

THESE

présentée à
L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE FLANDRES-ARTOIS

pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE FLANDRES-ARTOIS

Spécialité : SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

par

Daniel DAMART

**ISOLEMENT ET ETUDE DE
L' ANGIOGENINE DU LAIT DE VACHE**

Présentée le 11 Avril 1989 devant la Commission d'Examen

Président : J. MONTREUIL (Rapporteur)
Rapporteur : T. CARTWRIGHT
Rapporteur : A. TARTAR
Examineur : G. SPIK

Ce travail a été réalisé dans le Laboratoire de Chimie Biologique de l'Université des Sciences et Techniques de LILLE FLANDRES-ARTOIS, Unité Associée au C.N.R.S. n° 217, Directeur : Professeur Jean Montreuil, sous la direction du Professeur Geneviève Spik.

A Catherine
avec tout mon amour.

A mes parents et à ma soeur
avec toute mon affection.

Faites dès aujourd'hui le bilan clair et sincère de
votre vie, décidez d'après votre passé ce que doit
être votre avenir mais décidez de vivre d'une
manière généreuse; tout le monde y gagnera; les
autres et vous-même.

Aristide QUILLET, Nouv. Encyclo. Autodidactique.

A Madame le Professeur Geneviève SPIK,

Vous m'avez accueilli avec bienveillance dans votre groupe à l'issue du D.E.A et m'avez confié un travail que j'ai réalisé avec plaisir. Guidé par votre compétence scientifique et votre expérience, j'ai pu apprendre à mener à bien ma tâche. Admiratif devant votre courage, je voudrais, par ces quelques lignes, vous exprimer sincèrement ma gratitude, mon admiration et mon plus profond respect.

A Monsieur le Professeur Jean MONTREUIL,

Vous avez communiqué votre enthousiasme à l'étudiant que j'étais et m'avez accepté dans votre propre groupe de recherche pendant un an. Grâce à vous, j'ai pu ensuite poursuivre mes activités de recherche et bénéficier des moyens exceptionnels dont dispose votre Laboratoire. Pour ces raisons et bien d'autres encore, permettez moi , Monsieur, de vous exprimer ma plus vive reconnaissance et mon plus grand respect.

A Monsieur le Professeur André TARTAR,

La collaboration établie entre le Laboratoire de Chimie des Biomolécules de l'Institut Pasteur que vous dirigez et notre Laboratoire a pu aboutir efficacement et j'ai pris plaisir à vous rencontrer régulièrement durant ces deux dernières années. Aujourd'hui, vous acceptez de juger ce mémoire et je vous en remercie vivement.

A Monsieur le Docteur CARTWRIGHT,

Je suis très honoré de votre présence dans ce jury et vous prie de bien vouloir trouver ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

A **Annick, Monique et Cocoboy** qui m'ont appris à explorer les ribonucléases dans la bonne humeur et l'efficacité. Je vous remercie de tout coeur, soyez sûrs de mon amitié la plus sincère.

Bernadette et Jean-Pierre : l'art de manipuler au service de la conscience professionnelle... Que dire de plus si ce n'est que je vous remercie pour votre collaboration, votre dynamisme et votre amitié.

Pierrette, grâce à ta ténacité, la collaboration établie entre nos deux laboratoires a pu aboutir. Merci pour ton humeur et ton amitié.

A **Christine, Jacqueline, Jeannine, Jo et Michèle** j'adresse mes remerciements pour leur aide, leur sourire et leur contribution à l'ambiance du C9.

Que tous ceux qui m'ont accordé leur amitié et leur aide soient ici remerciés.

SOMMAIRE .

INTRODUCTION

STRUCTURE ET PROPRIETES DE L' ANGIOGENINE .

| | |
|---|---|
| I - <u>ORIGINE DE L' ANGIOGENINE.</u> | 4 |
| A - ISOLEMENT ET PURIFICATION. | 4 |
| B - LOCALISATION. | 5 |
| II- <u>PROPRIETES STRUCTURALES DE L' ANGIOGENINE HUMAINE.</u> | 5 |
| A - STRUCTURE PRIMAIRE. | 5 |
| B - STRUCTURE TRIDIMENSIONNELLE. | 7 |
| III - <u>ACTIVITES BIOLOGIQUES DE L' ANGIOGENINE HUMAINE.</u> | 7 |
| A - ACTIVITE ANGIOGENIQUE. | 7 |
| 1 - <u>Définition de l' angiogénèse.</u> | |
| 2 - <u>Etapas de formation d' un capillaire sanguin.</u> | |
| a - Dégradation de la membrane basale. | |
| b - Migration des cellules. | |
| c - Formation de la lumière du nouveau capillaire. | |
| d - Prolifération cellulaire. | |
| e - Formation d' une boucle. | |
| 3 - <u>Les techniques d' évaluation de l' angiogénèse.</u> | |
| a - Modèles "in vivo". | |
| * Technique des micropoches cornéennes. | |
| * Implantation de polymères dans la cornée. | |
| * Angiogénèse de la membrane chorioallantoïdienne. | |

| | |
|--|----|
| b - Modèles "in vitro". | |
| c - Conclusions. | |
| 4 - <u>Les résultats obtenus avec l'angiogénine humaine.</u> | |
| a - Activité angiogénique sur la membrane chorioallantoïdienne d'oeuf de Poule. | |
| b - Activité angiogénique sur la cornée de Lapin. | |
| B - ACTIVITE RIBONUCLEASIQUE DE L'ANGIOGENINE HUMAINE. | 15 |
| 1 - <u>Spécificité.</u> | |
| 2 - <u>Relation entre l'activité ribonucléasique de l'angiogénine humaine et sa structure.</u> | |
| a - Activité de l'hybride "ANGIOGENINE(1-21)-PROTEINE S". | |
| b - Activité de l'hybride "RNase(1-118)-ANGIOGENINE(108-123)". | |
| c - Activité des hybrides sur les ARN ribosomiques 18 ET 28 S. | |
| d - Importance des résidus d'histidine 13 et 114. | |
| e - Conclusion. | |
| C - INHIBITION DES ACTIVITES RIBONUCLEASIQUE ET ANGIOGENIQUE DE L'ANGIOGENINE HUMAINE. | 19 |
| D - INHIBITION DE LA SYNTHÈSE DES PROTEINES. | 21 |
| E - ACTIVATION DE LA PHOSPHOLIPASE C. | 22 |
| IV - <u>LES AUTRES FACTEURS ANGIOGENIQUES.</u> | 22 |
| A - LES FACTEURS DE CROISSANCE SANS AFFINITE POUR L'HEPARINE. | 22 |
| 1 - <u>Facteurs de faible masse moléculaire.</u> | |
| 2 - <u>Les exudats de plaie.</u> | |
| 3 - <u>Les facteurs de croissance transformants (TGF).</u> | |
| a - le TGF - α | |
| b - le TGF- β | |
| 4 - <u>Le facteur de nécrose tumorale de type α.</u> | |
| B - LES FACTEURS DE CROISSANCE QUI PRESENTENT UNE AFFINITE POUR L'HEPARINE. | 25 |
| 1 - <u>Propriétés physico-chimiques des FGF.</u> | |
| a - Le FGF acide (aFGF). | |

- b - Le FGF basique (bFGF).
 - 2 - Activités biologiques des facteurs de croissance fibroblastiques.
 - 3 - Relation entre le FGF et l'angiogénine.
- C - FACTEURS ANGIOGENIQUES DIVERS. 28
- 1 - Les facteurs mécaniques.
 - 2 - Les interactions intercellulaires.
 - 3 - La matrice extracellulaire.
 - 4 - Le cuivre.
 - 5 - Les lipides.
 - 6 - Les champs électromagnétiques pulsés.
 - 7 - Remarques.
- V - CONCLUSIONS. 30

ISOLEMENT ET ETUDE DE
L' ANGIOGENINE
DU LAIT DE VACHE

ISOLEMENT ET PURIFICATION DE
L' ANGIOGENINE BOVINE .

