, alors que ceux présents dans la deuxième catégorie semblent différents. Elle est constituée par des composés protéiques dont la masse moléculaire est comprise entre 30.000 et 40.000. Les facteurs de croissance de masses moléculaires élevées (60.000 à 75.000), présents dans le colostrum, sont absents dans le lait stabilisé.

Ces résultats montrent donc que la composition et la nature des facteurs de croissance subissent des modifications au cours de la lactation.

2-La chromatographie d'affinité sur colonne d'héparine immobilisée a permis de montrer que 18,4% de l'activité mitogène totale du lactosérum est retenue sur héparine. Quatre catégories de facteurs de croissance ont été éluées par des concentrations en NaCl de 0,25 M, 0,35 M, 1 M et 2,4 M.

La fraction éluée à 0,25 M en NaCl représente 87% de l'activité mitogène totale retenue sur la colonne.

Les autres fractions renferment des molécules mitogènes présentes à l'état de traces dans le lait.

Ainsi, nous avons mis en évidence un polypeptide de masse moléculaire apparente de 17.000, élué à 2,4 M en NaCl, mitogène pour les fibroblastes à une concentration inférieure à 4 ng/ml. Sa concentration dans le lait est de l'ordre de 0,5 ng/ml, soit 0,1% de l'activité mitogène totale.

BU LILLE

A notre connaissance, aucune étude n'a été consacrée aux facteurs de croissance élués à une concentration en NaCl supérieure à 2 M sur colonne d'héparine immobilisée.

Le lait de Femme serait dépourvu du facteur de croissance fibroblastique basique (aucune activité mitogène n'est éluée entre 1,2 et 2,0 M en NaCl).

3-Afin de rechercher des peptides mitogènes qui seraient acido-sensibles, nous avons développé un protocole de fractionnement au cours duquel le pH est maintenu strictement au dessus de 6.
Ce protocole est constitué d'une chromatographie d'échange de cations en batch du lait écrémé et non-décaséiné, d'une chromatographie d'échange de cations sur colonne, d'un tamisage moléculaire et d'une chromatographie d'échange de cations à haute résolution.

A l'issue de cette dernière étape, nous avons obtenu huit fractions. Deux d'entre elles possédaient une activité mitogène. Chacune de ces deux fractions renferme un peptide basique, monocaténaire, sensible à pH acide, résistant aux agents réducteurs. Ces deux fractions diffèrent par la masse moléculaire des polypeptides quelles contiennent : l'un a une masse moléculaire de 19.000, l'autre de 19.600. Leur activité mitogène spécifique est de l'ordre de 20.000 unités par mg de protéine.

Ces deux facteurs de croissance qui présentent des propriétés physico-chimiques particulières ont été caractérisés pour la première fois.

L'analyse au microséquenceur a permis de déterminer la séquence des 52 résidus d'acides aminés N-terminaux de la forme de masse moléculaire 19.600, de montrer que la forme de masse moléculaire 19.000 a son extrémité N-terminale bloquée et que le clivage au bromure de cyanogène des deux formes moléculaires donne des fragments peptidiques identiques. Nous en concluons que ces deux polypeptides sont deux formes de la même molécule.

L'interrogation des banques de données a permis de mettre en évidence une homologie de séquence importante avec la cyclophiline.

La cyclophiline est une molécule cytoplasmique intervenant dans le mécanisme de la division et de la différenciation cellulaire. Elle

possède la propriété de fixer un agent immunosuppresseur: la ciclosporine A.

Nous avons montré que, de même, le facteur de croissance isolé du lait fixe la ciclosporine A. De plus, la ciclosporine A inhibe son activité mitogène.

De part ses homologies de séquence avec la cyclophiline, de ses propriétés physico-chimiques analogues et de sa capacité de fixer la ciclosporine A, nous proposons de le dénommer "facteur de croissance semblable à la cyclophiline" ou "cyclophilin-like growth factor" et d'utiliser l'abréviation CGF.

4-Les premiers essais concernant l'étude des propriérés biologiques du CGF ont montré qu'il n'agit pas en synergie avec les facteurs de croissance fibroblastiques acide et basique. Il serait angiogène in vivo, sur la membranne chorio-allantoïdienne de l'oeuf de Poule.

5-Dans l'état actuel de nos connaissances, nous proposons un mécanisme d'action hypothétique de la cyclophiline et du facteur de croissance semblable à la cyclophiline: le CGF posséderait un récepteur membranaire spécifique; internalisé, il jouerait dans la cellule un rôle identique à celui de la cyclophiline; il agirait en se fixant sur un ligand qui pourrait être un récepteur de la membrane nucléaire; la fixation de la cyclophiline et/ou du CGF sur ce récepteur de la membrane nucléaire provoquerait la duplication de l'ADN et la division de la cellule.

Un travail considérable devra être entrepris pour comprendre et connaître toutes les implications biochimiques et physiologiques du CGF.

Le CGF devrait susciter un attrait aussi important que d'autres facteurs de croissance tels que l'EGF ou le FGF et on peut entrevoir dès aujourd'hui des applications thérapeutiques, en particulier lors de traitements faisant appel à la ciclosporine A.

On sait aujourd'hui que le facteur de croissance épidermique intervient dans le développement du tractus digestif. La lactotransferrine interviendrait, outre comme transporteur du fer, comme facteur de croissance au niveau des cellules des cryptes intestinales. Le CGF pourrait également jouer un rôle physiologique au niveau du tractus digestif. Pour cela, plusieurs conditions doivent-être réunies:

- ne pas être dégradé au cours de la digestion
- être présent à une concentration suffisante
- posséder un récepteur sur les cellules cibles du tractus digestif et/ou traverser la barrière intestinale sans être dégradé.

L'étude du rôle du CGF sur le développement du tractus digestif du nourrisson constitue le prolongement de notre travail, dans le cadre de la thématique du Laboratoire.