- I - PURIFICATION DE L' ANGIOGENINE BOVINE A PARTIR DU LAIT DE VACHE. 34
- A - MATERIEL ET METHODES. 34
- 1 - Délipidation du lait.
 - 2 - Chromatographie de "Batch adsorption" des protéines basiques du lait de Vache sur résine SP Séphadex.
 - 3 - Chromatographie sur colonne de S-Sépharose Fast Flow.
 - 4 - Purification de l'angiogénine du lait de Vache par chromatographie sur système FPLC.
 - a - Purification de l'angiogénine bovine sur colonne de Phényl-superose HR 5/5.
 - b - Purification de l'angiogénine bovine sur colonne Mono-S.
 - 5 - Purification de l'angiogénine bovine par chromatographie liquide à haute pression (HPLC).

| | |
|---|----|
| B - RESULTATS. | 36 |
| 1 - <u>Chromatographie de "Batch adsorption" sur SP Séphadex.</u> | |
| 2 - <u>Chromatographie sur colonne de S-Sépharose Fast flow.</u> | |
| 3 - <u>Purification de l'angiogénine du lait de Vache.</u> | |
| a - Chromatographie sur colonne "Phényl-superose". | |
| b - Chromatographie sur colonne "Mono-S". | |
| c - Chromatographie de phase inverse sur système HPLC. | |
| C - DISCUSSION. | 40 |
| II - <u>DETERMINATION DE LA NATURE DES DIFFERENTES FRACTIONS OBTENUES</u> | 43 |
| <u>LORS DU FRACTIONNEMENT DE LA FRACTION F1 SUR COLONNE DE MONO S.</u> | |
| A -MATERIEL ET METHODES. | 43 |
| 1 - <u>Préparation des antiséras.</u> | |
| a - Antisérum dirigé contre la fraction F1. | |
| b - Antisérum dirigé contre l'angiogénine. | |
| 2 - <u>Immunorévélation après électrophorèse en gel de polyacrylamide</u> | |
| <u>en présence de SDS et électrotransfert sur feuille de</u> | |
| <u>nitrocellulose.</u> | |
| a - Electrophorèse en gel de polyacrylamide. | |
| b - Electrotransfert sur feuille de nitrocellulose (Western | |
| blotting). | |
| c - Immunorévélation. | |
| 3 - <u>Techniques immunochimiques classiques.</u> | |
| 4 - <u>Détermination de la séquence N-terminale.</u> | |
| B - RESULTATS. | 46 |
| 1 - <u>Analyse après électrotransfert sur feuille de nitrocellulose.</u> | |
| 2 - <u>Analyse en immunoélectrophorèse.</u> | |
| 3 - <u>Analyse par double immunodiffusion radiale.</u> | |
| 4 - <u>Analyse par immunodiffusion radiale.</u> | |
| 5 - <u>Analyse des acides aminés de la partie N-terminale.</u> | |
| C - CONCLUSION. | 49 |
| III- <u>PURIFICATION DE L'ANGIOGENINE BOVINE A PARTIR D'UNE PREPARATION</u> | 49 |
| <u>INDUSTRIELLE DE LACTOTRANSFERRINE.</u> | |

| | |
|---|----|
| A - CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE DE SEPHADEX G 75 SUPERFINE. | 50 |
| 1 - <u>Matériels et méthode.</u> | |
| 2 - <u>Résultats.</u> | |
| 3 - <u>Interprétation.</u> | |

| | |
|--|--|
| B - SOUS-FRACTIONNEMENT DES FRACTIONS III ET IV SUR COLONNE DE MONO S.53 | |
| 1 - <u>Matériels et Méthode.</u> | |
| 2 - <u>Résultats.</u> | |
| a - Analyse de la fraction III. | |
| b - Analyse de la fraction IV. | |

| | |
|----------------------|----|
| C - INTERPRETATIONS. | 55 |
|----------------------|----|

| | |
|-------------------------|----|
| IV - <u>CONCLUSION.</u> | 55 |
|-------------------------|----|

ETUDE DES PROPRIETES DE L'ANGIOGENINE BOVINE .

| | |
|--|----|
| I - <u>DETERMINATION DES PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DE L'ANGIOGENINE BOVINE.</u> | 58 |
|--|----|

| | |
|--|----|
| A - MASSE MOLECULAIRE DE L'ANGIOGENINE BOVINE. | 58 |
|--|----|

| | |
|---------------------------------|----|
| B - POINT ISOELECTRIQUE. | 58 |
| 1 - <u>Matériel et méthode.</u> | |
| 2 - <u>Résultat.</u> | |

| | |
|---|--|
| C - DETERMINATION DE LA COMPOSITION EN ACIDES AMINES DE L'ANGIOGENINE 60 BOVINE. | |
| 1 - <u>Matériel et méthode.</u> | |
| 2 - <u>Résultat.</u> | |

| | |
|---|----|
| D - RECHERCHE D'UNE COPULE GLYCANNIQUE. | 60 |
| 1 - <u>Matériel et méthodes.</u> | |
| a - Chromatographie en phase gazeuse sur colonne OV 210. | |
| b - Chromatographie d'affinité sur colonne de concanavaline A-Sepharose 4 B (Con A). | |
| 2 - <u>Résultats.</u> | |

| | |
|---|----|
| E - CONCLUSIONS. | 63 |
| II - <u>DETERMINATION DE L'ACTIVITE ANGIOGENIQUE DE L'ANGIOGENINE BOVINE.</u> | 63 |
| A - MATERIEL ET METHODE. | 63 |
| 1 - <u>Principe.</u> | |
| 2 - <u>Préparation des échantillons.</u> | |
| 3 - <u>Protocole expérimental.</u> | |
| B - RESULTATS. | 64 |
| C - INTERPRETATION. | 65 |
| III - <u>RECHERCHE D'UNE ACTIVITE MITOGENE DE L'ANGIOGENINE BOVINE.</u> | 65 |
| <u>SUR LES CELLULES CCL 39.</u> | |
| A - MATERIEL ET METHODE. | 65 |
| 1 - <u>Cultures cellulaires</u> | |
| 2 - <u>Mesure de la synthèse d'ADN.</u> | |
| B - RESULTATS. | 67 |
| C - CONCLUSION. | 68 |

DETERMINATION
DE LA STUCTURE PRIMAIRE DE
L'ANGIOGENINE BOVINE.

"The complete amino-acid sequence of bovine milk angiogenin."

ACTIVITE RIBONUCLEASIQUE
DE L'ANGIOGENINE BOVINE.

| | |
|---|----|
| I - <u>ACTIVITE DE L'ANGIOGENINE BOVINE VIS-A-VIS DES</u> | 77 |
| <u>HOMOPOLYRIBONUCLEOTIDES.</u> | |
| A - MATERIEL ET METHODE. | 78 |
| 1 - <u>Dosage des protéines.</u> | |
| a - Réactifs. | |

| | |
|--|----|
| b - Gamme étalon. | |
| c - Dosage. | |
| 2 - <u>Mesure de l'activité ribonucléasique sur les homopolyribonucléotides.</u> | |
| B - RESULTATS. | 79 |
| II - <u>ACTIVITE DE L'ANGIOGENINE BOVINE SUR LES DINUCLEOTIDES PHOSPHATES.</u> | |
| A - MATERIEL ET METHODE. | 79 |
| B - RESULTATS. | |
| C - INTERPRETATION. | |
| III - <u>ACTIVITE DE L'ANGIOGENINE BOVINE SUR L'ARN DE GERME DE BLE.</u> | 83 |
| A - MATERIEL ET METHODE. | |
| B - RESULTATS. | |
| IV - <u>ACTIVITE DE L'ANGIOGENINE BOVINE SUR LES MONONUCLEOTIDES PHOSPHATES CYCLIQUES.</u> | 83 |
| A - MATERIEL ET METHODE. | |
| B - RESULTATS. | |
| V - <u>ACTIVITE DE L'ANGIOGENINE BOVINE SUR LES ARN RIBOSOMIQUES 18 ET 28 S.</u> | 85 |
| A - MATERIEL ET METHODE. | |
| B - RESULTATS. | |
| VI - <u>INHIBITION "in vitro" DE LA SYNTHESE DES PROTEINES.</u> | 86 |
| A - MATERIEL ET METHODE. | |
| B - RESULTATS. | |
| C - INTERPRETATION. | |
| VII - <u>CONCLUSION.</u> | 93 |

INTRODUCTION

Le lait de Vache, comme les laits de Mammifères, est une source importante de protéines qui peuvent se répartir, suivant leur rôle, en trois catégories essentielles. En effet, elles interviennent dans la nutrition, le système de défense contre les micro-organismes et le développement du nouveau-né (cf. revue générale de MONTREUIL, 1971).