BIBLIOGRAPHIE

ABBUD-FILHO M., KUPIEC-WEGLINSKI J.W., ARAUJO J.L., HEIDECKE C.D., TILNEY N.L., STROM T.B. (1984) Cyclosporin therapy of rat heart allograph reciepients and release of interleukins (IL1, IL2, IL3) A role for IL 3 in graft tolerance? J. Immunol. 133, 2582-2587

ABRAHAM J.A., MERGIA A., WHANG J.L., TUMOLO A., FRIEDMAN J., HJERRILD A., GOSPODAROWICZ D., FIDDES J.C. (1986) Nucleotide Sequence of a bovine Clone Encoding the Angiogenic Protein, Basic Fibroblast Growth Factor. Science 233, 545-548

ABRAHAM J.A., WHANG J.L., TUMOLO A., MERGIA A., FRIEDMAN J., GOSPODAROWICZ D., FIDDES J. (1986b) Human basic fibroblast growth factor: nucleotide sequence and genomic organization. EMBO J. 5, 2523-2528

ADASHI E.Y., RESNICK C.E., CROFT C.S., MAY J.V., GOSPODAROWICZ D. (1988) Basic fibroblast growth factor as a regulator of ovarian granulosa cell differentiation: a novel non-mitogenic role. Mol. Cell. Endocrinol. 55, 7-14

AL-NAFUSSI A.I., WRIGHT N.A. (1982) The Effect of Epidermal Growth Factor (EGF) on Cell Proliferation of The Gastrointestinal Mucosa in Rodents. Virchows Archiv B 40, 63-69

ANDRUS L., LAFFERTY J.K. (1982) Inhibition of T-Cell Activity by Cyclosporin A. Scand. J. Immunol. 15, 449-458

ANGELETTI R.J., BRADSHAW R.A. (1971) Nerve growth factor from mouse salivary gland: amino acid sequence. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68, 2417-2420

BAIRD A., DURKIN T. (1986) INHIBITION OF ENDOTHELIAL CELL PROLIFERATION BY TYPE B-TRANSFORMING GROWTH FACTOR: INERACTIONS WITH ACIDIC AND BASIC FIBROBLAST GROWTH FACTORS. Biochem. Biophys. Res. Commun. 138, 476-482

BAIRD A., LING N. (1987) Fibroblast Growth Factors are Present in the Extracellular Matrix Produced by Endothelial Cells In Vitro: Implication for a Role of Heparinase-like Enzymes in the Neovascular Response. Biochem. Biophys. Res. Commun. 142, 428-435

BAIRD A., MORMEDE P., YING S., WEHRENBERG W.B., UENO N., LING N., GUILLEMIN R. (1985) A nonmitogenic pituitary function of fibroblast growth factor: Regulation of thyrotropin and prolactin secretion. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 5545-5549

BANO M., SALOMON D.S., KIDWELL W.R. (1985) Purification of a Mammary-derived Growth Factor from Human Milk and Human Mammary Tumors. J. Biol. Chem. 260, 5745-5752

BAXTER C.R., DUGGIN G.G., HALL B.M., HORVATH S.S., TILLER D.J. (1984) Stimulation of renin release from rat renal cortical slices. Res. Comm. Chem. Pharmacol. 43, 417-425

BAXTER R.C., ZALTSMAN Z., TURTLE J.R. (1984) Immunoreactive Somatomedin-C/Insulin-Like Growth Factor I and Its Binding Protein in Human Milk. J. Clin. Endocrinol. Metab. 58, 955-959

BEARDMORE J.M., LEWIS-JONES D.I., RICHARDS R.C. (1983) Urogastrone and Lactose concentrations in Precolostrum, Colostrum, and Milk. Pediat. Res. 17, 825-828

BEFRITS R., JOHANSSON C. (1985) Oral PGE2 inhibits gastric acid secretion in man. Prostaglandins 29, 143-152

BERSETH C.L. (1987) Enhancement of intestinal growth in neonatal rats by epidermal growth factor in milk. Amer. J. Physiol. 193, G662-G665

BERSETH C.L., LICHTENBERGER L.M., MORRIS F.H. (1983) Comparison of the gastrointestinal growth-promoting effects of rat colostrum and mature milk in newborn rats in vivo. Am. J. Clin. Nutr. 37, 52-60

BLACKBERG L., HERNELL O. (1980) Isolation of lactoferrin from human whey by a single chromatographic step. FEBS Lett. 109, 180-184

BLAY J., BROWN K.D. (1985) Epidermal growth factor promotes the chemotactic migration of cultured rat intestinal epithelial cells. J. Cell. Physiol. 124, 107-112

BOESMAN-FINKELSTEIN M., FINKEKSTEIN R.A. (1982) Sequential purification of lactoferrin, lysozyme and secretory immunoglobulin A from human milk. FEBS Lett. 144, 1-5

BOREL J.F. (1976) Comparative study of in vitro drug effects on cell-mediated cytotoxicity. Immunology 31, 631-641

BOREL J.F., FEURER C., GUBLER H.W., STAHELIN H. (1976) Biologocal effects of cyclosporin A: A new antilymphocyte agent. Agents Actions 61, 468-475

BOUCHE G., GAS N., PRATS H., BALDIN V., TAUBER J.-P., TEISSIE J., AMALRIC F. (1987) Basic fibroblast growth factor enters the nucleolus and stimulates the transcription of ribosomal genes in ABAE cells undergoing Go-G1 transition. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 6770-6774

BOVI P.D., CURATOLA A.M., KERN F.G., GRECO A., ITTMAN M., BASILICO C. (1987) An oncogene Isolated by Transfection of Kaposi's Sarcoma DNA Encodes a Growth Factor That Is a Member of the FGF Family. Cell 50, 729-737

BRADFORD M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principe of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-254

BROWN K.D., BLAKELEY D.M. (1983) Cell growth-promoting activity in mammary secretions of the goat, cow and sheep. Br. Vet. J. 139, 68-70

BROWN K.D., BLAKELEY D.M. (1984) Partial Purification and characterization of a growth factor present in goat's colostrum. Similarities with platelet-derived growth factor. Biochem. J. 219, 609-617

BROWN K.D., BLAKELEY D.M., FLEET I.R., HAMON M., HEAP R.B. (1986) Kinetics of transfert of 125I-labelled epidermal growth factor from blood into mammary secretions of goats. J. Endocr. 109, 325-332

BUNJES D., HARDT C., ROLLINGHOFF M., WAGNER H. (1981) Cyclosporin A mediates immunosuppression of primary cytotoxic T cell responses by impairing the release of interleukin 1 and interleukin 2. Eur. J. Immunol. 11, 657-661

BURNETTE M.N. (1981) "Western blotting": Electrophoretic transfert of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibodies and radioionidated Protein A. Anal. Biochem. 112, 195-203