Les caséines, pour lesquelles aucun rôle biologique n'a été décrit, représentent l'apport majeur en acides aminés indispensables à la nutrition du nouveau-né; elles constituent la majeure partie des protéines du lait. D'autres protéines, capables de fixer des éléments nutritionnels divers, sont impliquées dans la nutrition; citons par exemple la lactotransferrine et la β -lactoglobuline qui peuvent respectivement intervenir dans la nutrition martiale et l'apport en vitamine A.

Par le biais du lait, la Vache permet également au Veau de lutter contre les micro-organismes. En effet, celui-ci naît agammaglobulinémique et le colostrum lui fournit les anticorps dont il a besoin pour survivre. Outre ces immunoglobulines, le lait contient des protéines dont le pouvoir antimicrobien a largement été décrit et qui peuvent agir seules ou en synergie; il s'agit du lysozyme, de la lactoperoxydase et surtout de la lactotransferrine, glycoprotéine très étudiée dans notre Laboratoire et dont les rôles et les modes d'action sont multiples (SPIK & MONTREUIL, 1983).

D'autres molécules protéiques, connues pour leurs activités biologiques diverses sont présentes dans le lait à des concentrations souvent très faibles. Ce sont les enzymes, les hormones, les facteurs de croissance et les facteurs angiogéniques, quoique ces derniers n'aient, jusqu'à présent jamais été décrits dans le lait. Ces protéines et peptides qui présentent des activités biologiques à des doses très faibles semblent impliqués dans le développement du tractus digestif des nouveau-nés.

Au cours de la purification de la lactotransferrine du lait de Vache, nous avons été amené à isoler un peptide de 15 kDa. La séquence

partielle de ce peptide, déterminée en collaboration avec le Laboratoire de Chimie des Biomolécules de l'Institut Pasteur de Lille (Professeur A. TARTAR), présentait une homologie avec la séquence de l'angiogénine humaine, protéine isolée en 1985 par FETT *et al.* et capable d'induire la formation de nouveaux capillaires sanguins. Nous avons donc entrepris d'étudier les propriétés de cette protéine.

Les travaux réalisés s'inscrivent en fait dans un vaste programme de recherche sur les facteurs de croissance des laits. En effet, depuis la mise en évidence de l'activité mitogène du lait par KLAGSBRUN en 1978, les recherches sur ces molécules dans les laits de Femme et de Vache se sont intensifiées au Laboratoire et plus précisément dans le groupe dirigé par le Professeur G. SPIK.

L'intérêt suscité par ces molécules est considérable car elles interviennent dans le processus de développement et de régénération tissulaire. De ce fait, leur utilisation thérapeutique est envisageable. C'est d'ailleurs pour cette raison que de nombreux laboratoires pharmaceutiques ont entrepris d'étudier et de produire certaines de ces molécules.

Au moment où nous avons commencé notre travail, les seuls renseignements que nous possédions concernaient l'angiogénine humaine, protéine qui avait été isolée à l'état de traces à partir de surnageants de culture de cellules cancéreuses (FETT *et al.*, 1985). L'angiogénine humaine présente une homologie de structure importante avec la ribonucléase A. Toutefois, son activité enzymatique est différente puisque, parmi les substrats conventionnels des ribonucléases, seuls les ARN ribosomiques 18 et 28 S sont sensibles à son action. Les relations entre les activités angiogénique et ribonucléasique de l'angiogénine humaine ne sont pas encore connues. Néanmoins, ces deux activités sont inhibées par une protéine de 41 kDa communément dénommée "inhibiteur placentaire des ribonucléases". De ce fait, le mode d'action de l'angiogénine humaine et la régulation du phénomène d'angiogenèse qu'elle génère semblent complexes et demeurent actuellement une énigme. L'isolement et l'étude de l'angiogénine bovine devrait permettre d'obtenir des renseignements complémentaires sur cette nouvelle famille de facteurs angiogéniques et contribuer à l'élucidation du mécanisme par

lequel ces molécules induisent la prolifération des capillaires sanguins.

Dans le présent mémoire, après avoir fait le point des connaissances sur l'angiogénine humaine, nous décrirons l'isolement et la purification de l'angiogénine du lait de Vache. Nous présenterons ensuite les propriétés physico-chimiques et la structure primaire de cette molécule. L'étude comparative des séquences des deux angiogénines ayant montré quelques différences importantes, nous avons été amené à entreprendre l'étude de l'activité ribonucléasique de l'angiogénine bovine.

Notre travail a fait l'objet des publications et communication suivantes :

PUBLICATIONS.

- "Isolation and characterization of angiogenin from bovine milk."
SPIK G., DAMART D., CHAMOIX M., MAES P., TARTAR A., MONTREUIL J..
Soumis pour publication à Biochemical Journal.

"The complete amino acid sequence of bovine milk angiogenin."
MAES P., DAMART D., ROMMENS C., SPIK G., MONTREUIL J., TARTAR A..
FEBS Lett. (1988) 241, 41-45.

COMMUNICATION.

- "The complete amino acid sequence of bovine milk angiogenin".
MAES P., DAMART D., ROMMENS C., MONTREUIL J., SPIK G., TARTAR A..
présenté lors du congrès :
"Protein and Pharmaceutical Engineering." January 17-22, 1989;
Park City, Utah.
Résumé dans J. Cell. Biochem. (1989) 13A, 63.

GENERALITES

STRUCTURE ET PROPRIETES DE L'ANGIOGENINE.

Les recherches que nous avons effectuées ont conduit, pour la première fois, à l'isolement de l'angiogénine, peptide qui intervient dans la formation de nouveaux capillaires sanguins, à partir du lait de Vache. Les seules connaissances que nous avons au moment où nos recherches sur le lait de Vache ont commencé concernaient l'angiogénine d'origine humaine.

Avant de présenter les résultats obtenus, nous décrirons la localisation de l'angiogénine, ses principales propriétés structurales et biologiques et enfin, comme le phénomène d'angiogénèse se trouve sous le contrôle de différents facteurs angiogéniques, nous décrirons les plus importants d'entre eux.

I - ORIGINE DE L'ANGIOGENINE.

A - ISOLEMENT ET PURIFICATION.

L'angiogénine humaine a été isolée pour la première fois en 1985 par le groupe de VALLEE (FETT et al.) à partir de surnageant de milieu de culture de cellules HT 29.

Elle fut initialement purifiée par chromatographie d'échange de cations suivie d'une étape de chromatographie en phase réverse.

Les quantités obtenues par ces auteurs n'étaient que de 0,5 µg par litre de milieu de culture.

La lignée cellulaire HT 29 ayant été établie à partir d'un adénocarcinome humain, l'angiogénine humaine a d'abord été considérée comme un facteur impliqué dans l'angiogénèse tumorale; cependant en 1987, elle fut également purifiée à partir de plasma de sujets humains sains avec des rendements variant de 60 à 150 µg par litre (SHAPIRO et al., 1987a). Récemment, l'angiogénine a été isolée du plasma de Boeuf (BOND & VALLEE, 1988).

L'angiogénine humaine est désormais produite par génie génétique. Deux réalisations ont été faites dans ce domaine. L'une classique, a consisté à transformer des cellules de rein de Hamster nouveaux-né par des séquences d'ADN dérivées du gène codant pour l'angiogénine humaine

(KURACHI *et al.*, 1988). Après expression de l'insert, l'angiogénine recombinante fut purifiée. Cette protéine a d'ailleurs conservé ses propriétés biologiques et enzymatiques.

La deuxième réalisation a consisté à synthétiser chimiquement le gène codant pour l'angiogénine humaine puis à le faire exprimer chez *Escherichia coli* (DENEFLÉ *et al.*, 1987).

B - LOCALISATION.

La distribution de l'ARNm de l'angiogénine a été étudiée par des expériences d'hybridation (RYBAK *et al.*, 1987). L'expression de l'ARNm de l'angiogénine n'est pas limitée aux cellules néoplasiques et a été visualisée dans des cellules épithéliales normales, des fibroblastes et des cellules de la circulation sanguine. Dans ces dernières, cette expression peut être amplifiée par l'induction d'agents mitogènes.

Par contre, dans les fibroblastes transformés, la quantité d'ARNm codant pour l'angiogénine n'est pas supérieure à celle contenue dans les fibroblastes normaux, ce qui démontre que la transformation néoplasique ne se traduit pas obligatoirement par une augmentation de l'expression de l'ARNm de l'angiogénine.

Dans une étude analogue, WEINER *et al.* (1987) montrent que l'expression du gène de l'angiogénine dans le foie de Rat évolue avec l'âge; ainsi, les quantités d'ARNm codant pour l'angiogénine mises en évidence sont faibles chez le fœtus, augmentent chez le nouveau-né pour atteindre un taux maximal chez l'adulte.

La protéine est principalement exprimée dans le foie et les quantités d'ARNm trouvées dans les cellules d'hépatome SK-Hep et dans les cellules d'adénocarcinome HT-29 diffèrent peu des celles trouvées dans le foie de Rat normal.

II- PROPRIETES STRUCTURALES DE L'ANGIOGENINE HUMAINE.

A - STRUCTURE PRIMAIRE.

L'enchaînement des acides aminés de l'angiogénine humaine a été déterminé à l'issue de sa purification en 1985 (STRYDOM *et al.*) par des techniques conventionnelles de séquençement. Cette séquence a ensuite été confirmée par clonage du gène et analyse de l'ADNc (KURACHI *et al.*,

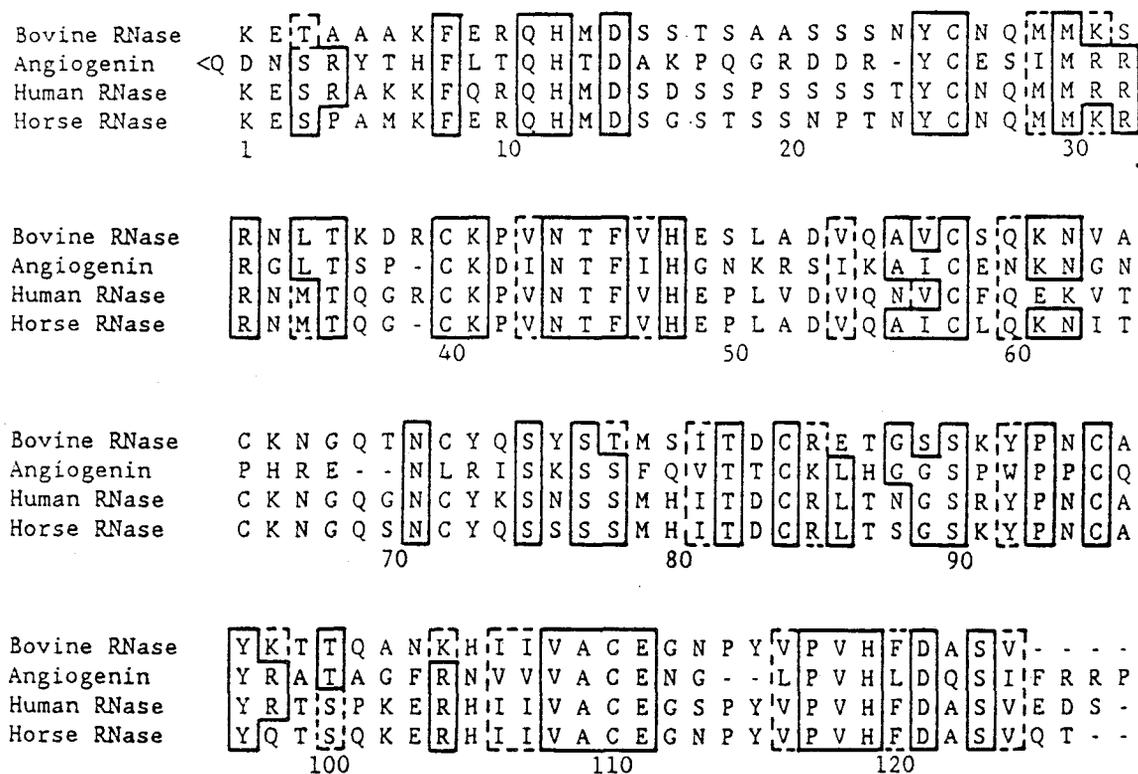


Figure 1 : Structures primaires comparées des ribonucléases bovine, humaine, équine et de l'angiogénine humaine d'après STYDOM et al. (1985) et PALMER et al. (1986).

1985). La masse moléculaire de l'angiogénine est de 14,4 kDa et son point isoélectrique est supérieur à 9,5.

La partie N-terminale est "bloquée", en effet le premier acide aminé est un acide pyroglutamique, l'acide aminé en position C-terminale étant la proline (STRYDOM et al., 1985).

La séquence peptidique de l'angiogénine humaine est donnée dans la Fig. 1 page 6. Nous pouvons constater que la protéine est composée de 123 résidus d'acides aminés et qu'elle présente une homologie d'environ 35 % avec la ribonucléase pancréatique. Cette homologie est significative en ce qui concerne certains résidus impliqués dans le site actif de la ribonucléase comme l'histidine en position 12, la lysine en position 41 et l'histidine 119.

L'angiogénine n'est pas glycosylée et sa séquence ne renferme pas de site de glycosylation potentiel.

B - STRUCTURE TRIDIMENSIONNELLE.

Une première approche de la structure tridimensionnelle de l'angiogénine humaine a été réalisée en 1986 par PALMER et al., sur la base de son homologie de structure primaire avec la ribonucléase A. Une structure géométrique simplifiée a d'abord été réalisée (KURACHI et al., 1985), puis par comparaison des structures primaires des deux protéines, en association avec le traitement informatique, une structure tridimensionnelle complète de l'angiogénine humaine a été proposée (Fig. 2 p. 8).

III - ACTIVITES BIOLOGIQUES DE L'ANGIOGENINE HUMAINE.

A - ACTIVITE ANGIOGENIQUE.

1 - Définition de l'angiogénèse.

Sous la dénomination "angiogénèse" sont regroupés divers phénomènes biologiques dont l'aboutissement est la formation de nouveaux vaisseaux sanguins.

Cependant, nous pouvons distinguer l'angiogénèse liée au développement embryonnaire de celle qui conduit à la vascularisation de certains tissus chez l'adulte.