CALVERT R., BEAULIEU J.F., MENARD D. (1982) Epidermal growth factor (EGF) accelerates the maturation of fetal mouse intestinal mucosa in utero. Experientia 38, 1096-1097

CARDON S.B., LARSON D.F., RUSSEL D.H. (1984) Rapid elevation of rat serum prolactin concentration by cyclosporine a novel immunosuppressive drug. Biochem. Biophys. Res. Commun. 120, 614-618

CARPENTER G. (1980) Epidermal Growth Factor Is a Major Growth-Promoting Agent in Human Milk. Science 210, 198-200

CERA K., MAHAN D.C., SIMMEN F.A. (1987) In-vitro growth promoting activity of porcine mammary secretions: initial charcterization and relationship to known peptide growth factors. J. Anim. Sci. 65, 1149-1159

CHABOT J.G., WALKER P., PELLETIER G. (1987) Demonstration of epidermal growth factor-binding sites in the adult rat small intestine by autoradiography. Can. J. Physiol. Pharmacol. 65, 109-112

CHAPUT M., CLAES V., PORTETELLE D., CLUDTS I., CRAVADOR A., BURNY A., GRAS H., TATAR A. (1988) The neurotrophic factor neuroleukin is 90% homologus with phosphohexose isomerase. Nature (London) 332, 454-455

CHOPRA D.P., SIDDIQUI K.M., COONEY R.A. (1987) Effects of Insulin, Transferrin, Cholera Toxin, and Epidermal Growth Factor on Growth and Morphology of Human Fetal Normal Colon Epithelial Cells. Gastroenterol. 92, 891-904

COHEN S. (1960) Purification of a nerve growth promoting protein from the mouse saliva gland and neurocytotoxic antiserum. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 46, 302-311

COHEN S. (1962) Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the newborn animal. J. Biol. Chem. 237, 1555-1562

COLOMBANI P.M., ROBB A., HESS A.D. (1985) Cyclosporin A binding to calmodulin: a possible site of action on T-lymphocytes. Science 228, 337-339

CONNOLLY D.T., STODDARD B.L., HARAKAS N.K., FEDER K. (1987) HUMAN FIBROBLAST-DERIVED GROWTH FACTOR IS A MITOGEN AND CHEMOTRACTANT FOR ENDOTHELIAL CELLS. Biochem. Biophys. Res. Commun. 144, 705-712

CONTEAS C.N., MAJUMDAR A.P.N. (1987) The Effects of Gastrin, Epidermal Growth Factor, and Somatostatin on DNA Synthesis in a Small Intestine Crypt Cell Line(IEC-6). Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 184, 307-311

CORPS A.N., BLAKELEY D.N., CARR J., REES L.H., BROWN K.D. (1987) Synergistic stimulation of Swiss mouse 3T3 fibroblast by epidermal growth factor and others factors in human mammary secretions. J. Endocr. 112, 151-159

CORPS A.N., BROWN K.D. (1987) Stimulation of intestinal epithelial cell proliferation in culture by growth factors in human and ruminant mammary secretions. J. Endocr. 113, 285-290

COSMAN D. (1988) Colony-stimulating factors in vivo and in vitro. Immunol. Today 9, 97-98

COUGHLIN S.R., BARR P.J., COUSENS L.S., FRETTO L.J., WILLIAMS M.T. (1988) Acidic and basic fibroblast growth factors stimulates tyrosine kinase activity in vivo. J. Biol. Chem. 263, 988-993

DAI S., KLAGSBRUN M., SHING Y.W. (1985) Human Milk-Derived Growth Factor prevents duodenal ulcer formation. Pediatr. Res. 19, 916-918

DALGARNO D.C., HARDING M.W., LAZARIDES R.E., HANDSCHUMACHER R.E.; ARMITAGE I.M. (1986) 1H NMR Studies on Bovine Cyclophilin: Preliminary Structural Characterization of This Specific Cyclosprin A Binding Protein. Biochemistry 25, 6778-6784

DANIELSON P.E., FORSS-PETERS S., BROW M.A., CALAVETTA L, DOUGLASS J., MILNER R.J., SURCLIFFE J.G. (1988) p1B15: A cDNA Clone of the Rat mRNA Encoding Cyclophilin. DNA 7, 261-267

DEMBINSKI A., GREGORY H., KONTUREK S.J., POLANSKI M. (1982) Trophic action of epidermal growth factor on the pancreas and gastroduodenal mucosa in rats. J. Physiol. 325, 35-42

DERYNCK R., JARRET J.A., CHEN E.Y., EATON D.H., BELL J.R., ASSOIAN R.K., ROBERTS A.B., SPORN M.B., GOEDDEL D.V. (1985) Human transforming growth factor-b cDNA sequence and expression in tumors cell lines. Nature (London) 316, 701-705

DICKSON C., PETERS G. (1987) Potential oncogene product related to growth factors. Nature (London) 326, 833-835

DOWNWARD J., YARDEN Y., MAYES E., SCARCE G., TOTTY N., STOCKWELL P., ULLRICH A., SCHLESSINGER J., WATERFIELD M.D. (1984) Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb B oncogene protein sequences. Nature (London) 307, 521-527

EKMAN R., IVARSSON S., JANSSON L. (1985) Bombensin, neurotensin and pro-gamma-melanotropin immunoreactants in human milk. Regulatory peptides 10, 99-105

ELEK S.D. (1948) The recognition of toxigenic bacterial strains in vitro. Brit. Mes. J. 1, 493-497

ELLIOT J., LIN Y., MIZEL S., BLEACKLEY R., HARNISH D., PAETKAN V. (1984) Induction of interleukin 2 messenger RNA inhibited by cyclosporin A. Science 226, 1439-1441

FALCONER J. (1987) Oral Epidermal Growth Factor is Trophic for the Stomach in the Neonatal Rat. Biol. Neonate 52, 347-350

FELDMAN E.J., AURES D., GROSSMAN M.I. (1978) Epidermal Growth Factor Stimulates Ornithine Decarboxylase Activity in the Digestive tract of Mouse. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 159, 400-402

FORSS-PETERS S., DANIELSON P., SUTCLIFFE J.G. (1986) Neuron-specific enolase: Complete structure of rat mRNA, multiple transcriptional start sites, and evidence suggesting post-transcriptional control. J. Neurosci. Res. 16, 141-156