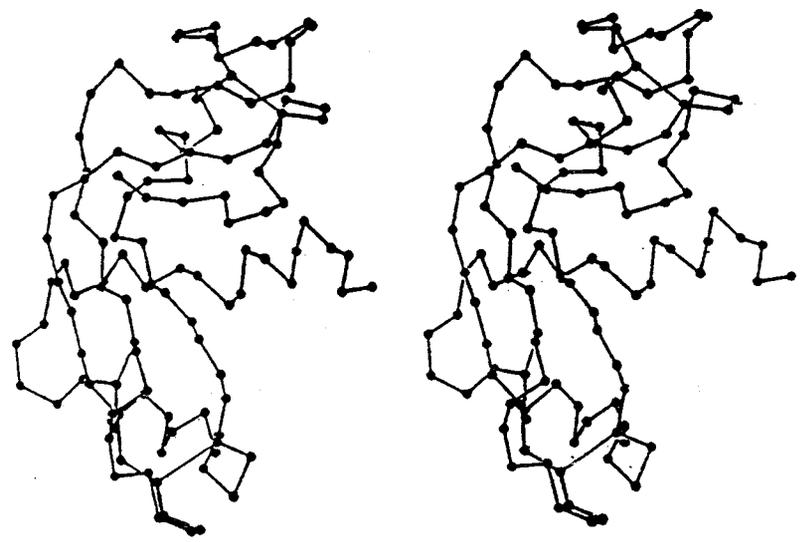
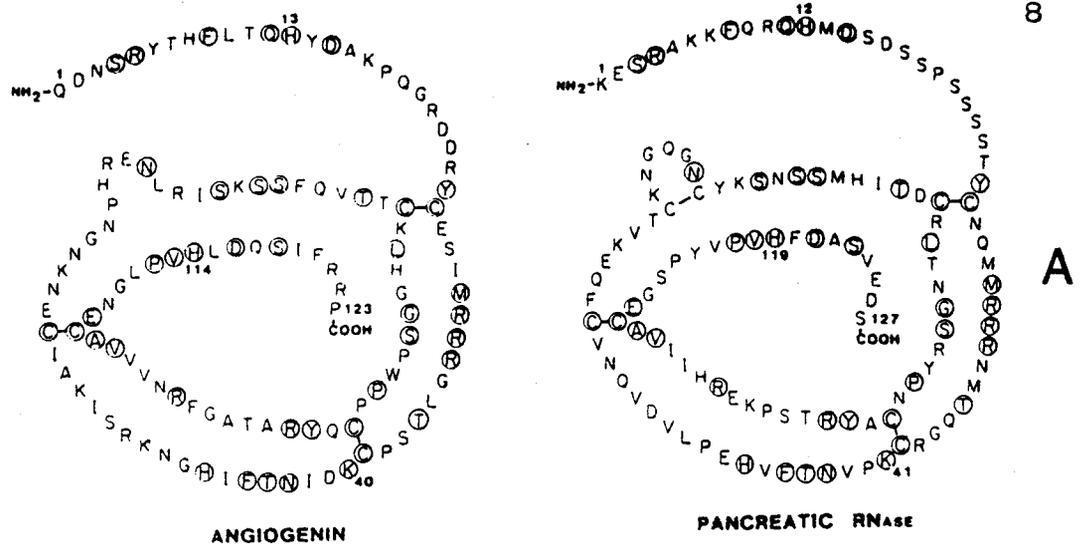


Figure 2 : Structure tertiaire de l'angiogénine humaine.

A : position des ponts disulfures (KURACHI et al., 1985)
 B et C : Structure calculée positionnant les liaisons Ca-Ca
 de la ribonucléase A (B) et de l'angiogénine (C).

Chez celui-ci, l'angiogénèse peut être de deux types : soit normale, comme c'est le cas au cours de l'ovulation (GOSPODAROWICZ et THAKRAL, 1978), soit liée à un état pathologique d'origine bénigne ou maligne. Ainsi, lors de la rétinopathie diabétique, de la cicatrisation ou dans le cas de psoriasis (D'AMORE et THOMPSON, 1987), de nouveaux vaisseaux sanguins se forment et se développent. De même, le développement d'une tumeur passe par celui de son propre réseau vasculaire (FOLKMAN, 1974). De cette façon, le sang circulant amène les éléments nourriciers nécessaires à la prolifération des cellules tumorales, ce qui conduit au grossissement de la tumeur.

C'est d'ailleurs grâce aux études entreprises sur l'angiogénèse tumorale que les mécanismes impliqués lors de la néovascularisation ont pu être partiellement élucidés et que la notion de facteur angiogénique moléculaire a pu être établie (GREENBLATT et SHUBIK, 1968).

Dès lors, de nombreux facteurs angiogéniques ont été isolés puis purifiés; cependant, la part des différents protagonistes cellulaires ou moléculaires impliqués au cours de la formation d'un nouveau capillaire sanguin n'est pas encore établie.

2 - Etapes de formation d'un capillaire sanguin.

La formation d'un nouveau capillaire sanguin se fait en plusieurs étapes dont la connaissance exacte repose principalement sur des observations faites en microscopie électronique.

Les auteurs qui ont contribué le plus à l'analyse et à la description de ce phénomène sont certainement FOLKMAN et ses collaborateurs (1974,1980,1985). Leurs observations de la néovascularisation provoquée *in vitro* ou *in vivo* par des stimuli angiogéniques d'origines diverses ont permis d'élucider en grande partie le mécanisme par lequel un vaisseau sanguin peut émettre un bourgeon qui lui-même deviendra un capillaire. Malgré tout, certaines de ces étapes sont encore méconnues; cependant, le processus semble être le même quelle que soit la nature du stimulus angiogénique, celui-ci pouvant être d'origine tumorale, inflammatoire ou immunitaire (FOLKMAN, 1985).

La néovascularisation s'effectue donc à partir des vaisseaux préexistants; toutefois, il faut noter que les nouveaux capillaires dérivent de veinules ou d'autres capillaires. En effet, les vaisseaux

plus importants ne donnent généralement pas de bourgeon (RIFKIN et al., 1982).

a - Dégradation de la membrane basale.

L'un des premiers événements de la formation du nouveau capillaire est une dégradation locale de la membrane basale sur la partie du vaisseau exposée au stimulus angiogénique. Cette dégradation pourrait résulter de l'action de protéases libérées par les cellules endothéliales elles-mêmes (KALEBIC et al., 1983). Toutefois, il a été prouvé que la synthèse de l'activateur du plasminogène comme celle de la collagénase par des cellules endothéliales de capillaires bovins était augmentée de manière significative quand celles-ci étaient mises en présence, *in vitro*, d'une substance angiogénique (GROSS et al., 1983). Cependant, cet effet n'a pu être observé sur les cellules endothéliales de l'aorte de Boeuf, ce qui peut être rapproché du fait que la néovascularisation à partir de vaisseaux importants est pratiquement inexistante.

Parallèlement à cette dégradation de la membrane basale, des modifications morphologiques de la cellule endothéliale surviennent : celle-ci s'allonge et le matériel cellulaire qu'elle renferme devient plus abondant. En effet, des analyses histologiques (AUSPRUNK et FOLKMAN, 1977) montrent une augmentation du nombre de mitochondries et de ribosomes ainsi qu'un développement important du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi.

b - Migration des cellules.

Les cellules endothéliales commencent leur migration dans l'espace interstitiel, vers le stimulus angiogénique et au travers du "trou" formé dans la membrane basale.

Durant cette migration, les cellules endothéliales situées à l'extrémité du bourgeon ainsi formé commencent à se diviser. Cette division pourrait s'expliquer par la perte de l'inhibition de contact par suite de la rupture des liaisons intercellulaires due à la migration des cellules (AUSPRUNK et FOLKMAN, 1977).

c - Formation de la lumière du nouveau capillaire.

C'est certainement l'étape la moins connue de la formation d'un capillaire. Des observations anciennes décrivaient la formation de la lumière comme résultant de l'ouverture d'un espace entre les membranes plasmiques de cellules adjacentes (pour revue voir WAGNER, 1980). Ce mécanisme intercellulaire suppose que les cellules endothéliales formant le capillaire conservent leur individualité.

Par la suite, dans le cas d'angiogénèse embryonnaire, la formation d'une vacuole intra-cellulaire a été décrite (CLARK et CLARK, 1939), les vacuoles de cellules contiguës pourraient fusionner pour ainsi former un "tube"(FOLKMAN et HAUDENSCHILD, 1980).