FRANCIS G.L., READ L.C., BALLARD F.J., BAGLEY C.J., UPTON F.M., GRAVESTOCK P.M., WALLACE J.C. (1986) Purification and partial sequence analysis of insulin-like growth factor-1 from bovine colostrum. Biochem. J. 233, 207-213

FRANCIS G.L., UPTON F.M., BALLARD F.J., McNEIL K.A., WALLACE J.C. (1988) Insulin-like growth factors 1 and 2 in bovine colostrum. Biochem. J. 251, 95-103

FURLANETTO R.W. (1980) The Somatomedin C binding protein: evidence for a heterologus subunit structure. J. Clin. Endocrin. Metab. 51, 12-19

GALLO-PAYET N., HUGON J.S. (1984) Insulin Receptors in Isolated Adult Mouse Intestinal Cells: Studies in vivo and in Organ Culture. Endocrinology 114, 1885-1892

GAUTSCHI-SAUVA P., JIANG Z.-P., FRATER-SCHRODER M., BOHLEN P. (1987) Acidic fibroblast frowth factor is present in nonneural tissue: isolation and chemical characterization from bovine kidney. Biochemistry 26, 5844-5847

GOSPODAROWICZ D. (1985) Biological activity in vitro and in vivo of pituitary and brain fibroblast growth factor. In: Mediators in Cell Growth and diff. Ford A.L. Maizel eds Raven press N.Y. , 109-134

GOSPODAROWICZ D., MESCHER A.L. (1981) Fibroblast growth factor and vertebrate regeneration. In: Adv. in Neurology: Neurofibromatosis. Riccardi and Mulvihill eds Raven Press 29, 149-171

GOSPODAROWICZ D., NEUFELD G., SCHEIGERER L. (1987) Fibroblast Growth Factor: Structural and Biological Properties. J. Cell. Physiol. Suppl. 5, 15-26

GRAY A., ULLRICH A. (1983) Nucleotide sequence of epidermal growth factor cDNA predicts a 128,000-molecular weight precursor. Nature (London) 303, 722-725

GREENBERG M.E., ZIFF E.B. (1984) Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the c-fos proto-oncogene. Nature (London) 311, 433-438

GREENE H.L., MOORE M.C., SAID H.M., GHISHAN F.K., ORTH D.N. (1987) Intestinal Glucose Transport in Suckling Rats Fed Artificial Milk with and without Added Epidermal Growth Factor. Pediatr. Res. 21, 404-408

GREENE L.A., TISCHLER A.S. (1976) Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 2427-2428

GREGORY H., (1975) Isolation and structure of urogastrone and its relationship to epidermal growth factor. Nature (London) 257, 325-327

GREGORY H., WALSH S., HOPKINS C.R. (1979) The identification of urogastrone in serum, saliva and gastric juice. Gastroenterology 77, 313-318

GRESIK E.W., VAN DER NOEN H., BARKA T. (1984) Transport of 125I-labelled epidermal growth factor into milk and the effect of sialoadenectomy on milk EGF in mice. Am. J. Physiol. 247, E349-E354

GRUETERS A., ALM J., LAKSHMANAN J., FISHER D.A. (1985a) Epidermal Growth Factor in Mouse Milk during Early Lactation: Lack of Dependency on Submandibular Glands. Ped. Res. 19, 853-856

GRUETERS A., LAKSHMANAN J., TARRIS R., ALM J., FISHER D.A. (1985b) Nerve Growth Factor in Mouse Milk during Early Lactation: Lack of Dependency on Submandibular Salivary Glands. Pediatr. Res. 19, 934-937

GURNEY M.E., HEINRICH S.P., LEE M.R., YIN H.-S. (1986) Molecular cloning and expression of Neuroleukin, a neurotrophic factor for spinal and sensory neurons. Science 234, 566-574

HAENDLER B., HOFER-WARBINEK R., HOFER E. (1987) Complementary DNA for human T-cell cyclophilin. EMBO J. 6, 947-950

HALL R.A. WIDDOWSON E.M. (1979) Response of the organs of rabbits to feeding during their first days after birth. Biol. Neonate 35, 131-139

HAMERMAN D., TAYLOR S., KIRSCHENBAUM I., KLAGSBRUN M., RAINES E.W., ROSS R., THOMAS K.A. (1987) Growth factors with heparin binding affinity in synovial fluid. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 186, 384-389

HANDSCHUMACHER R.E., HARDING M.W., RICE J., DRUGGE R.J. (1984) Cyclophilin: A specific cytosolic binding protein for cyclosporin A. Science 226, 544-547

HARDING M.W., HANDSCHUMACHER R.E., SPEICHER D.W. (1986) Isolation and amino acid sequence of cyclophilin. J. Biol. Chem. 261, 8547-8555

HAUSCHKA P.V., MAVRAKOS A.E., IAFRATI M.D., DOLEMAN S.E., KLAGSBRUN M. (1986) Growth Factors in Bone Matrix. J. Biol. Chem. 261, 12665-12674

HEIRD W.C., SCHWARZ S.M., HANSEN I.H. (1984) Colostrum-induced enteric mucosal growth in beagle puppies. Pediatr. Res. 18, 512-515

HEITZ P.V., KASPER M., VAN NOORDEN S., POLAK J.M., GREGORY H., PEARSE A.G.E. (1978) Immunohistochemical localization of urogastrone to human duodenal and submandibular glands. Gut 19, 408-410

HESS A.D., COLOMBANI P.M. (1986) Cyclosporin : Mechanism of Action : In vitro Studies. Prog. Allergy (Karger, Basel 1986) 38, 198-221

HESS A.D., TUTSCHKA P.J. (1980) Effect of cyclosporin A on human lymphocyte responses in vitro. I.CsA allows for the expression of Alloantigen-activated suppressor cells while preferentially inhibiting the induction of cytosolytic effector lymphocytes in MLR. J. Immunol. 124, 2601-2608

HESS A.D., TUTSCHKA P.J., PU Z., SANTOS G.W. (1982) Effect of cyclosporin A on human lymphocyte responses in vitro. IV. Production of T cell stimulatory growth factors and development of responsiveness to these growth factors in CsA-treated primary MLR cultures. J. Immunol. 128, 360-367

HESS A.D., TUTSCHKA P.J., SANTOS G.W. (1981) Effect of cyclosporin A on human lymphocyte responses in-vitro. II. Induction of specific alloantigen unresponsiveness mediated by a nylon wool adherent suppressor cell. J. Immunol. 126, 961-968