En fait, dans la plupart des cas d'angiogénèse post-embryonnaire, la formation de la lumière du capillaire semble impliquer le cytosquelette des cellules endothéliales, celles-ci s'enroulant sur elle-mêmes pour former une structure tubulaire (AUSPRUNK & FOLKMAN, 1977 et FOLKMAN & HAUDENSCHILD, 1980).

d - Prolifération cellulaire.

Les cellules de la partie moyenne du bourgeon commencent à se diviser tandis que celles situées à son extrémité continuent généralement à migrer sans se diviser.

e - Formation d'une boucle.

Des bourgeons individuels se rejoignent pour former entre eux des anastomoses. Ces boucles croissent et peuvent même être à l'origine de nouveaux bourgeons. Les boucles nouvellement formées convergent alors vers le stimulus angiogénique et la circulation sanguine peut commencer.

Des péricytes émergent ensuite le long du bourgeon et la synthèse de la membrane basale suit, terminant ainsi l'édifice (FOLKMAN & HAUDENSCHILD, 1980).

3 - Les techniques d'évaluation de l'angiogénèse.

Deux types de modèles sont actuellement utilisés pour visualiser et quantifier la formation de nouveaux capillaires consécutive à un

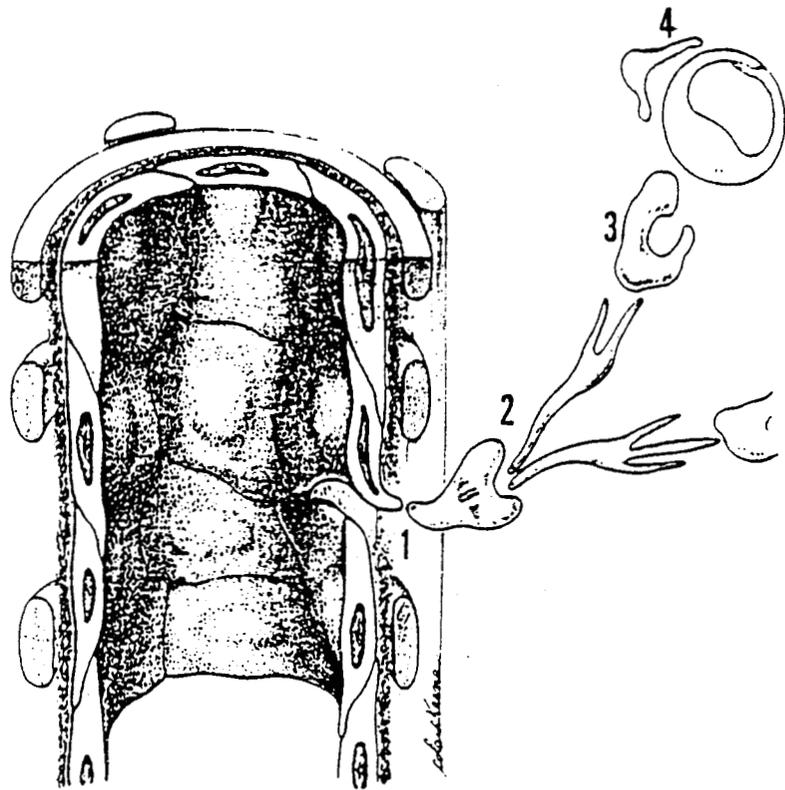


Figure 3 : Représentation schématique de la formation d'un capillaire sanguin d'après D'AMORE et THOMPSON (1987).

- 1 : Activation des cellules endothéliales et dégradation de la membrane basale.
- 2 : Migration des cellules endothéliales.
- 3 : Prolifération cellulaire et formation de la lumière.
- 4 : Synthèse d'une nouvelle membrane basale.

stimulus angiogénique. En effet, nous pouvons distinguer les modèles *in vivo*, qui sont les plus largement utilisés, des modèles *in vitro* développés par FOLKMAN & HAUDENSCHILD (1980).

a - Modèles "*in vivo*".

*** Technique des micropoches cornéennes.**

Cette technique permet la mesure linéaire de la croissance individuelle des capillaires sanguins. Les implants tumoraux (1 mm^3) sont insérés dans une poche pratiquée sur le bord de la cornée d'un Lapin à proximité du lit vasculaire préexistant (GIMBRONE *et al.*, 1974). Les nouveaux capillaires perpendiculaires au bord de la cornée apparaissent et croissent d'environ 0,2 mm par jour.

Cette technique permet également d'apprécier l'effet inhibiteur de certains tissus qui peuvent être interposés entre l'implant tumoral et le lit vasculaire. Par exemple, les propriétés inhibitrices du cartilage ont été démontrées par cette technique (BREM & FOLKMAN, 1975).

L'inconvénient majeur de ce modèle survient lorsque l'extrait tumoral implanté n'est pas obtenu chez le Lapin. Dans ce cas, une réponse immunitaire induisant l'angiogénèse est possible et l'interprétation des résultats peut être erronée. Ce problème peut être contourné par l'implantation des extraits tumoraux dans la cornée de souris dépourvues de système immunitaire (MUTHUKKARUPPAR & AVERBACH, 1979). La cornée de Rat a également été utilisée.

*** Implantation de polymères dans la cornée.**

Lorsque l'on veut évaluer l'activité angiogénique d'extraits tumoraux, la technique des micropoches devient inadéquate : l'extrait diffuse trop rapidement dans le tissu. Le problème est alors d'obtenir une libération continue de l'extrait afin d'établir un gradient à l'intérieur de la cornée. Deux impératifs surviennent alors : l'implant doit être inerte pour ne pas provoquer l'inflammation de la cornée et être capable de libérer des substances de hautes masses moléculaires.

Deux polymères ont été retenus pour ces expérimentations : le polyhydroxyméthacrylate et les copolymères d'acétate de vinyle et d'éthyle (LANGER & FOLKMAN, 1976). Ainsi, une libération de substance de

l'ordre de quelques nanogrammes par jour peut être obtenue pendant des périodes de quelques semaines (MURRAY et al., 1983). Les implants d'une taille de 1 mm^3 sont bien tolérés par la cornée et par les autres tissus.

* **Angiogénèse de la membrane chorioallantoïdienne.**

Cette méthode est actuellement la plus facile à mettre en oeuvre et donc la plus utilisée pour apprécier l'activité angiogénique de diverses substances.

Au neuvième jour de la croissance des oeufs fécondés, les échantillons sont déposés sur la membrane chorioallantoïdienne, la formation de boucles et la convergence des capillaires vers la pastille renfermant l'échantillon peuvent être observées 48 à 72 heures après le dépôt (KLAGSBRUN et al., 1976; KNIGHTON et al., 1977).

Deux types de support sont essentiellement utilisés : la substance peut être dissoute dans la méthylcellulose à 1 % qui, une fois aliquotée et séchée, forme de petits disques ou déposée sur une pastille de Thermanox.

Récemment, cette méthode est devenue quantitative (SPLAWINSKI et al., 1988) par la mesure de l'incorporation de thymidine tritiée.

b - Modèles "in vitro".

Certaines cellules endothéliales de capillaire sanguin ont été établies en lignées cellulaires (FOLKMAN et al., 1979). En présence de substances angiogéniques, ces cellules peuvent se multiplier et s'organiser *in vitro* en un véritable réseau vasculaire (FOLKMAN & HAUDENSCHILD, 1980; MADRI & WILLIAMS, 1983). C'est d'ailleurs grâce à ces modèles que les différentes étapes de la formation d'un capillaire sanguin ont, en partie, été élucidées.

c - Conclusions.

Les modèles "in vivo" tels que la membrane chorioallantoïdienne d'oeuf de Poule permettent d'évaluer l'activité angiogénique d'extraits bruts et de suivre la purification des facteurs responsables de cette activité. Cette méthode est simple et rapide, toutefois,

l'interprétation des résultats n'est pas toujours rigoureuse, le phénomène d'angiogénèse observé pouvant être dû également à une réponse immunitaire ou à une inflammation.

Les modèles "in vitro", d'utilisation beaucoup plus difficile, permettent non seulement d'apprécier l'angiogénèse en réponse à un stimulus mais aussi d'observer la succession des événements qui se produisent lors de la formation d'un nouveau capillaire sanguin.

4 - Les résultats obtenus avec l'angiogénine humaine.

a - Activité angiogénique sur la membrane chorioallantoïdienne d'oeuf de Poule.

Le test d'angiogénèse sur la membrane chorioallantoïdienne a été utilisé pour suivre la purification de l'angiogénine à partir de surnageants de culture de cellules HT-29 (FETT et al., 1985) et ainsi déterminer que cette molécule était responsable de la croissance de nouveaux capillaires sanguins.

L'angiogénine humaine est capable d'induire la néovascularisation de cette membrane à des doses très faibles de l'ordre de 0,5 ng soit 35 fmole par oeuf.

b - Activité angiogénique sur la cornée de Lapin.

L'angiogénine induit également la croissance de nouveaux vaisseaux sanguins lorsqu'elle est injectée dans la cornée de Lapin selon la technique des "micro-poches" (FETT et al., 1985). Une réponse positive a été obtenue de façon reproductible avec des doses de 50 ng soit 3,5 pmoles.

B - ACTIVITE RIBONUCLEASIQUE DE L'ANGIOGENINE HUMAINE.

1 - Spécificité.

Du fait de son homologie avec la ribonucléase A, SHAPIRO et al. (1986) ont réalisé une étude de la spécificité enzymatique de l'angiogénine humaine. Ces auteurs ont étudié l'activité de

l'angiogénine humaine sur divers ARN, polyribonucléotides, dinucléotides et nucléotides cycliques.

Aucune activité ribonucléasique substantielle n'a pu être démontrée sur ces substrats. Par contre, lorsque l'angiogénine humaine est mise en présence d'ARNs ribosomiques 18 et 28 S, elle provoque une dégradation partielle de ceux-ci, les produits majeurs de cette hydrolyse étant des fragments de 100 à 500 nucléotides.

Récemment, l'activité de l'angiogénine humaine sur les ARN ribosomiques 5 S de *Saccharomyces cerevisiae* et d'*Escherichia coli* a été étudiée afin de trouver les sites de coupure et déterminer ainsi la spécificité de cet enzyme (RYBAK et VALLEE, 1988). Les auteurs concluent que l'angiogénine est capable d'hydrolyser les liaisons phosphodiester des résidus de cytidine et d'uridine préférentiellement quand ceux-ci sont suivis d'un résidu d'adénine (Fig. 4 p.17). Cependant, tous les sites de coupure potentiels ne sont pas hydrolysés, ce qui pourrait impliquer que la structure secondaire voire tertiaire de ces ARN intervient dans le mécanisme de reconnaissance par l'angiogénine.

2 - Relation entre l'activité ribonucléasique de l'angiogénine humaine et sa structure.

Dans une étude préliminaire, SHAPIRO et al. (1987c) ont démontré que des réactifs spécifiques de l'histidine, de la lysine et de l'arginine diminuaient l'activité ribonucléasique de l'angiogénine humaine beaucoup plus que celle de la ribonucléase A, ce qui suggérerait que ces trois résidus d'acides aminés étaient impliqués dans le mécanisme d'action de l'angiogénine humaine.

En 1988 HARPER et al. se fondant sur les travaux de RICHARDS et al. (1958 et 1959) ont réalisé des molécules hybrides en réassociant des fragments de ribonucléase A et d'angiogénine humaine.

En effet, les fragments N- et C-terminaux préparés à partir de la ribonucléase A ont la capacité de se combiner de façon non covalente et ainsi de régénérer l'activité catalytique.

Deux types d'hybrides ont été réalisés: le premier, en réassociant le peptide correspondant aux résidus d'acides aminés 1 à 21 de l'angiogénine humaine avec le peptide C-terminal de la ribonucléase A renfermant les acides aminés 21 à 124 (protéine S), le second par

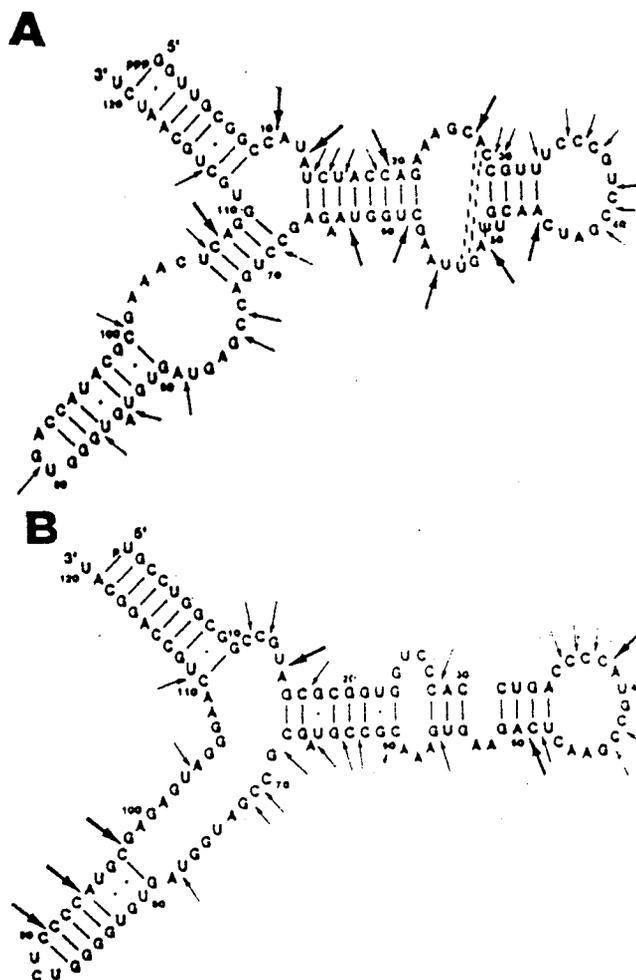


Figure 4 : Structure secondaire des ARN 5 S de *Saccharomyces cerevisiae* (A) et d'*Escherichia coli* (B).

Les grandes flèches indiquent les sites majeurs de coupure tandis que les petites correspondent aux coupures de moindre importance (d'après RYBAK & VALLEE, 1988).

combinaison des acides aminés 1 à 118 de la ribonucléase A aux résidus 108 à 123 de l'angiogénine humaine. Les auteurs ont ensuite recherché les activités catalytiques de ces molécules hybrides et les ont comparées à celles de la ribonucléase A en se référant aux valeurs de k_{cat}/k_m .

a - Activité de l'hybride "ANGIOGENINE(1-21)-PROTEINE S".

L'hybride Angiogénine(1-21)-Protéine S hydrolyse une variété de substrats conventionnels de la ribonucléase A comme certains dinucléosides phosphates et nucléosides monophosphates cycliques.

Son activité sur la cytidine adénosine monophosphate (CpA) dépend de façon hyperbolique de sa concentration et une activité maximale est observée pour une concentration de 8 μ M.

Cet hybride est, en outre, capable d'hydrolyser l'ARN de levure avec une activité représentant 15 % de celle de la ribonucléase A. Le peptide correspondant aux résidus d'acides aminés 6 à 21 de l'angiogénine humaine forme également un complexe avec la protéine S mais son activité sur l'ARN de levure ne représente que 2 à 8 % de celle de la ribonucléase A.

b - Activité de l'hybride "RNase(1-118)-ANGIOGENINE(108-123)".

Il possède une activité vis-à-vis de l'ARN de levure représentant 11 % de celle de la ribonucléase A tandis que son activité sur les nucléosides monophosphates cycliques et les dinucléosides phosphates est de une à deux fois plus faible.

Un hybride RNase(1-118)-Angiogénine(108-122) a aussi été réalisé, mais son activité ne diffère pas de celle du précédent; ce qui prouve que la proline en position C-terminale n'intervient pas dans l'activité.