HIDEKI Y., SHIGEYOSHI S., TAKASHI N., KANJI N., TAKAYOSHI K. (1986) Epidermal Growth Factor in Cow's Milk and Milk Formulas. Acta Pediatr. Scand. 75, 233-235

HIRAKI Y., KATO Y., INOUE H., SUZUKI F. (1986) Stimulation of DNA synthesis in quiescent rabbit chondrocytes in culture by limited exposure to somatomedin-like growth factors. Eur. J. Biochem. 158, 333-337

HU W.-L., MAZURIER J., SAWATZKI G., MONTREUIL J., SPIK G. (1988) Lactotransferrin receptor of mouse small-intestinal brush border. Biochem. J. 249, 435-441

JAEGER L.A., LAMAR C.H., BOTTOMS G.D., CLINE T.R. (1987) Growth-stimulating substances in porcine milk. Am. J. Vet. Res. 48, 1531-1533

JAMES R., BRADSHAW R.A. (1984) Polypeptides Growth Factors. Ann. Rev. Biochem. 53, 259-292

JANSSON L., KARLSON F.A., WESTERMARK B. (1985) Mitogenic Activity and Epidermal Growth Factor Content in Human Milk. Acta Pediatr. Scand. 74, 250-253

JASPAR J.M., FRANCHIMONT P. (1985) Radioimmunoassay of Human Epidermal Growth Factor in Human Breast Cyst Fluid. Eur. J. Clin. Oncol. 21, 1343-1348

JOHANSSON C., ALY A., KOLLBERG B., RUBIO C., ERIKOINEN T., HELANDER H.F. (1983) Trophic action of oral E2 prostaglandins on rat gastrointestinal mucosa. In: Samuelson, Paoletti, Ramwel, eds. Advances in prostaglandin, Raven Press N.Y 12, 403-407

KALMAN V.K., KLIMPEL G.R. (1983) Cyclosporin A inhibits the production of Gamma Interferon, but does not inhibit production of virus-induced Interferon alpha/bêta. Cell. Immunol. 78, 122-129

KATO Y., IWAMOTO M., KOIKE T. (1987) Fibroblast growth factor stimulates colony formation of differentiated chondrocytes in soft agar. J. Cell. Physiol. 133, 491-498

KELLY K., COCHRAN B.H., STILES C.D., LEDER P. (1983) Cell specific regulation of the c-myc gene by lymphocyte mitogens and platelet-derived growth factor. Cell 35, 603-610

KINASHI T., HARADA N., SEVERINSON E., TANABE T., SIDERAS P, KONISHI M. (1986) Cloning of complementary DNA encoding T-cell replacing factor and identity with B-cell growth factor II. Nature (London) 324, 70-73

KLAGSBRUN M. (1978) Human Milk stimulates DNA synthesis and cellular proliferation in cultured fibroblasts. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75, 5057-5061

KLAGSBRUN M. (1980) BOVINE COLOSTRUM SUPPORTS THE SERUM-FREE PROLIFERATION OF EPITHELIAL CELLS BUT NOT OF FIBROBLASTS IN LONG-TERM CULTURE. J. Cell Biol. 84, 808-814

KNIGHTON D., AUSPRUNK D., TAPPER D, FOLKMAN J. (1977) Avascular and vascular phases of tumour growth in chick embryo. Br. J. Cancer 35, 347-356

KOLDOVSKY O., BEDRICK A., POLLACK P., RAO R.K., THORNBURG W. (1986) The possible role of hormones and hormones-related subtances present in milk. In: Biology of human milk, Proc. of 14th Nestle Nutrition Workshop,Athens Greece , 86-92

KOLETSKY A.J., HARDING M.W., HANDSCHUMACHER R.E. (1986) Cyclophilin: Distribution and variant properties in normal and neoplasic tissues. J. Immunol. 137, 1054-1059

KONTUREK S.J., RADECKI T., BRZOZOWSKY T., PIASTUCKI I., DEMBINSKI A., DEMBINSKA-KIEC A., ZMUDA A., GRYGLEWSKI R., GREGORY H. (1981) Gastric Cytoprotection by Epidermal Growth Factor. Gastroenterology 81, 438-443

KUROKAWA M., LYNCH K., PODOLSKY D.K. (1987) EFFECTS OF GROWTH FACTORS ON AN EPITHELIAL CELL LINE: TRANSFORMING GROWTH FACTOR BETA INHIBITS PROLIFERATION AND STIMULATES DIFFERENTIATION. Biochem. Biophys. Res. Commun. 142, 775-782

LAEMMLI U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature (London) 277, 680-682

LANDSHMAN N., BELKIN M., BEN-HANAN I., BEN-CHAIM O., ASSIA E., SAVION N. (1987) Regeneration of cat corneal endothelium induced in-vivo by fibroblast growth factor. Exp. Eye Res. 45, 805-811

LAWRENCE D.A., PIRCHER R., KRYCEVE-MARTINERIE C., JULLIEN P. (1984) Normal embryo fibroblasts release transforming growth factors in a latent form. J. Cell. Physiol. 121, 184-188

LEE F., YOKOTA T., OTSUKA T., MEYERSON P., VILLARET D., ARAI K.-I. (1986) Isolation and characterization of a mouse interleukin cDNA clone that expresses B-cell stimulatory factor 1 activities and T-cell-and

mast-cell-stimulating activities. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 2061-2065

LEGRUE S.J., FRIEDMAN A.W., KAHAN B.D. (1983) Lack of evidence for a cyclosporin receptor on human lymphocyte membranes. Transplant Proc. 15, 2259-2264

LEVI-MONTALCINI R., HAMBURGER V. (1951) Selective growth stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo. J. Exp. Zool. 116, 321-351

LOBB R.R., HARPER J.W., FETT J.W. (1986) Purification of Heparin-Binding Growth Factors. Anal. Biochem. 154, 1-14

MAGNALDO I., L'ALLAMAIN G., CHAMBARD J.C., MOENNER M., BARRITAULT D., POUYSSEGUR J. (1986) The Mitogenic Signaling Pathway of Fibroblast Growth Factor Is Not Mediated through Polyphosphoinositide Hydrolysis and Protein Kinase C Activation in Hamster Fibroblasts. J. Biol. Chem. 261, 16916-16922

MAJUMDAR A.P.N. (1984) Postnatal undernutrition effect of epidermal growth factor on growth and function of the gastrointestinal tract in rat. J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 3, 618-625

MALO C., MENARD D. (1982) Influence of Epidermal Growth Factor on the Development of Suckling Mouse Intestinal Mucosa. Gastroenterol. 83, 28-35

MAZURIER J., MONTREUIL J., SPIK G. (1985) Vizualization of lactotransferrin brush-border receptors by ligand-blotting. Biochim. Biophys. Acta 821, 453-460

MCKINNON R., DANIELSON P.E., BROW M.A.D., BLOOM F.E., SUTCLIFFE J.G. (1987) Transcription of small cytoplasmic transcripts of the rat identifier elements in vivo and in cultured cells. Mol. Cell. Biol. 7, 2148-2154

MERKER M.M., RICE J., SCHWEITZER B., HANDSCHUMACHER R.E. (1983) Cyclosporin binding component in BW5147 lymphoblasts and normal lymphoid tissue. Transplant Proc. 15, 2265-2270

MINGARI M.C., GEROSA F., CARRA G., ACCOLLA R.S., MORETTA A., ZUBLER R.H., WALDMANN T.A., MORETTA L. (1984) Human interleukine-2 promotes proliferation of activated B cells via surface receptors similar to those of activated T cells. Nature (London) 312, 641-643

MIRA-Y-LOPEZ R., JOSEPH-SILVERSTEIN J., RIFKIN D.B., OSSOWSKI L. (1986) Identification of a pituitary factor responsible for enhancement of plasminogen activator activity in breast tumor cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 7780-7784

MOCHIZUKY D.Y., EISENMAN J.R., CONLON P.J., LARSEN A.D., TUSHINSKI R.J. (1987) Interleukin 1 regulates hematopietic activity, a role previously ascribed to hemopoietin 1. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 5267-5271

MONTESANO R., VASSALLI J.D., BAIRD A., GUILLEMIN R., ORCI L. (1986) Basic fibroblast growth factor induces angiogenesis in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 7297-7301

MONTREUIL J., TONNELAT J., MULLET S. (1960) Préparation et propriétés de la lactosiderophiline (lactotransferrine) du lait de Femme. Biochim. Biophys. Acta 45, 413-421

MORAN J.R., COURTNEY M.E., ORTH D.N., VAUGHAN R., COY S., MOUNT C.D., SHERRELL B.J., GREENE H.L. (1983) Epidermal growth factor in human milk: Daily production and diurnal variation during early lactation in mothers delivering at term and at premature gestation. J. Pediat. 103, 402-405

MOSCATELLI D., JOSEPH-SILVERSTEIN J., PRESTA M., RIFKIN D.B. (1988) Multiple forms of an angiogenic factor: basic fibroblast growth factor. Biochimie 70, 83-87

MOSES H.L., BRANUM E.L., PROPER J.A., ROBINSON R.A. (1981) Transforming growth factor production by chemically transformed cells. Cancer Res. 41, 2842-2848

MULCAHY L.S., SMITH M.R., STACEY D.W. (1985) Requirement for ras proto-oncogene function during serum stimulated growth of NIH 3T3 cells. Nature (London) 313, 241-243

MURAGUCHI A., BUTLER J.L., KEHRL J.H., FALKOFF R.J., FAUCI A.S. (1983) Selective suppression of an early step in human B cell activation by cyclosporin A. J. Exp. Med. 158, 690-702

NEUFELD G., GOSPODAROWICZ D. (1985) The Identification and Partial Characterization of the Fibroblast Growth Factor Receptor of Baby Hamster Kidney Cells. J. Biol. Chem. 260, 13860-13868

NICHOLS B.L., MCKEE K.S., HENRY J.F., PUTMAN M. (1987) Human Lactoferrin Stimulates Thymidine Incorporation into DNA of Rat Crypt Cells. Pediatr. Res. 21, 563-567

OKA Y., GHISHAN F.K., GREENE H.L., ORTH D.N. (1983) Effect of Mouse Epidermal Growth Factor/Urogastrone on the Functional Maturation of Rat Intestine. Endocrinol. 112, 940-944

OUCHTERLONY O. (1949) Antigen-antibody reactions in gel. Acta Pathol. Microbiol. Scandinav. 26, 507-510

PALACIOS R. (1982) Concavalin A triggers T lymphocytes by directly interacting with their receptors for activation. J. Immunol. 128, 337-342

PALACIOS R., MOLLER G. (1981) Cyclosporin A blocks receptors for HLA-DR antigens on T cells. Nature (London) 290, 792-794

PANET R., AMIR I., ATLAN H. (1986) Fibroblast growth factor induces a transient net K+ influx carried by the butamide-sensitive transporter in quiescent BALB/c3T3 fibroblast. Biochem. Biophys. Acta 859, 117-121

PESONEN K., VIINIKKA L., KOSHKIMIES A., BANKS A.R., NICOLSON M., PERHEENTUPA J. (1987) SIZE HETEROGENEITY OF EPIDERMAL GROWTH FACTOR IN HUMAN BODY FLUIDS. Life Sciences 40, 2489-2494

PETRIDES P.E., HOSANG M., SHOOTER E., ESCH F.S., BOHLEN P. (1985) Isolation and characterization of epidermal growth factor from human milk. FEBS Lett. 187, 89-96

PLOUET J., COURTY J., OLIVIE M., COURTOIS Y., BARRITAULT D. (1984) A highly reliable and sensitive assay for the purification of cellular Growth Factors. Cell. Mol. Biol. 30, 105-110

POTHIER P., MENARD D. (1988) Presence and characteristics of epidermal growth factor receptors in human fetal small intestine and colon. FEBS Lett. 228, 113-117

PUCCIO F., LEHY T. (1988) Oral administration of epidermal growth factor in suckling rat stimulates cell DNA synthesis in fundic and antral gastric mucosae as well as in intestinal mucosa and pancreas. Regul. Peptides 20, 53-64

QUESNIAUX V.F.J., SCHREIER M.H., WENGER R.M., HIESTAND P.C., HARDING M.W., VAN REGENMORTEL M.H.V. (1987) Cyclophilin binds to the region of cyclosporine involved in its immunosuppressive activity. Eur. J. Immunol. 17, 1359-1365

QUESNIAUX V.F.J., SCHREIER M.H., WENGER R.M., HIESTAND P.C., VAN REGENMORTEL M. (1988) Cyclosporine-Cyclophilin Interaction. Transplant Proc. 10 2S2, 58-62

RAINES (1986) Communication orale, Club des facteurs de croissance, Villejuif

RALL L.B., SCOTT J., BELL G.I., CRAWFORD R.J., PENSCHOW J.D., NIALL H.D., COGHLAN J.P. (1985) Mouse pre-pro-epidermal growth factor synthesis by kidney and others tissues. Nature (London) 313, 228-231

READ L.C., FRANCIS G.L., BALLARD J. (1985) Milk Growth Factors: Concentration in Human Milk and Effects of Premature Birth. In: Physiological Develppement of the Fetus and Newborn, Academic Press, London , 28-32

REEM G.H., COOK L.A., VILECK J.H. (1983) Gamma interferon synthesis by human thymocytes and T lymphocytes inhibited by Cyclosporin A. Science 221, 63-65

RINDERKNECHT E., HUMBEL E. (1978a) The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin J. Biol. Chem. 253, 2769-2776

RINDERKNECHT E., HUMBEL E. (1978b) Primary structure of human insulin-like growth factor II. FEBS Lett. 89, 283-286

RISAU W. (1986) Developing brain produces an angiogenesis factor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 3855-3859

ROBB R.J. (1984) Interleukin 2: The molecule and its function. Immunol. Today 5, 203-209

ROSE S.P., PRUSS R.M., HERSCHMAN H.R. (1975) Initiation of 3T3 fibroblast cell division by epidermal growth factor. J. Cell. Physiol. 86, 593-598

ROSS R. (1987) Platelet-derived growth factor. Ann. Rev. Med. 38, 71-79

ROSS R., VOGEL A. (1978) The platelet derived growth factor (review). Cell 14, 203-210

ROZENGURT E. (1986) Early Signals in the Mitogenic Response. Science 234, 161-166

RUSSEL D.H., LARSON D.F., CARDON S.B., COPELAND J.G. (1984) Cyclosporin inhibits prolactin induction of ornithine decarboxylase in rat tissues. Mol. Cell. Endocrinol. 35, 159-166

RYDEL R. E., GREENE L.A. (1987) Acidic and Basic Fibroblast Growth Factors Promote Stable Neurite Outgrowth and Neuronal Differentiation in cultures of PC12 Cells. J. Neurosci. 7, 3639-3653

RYFFEL B., GOTZ U., HEUBERGER B. (1982) Cyclosporin receptors on human lymphocytes. J. Immunol. 129, 1978-1982

SCHEVING L.A., YEH Y.C., TSAI T.H., SCHEVING L.E. (1979) Circadian Phase-Dependent Stimulatory Effects of Epidermal Growth Factor on Deoxyribonucleic Acid Synthesis in the Tongue, Esophagus, and Stomach of the Adult Male Mouse. Endocrinology 105, 1475-1480

SCHEVING L.A., YEH Y.C., TSAI T.H., SCHEVING L.E. (1980) Circadian Phase-Dependent stimulatory Effects of Epidermal Growth Factor on Deoxyribonucleic Acid Synthesis in the Duodenum, Jejunum, Ileum, Caecum, Colon, and Rectum of the Adult Male Mouse. Endocrinology 106, 1498-1503

SCHWEIGERER L., MALERSTEIN B., NEUFELD G., GOSPODAROWICZ D. (1987a) Basic fibroblast growth factor is synthesized in cultured retinal pigment epithelial cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 143, 934-940

SCHWEIGERER L., NEUFELD G., MERGIA A., ABRAHAM J.A., FIDDES J.C., GOSPODAROWICZ D. (1987b) Basic fibroblast growth factor in human rhabdomyosarcoma cells: Implication for the proliferation and neovascularizationof myoblast-derived tumors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 842-846

SEPPE H.E.J., GROTENDORST G.R., SEPPA S.I., SCHIFFMANN E., MARTIN G.R. (1982) The platelet-derived growth factor is chemotactant for fibroblasts. J. Cell. Biol. 92, 584-588

SERENI A., BASERGA R. (1981) Routine growth of cell lines in medium supplemented with milk instead of serum. Cell Biol. Int. Reports 5, 339-345

SHERR C.J., RETTENMIER C.W., SACCA R., ROUSSEL M.F., LOOK A.T., STANLEY E.R. (1985) The c-fms proto-oncogene product is related to the receptor for the mononuclear phagocyte growth factor, CSF-1. Cell 41, 665-676

SHING Y., KLAGSBRUN M. (1984) Human and Bovine Milk Contain Different Sets of Growth Factors. Endocrinology 115, 273-282

SHING Y., KLAGSBRUN M. (1987) Purification and Characterization of a Bovine Colostrum-Derived Growth Factor. Mol. Endocrinol. 1, 335-338

SINHA S.K., YUNIS A.A. (1983) ISOLATION OF COLONY STIMULATING FACTOR FROM HIMAN MILK. Biochem. Biophys. Res. Commun. 114, 797-803

SLACK J.M.W., DARLINGTON B.G., HEATH J.K., GODSAVE S.F. (1987) Mesoderm induction in early Xenopus embryos by heparin-binding growth factors. Nature (London) 326, 197-200

SMITH K.A. (1984) Interleukin 2. Ann. Rev. Immunol. 2, 319-333

SOLAL-CELIGNY P. (1988) Intérêt thérapeutique des facteurs de croissance granulo-monocytaires. Medecine/Science 4, 231-238

SPIK G., BRUNET B., MAZURIER-DEHAINE C., FONTAINE G., MONTREUIL J. (1982) Characterization and properties of the human and bovine lactotransferrins extracted from the faeces of newborn infants. Acta Pediatr. Scand. 71, 979-985

SPORN M.B., ROBERTS A.B. (1988) Peptide growth factors are multifunctional. Nature (London) 332, 217-219

SPORN M.B., TODARO G.J. (1980) Autocrine secretion and malignant transformation of cells. N. Engl. J. Med. 303, 878-880

STAEHELI P., DANIELSON P.E., HALLER O., SUTCLIFFE J.G. (1986) Transcriptional activation of mouse Mx gene by type I interferon. Mol. Cell. Biol. 6, 4770-4774

STEIMER K.S., KLAGSBRUN M. (1981) Serum-free growth of normal and transformed fibroblasts in milk: differential requirements for fibronectin. J. Cell. Biol. 88, 294-300

STEIMER K.S., PACKAR R., HOLDEN D., KLAGSBRUN M. (1981) The serum-free growth of cultured cells in bovine colostrum and in milk obtained later in the lactation period. J. Cell. Physiol. 109, 223-

SUBBIAH M.T.R., YUNKER R.L., YAMAMOTO M., KOTTKE B.A., BALE L.K. (1985) HUMAN BREAST MILK STIMULATES PROSTAGLANDIN SYNTHESIS IN CULTURED HUMAN SKIN FIBROBLASTS. Biochem. Biophys. Res. Commun. 129, 972-976

SULLIVAN R., KLAGSBRUN M. (1985) Purification of Cartilage-derived Growth Factor by Heparin Affinity Chromatography. J. Biol. Chem. 260, 2399-2403

THOMAS K.A., GIMENEZ-GALLEGO G. (1986) Fibroblast growth factors: broad spectrum mitogens with potent angiogenic activity. TIBS 11, 81-84

THOMSON A.W., MOON D.K., NELSON D.S. (1983) Suppression of delayed-type hypersensitivity reactions and lymphokine production by cyclosporin A in the mouse. Clin. Exp. Immunol. 52, 599-606

THORNBURG W., KOLDOVSKY O. (1987) Hormone and hormone related substances in milk. J. Pediatr. Gastro. Nutr. 6, -

THORNBURG W., MATRISIAN L., MAGUN B., KOLDOVSKY O. (1984) Gastrointestinal absorption of epidermal growth factor in suckling rats. Am. J. Physiol. 246, G80-G85

TODARO G., DE LARCO J.E., MARQUARDT H., BRYANT M.L., SHERVING S.A., SLISKI A.H. (1979) Polypeptide growth factors produced by tumor cells and virus transformed cells: a possible growth advantage for the producer cell. In: Book A and B, New York: Cold Spring Harbor 14, 113-127

TODARO G.J., DELARCO J.E., COHEN S. (1976) Transformation by murine and feline sarcoma viruses specifically blocks binding of epidermal growth factor to cells. Nature (London) 264, 26-31

TOWBIN H., STAEHELIN T., GORDON J. (1979) Electrophoretic transfert of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4350-4354

TUCKER R.F., BRANUM E.L., SHIPLEY G.D., RYAN R.J., MOSES H.L. (1984) Specific binding to cultured cells of labeled transforming growth-factor type bêta from human platelets. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 6757-6761

WANG C.-S., KLOER H.-U. (1984) Purification of Human Lysozyme from milk and pancreatic juice. Anal. Biochem. 139, 224-227

WATERFIELD M.D., SCRACE G.T., WHITTLE N., STROOBANT P., JOHSSON A., WASTESON A. , WESTERMARK B., HELDIN C.H., HUANG J.S., DEUEL T.F. (1983) Platelet derived growth factor is structurally related to the putative transforming protein p28sis of simian sarcoma virus. Nature (London) 304, 35-39

WERNER H., KOCH Y., FRIDKIN M., FAHRENKRUG J., GOZES I. (1985) HIGH LEVELS OF VASOACTIVE INTESTINAL PEPTIDE IN HUMAN MILK. Biochem. Biophys. Res. Commun. 133, 228-232

WICE B., MILBRANDT J., GLASER L. (1987) Control of Muscle Differentiation in BC3H1 Cells by Fibroblast Growth Factor and Vanadate. J. Biol. Chem. 262, 1810-1817

WIDDOWSON E.M., COLOMBO V.E., ARTAVANIS C.A. (1976) Changes in the organs of pigs in response to feeding for the first 24 hours after birth. II. The digestive tract. Biol. Neonate 28, 272-281

WONG G.G., CLARK S.C. (1988) Multiple actions of interleukin 6 within a cytokin network. Immunol. Today 9, 137-139

WRIGHT E., GAULL G.E. (1983) Nerve Growth Factor is present in Human Milk. Pediatr. Res. 17, 144A-144A

YOSHIDA T., MIYAGAWA K., ODAGIRY H., SAKAMOTO H., LITTLE P.F.R., TERADA M., SUGIMURA T. (1987) Genomic sequence of hst, a transforming gene encoding a protein homlogus to fibroblast growth factors and the int-2-encoded protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 7305-7309

ZIEGLER K., FRIMMER M. (1986) Identification of cyclosporin binding sites in rat liver plasma membranes, isolated hepatocytes, and hepatoma cells by photoaffinity labeling using (3H) cyclosporin-diaziridine. Biochim. Biophys. Acta 855, 147-156

ZWIEBEL J.A., BANO M., NEXO E., SALOMON D.S., KIDWELL W.R. (1986) Partial Purification of Transforming Growth Factors from Human Milk. Cancer Res. 46, 933-939

RESUME

La mise en évidence en 1978 que l'activité mitogène du lait de Femme pour les fibroblastes était supérieure à celle du sérum a ouvert la voie à un très grand nombre de recherches sur l'identification des facteurs de croissance présents dans le lait et le colostrum de Femme.

Les travaux que nous avons réalisés ont consisté à fractionner les protéines du lactosérum par chromatographie de tamisage moléculaire, d'affinité sur héparine immobilisée et d'échange d'ions et à repérer les fractions mitogènes en mesurant l'incorporation de thymidine tritiée dans des fibroblastes de poumon de Hamster chinois (lignée CCL 39). Les résultats obtenus peuvent se résumer ainsi :

1- La chromatographie de tamisage moléculaire met en évidence une modification du taux et de la nature des facteurs de croissance au cours de la lactation.

2- La chromatographie d'affinité sur héparine permet d'isoler cinq fractions mitogènes. La fraction éluée à 2,4 M en NaCl est un polypeptide pur de 17 kDa qui présente une affinité pour l'héparine supérieure à celle du FGF.

3- La chromatographie sur échangeur d'ions a conduit à la mise en évidence de deux polypeptides mitogènes de 19 et 19,6 kDa présentant tous les deux une homologie de séquence avec la cyclophiline et fixant comme cette dernière une molécule de ciclosporine A. La fixation de la ciclosporine A entraîne une inhibition de leur activité mitogène. Ces facteurs de croissance isolés pour la première fois, du lait de Femme, dénommés cyclophilin-like growth factor ou CGF, constituent une nouvelle famille de facteurs de croissance.