La substitution de la phénylalanine en position 120 dans la ribonucléase A se traduit par une diminution considérable de son activité sur la cytidine monophosphate cyclique (LIN et al., 1972). L'acide aminé de l'angiogénine humaine correspondant à ce résidu de phénylalanine est la leucine en position 115. L'activité sur les nucléotides cycliques et les dinucléotides phosphates de l'hybride renfermant la phénylalanine en position 115 s'est trouvée augmentée de

façon très importante. Par contre, cette substitution n'affecte pratiquement pas l'activité vis-à-vis de l'ARN de levure.

c - Activité des hybrides sur les ARN ribosomiques 18 ET 28 S.

L'hybride angiogénine(1-21)-protéine S présente une activité très proche de celle de l'angiogénine humaine. Par contre, le complexe RNase(1-118)-Angiogénine(108-123) ne semble pas posséder cette activité.

d - Importance des résidus d'histidine 13 et 114.

La substitution par l'alanine des résidus d'histidine 13 et 114 des peptides de l'angiogénine humaine se traduit par une inactivation des complexes vis-à-vis du Cytidylyl (3'-5') Adénosine (CpA). Ceci implique que ces deux résidus d'histidine sont engagés dans le site catalytique.

e - Conclusion.

Cette approche expérimentale souligne donc l'importance de la région N-terminale de l'angiogénine humaine dans sa spécificité d'action.

C - INHIBITION DES ACTIVITES RIBONUCLEASIQUE ET ANGIOGENIQUE DE L'ANGIOGENINE HUMAINE.

L'activité ribonucléasique de l'angiogénine humaine est inhibée par une protéine monocaténaire acide d'environ 51 kDa qui fut isolée du placenta humain, par BLACKBURN et al. en 1977.

Cet inhibiteur forme, avec la ribonucléase et l'angiogénine un complexe très stable (SHAPIRO et al., 1987b).

Sa structure primaire a été déterminée récemment (SCHNEIDER et al., 1988) par déduction, à partir de la séquence de son ADNc. Cette structure présente une organisation originale : elle est constituée de 8 unités de répétition. Chaque unité dérive de la duplication d'un module de 28 résidus d'acides aminés particulièrement riche en proline.

L'inhibiteur placentaire des ribonucléases est capable d'inhiber à la fois les activités ribonucléasique et angiogénique de l'angiogénine humaine (SHAPIRO et al., 1987b). L'angiogénine humaine forme avec le PRI

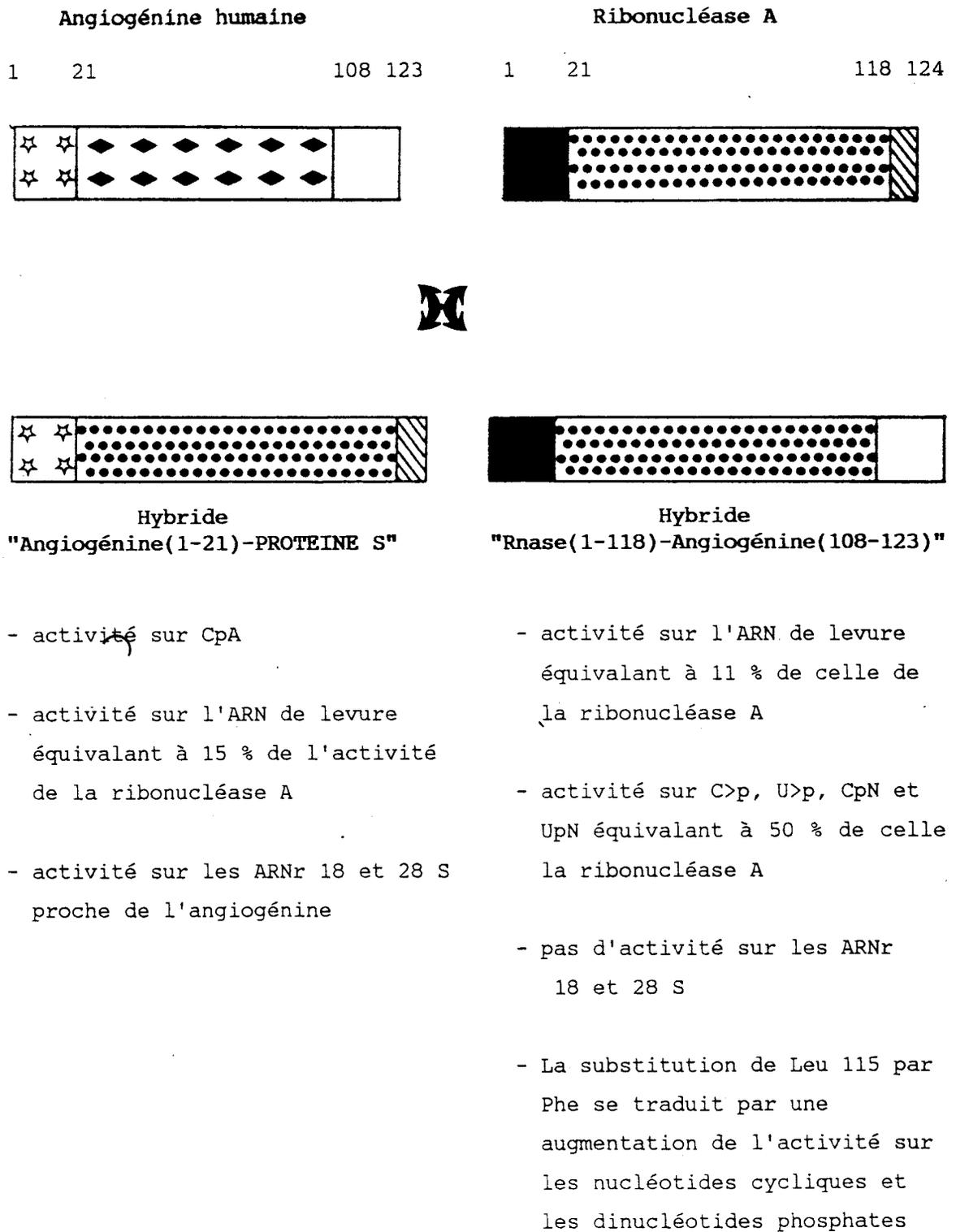


Figure 5 : Activité des molécules hybrides
Angiogénine/Ribonucléase A
(selon HARPER et al., 1988).

un complexe stable et, comme pour la ribonucléase A, le parahydroxymercuribenzoate employé à une concentration millimolaire est capable de dissocier le complexe angiogénine-PRI et de restituer l'activité ribonucléasique de l'angiogénine humaine.

Des expériences de compétition entre l'angiogénine humaine et la ribonucléase A vis-à-vis du PRI ont montré que l'interaction entre l'angiogénine humaine et le PRI est très forte, la constante de dissociation du complexe étant inférieure à 0,1nM. De ce fait, certains auteurs (SCHNEIDER *et al.*, 1988) préfèrent désormais utiliser le nom d'inhibiteur de la ribonucléase et de l'angiogénine (RAI). En effet, il se pourrait que cet inhibiteur soit, en fait, l'agent régulateur de l'angiogénèse provoquée par l'angiogénine. Cette hypothèse a été confortée dernièrement (LEE *et al.*, 1989b) puisqu'il apparaît que l'affinité du PRI pour l'angiogénine est environ 60 fois plus importante que celle liant le PRI à la ribonucléase A. Cette interaction mettrait en cause les acides aminés proches du résidu Trp-89 de l'angiogénine et serait due à des interactions ioniques (LEE *et al.*, 1989a).

D - INHIBITION DE LA SYNTHÈSE DES PROTÉINES.

Des lysats de réticulocytes de Lapin ont été utilisés comme système de traduction *in vitro* pour apprécier l'effet de l'angiogénine humaine sur la synthèse des protéines (ST CLAIR *et al.*, 1987).

L'inhibition de la synthèse des protéines provoquée par l'angiogénine humaine est proportionnelle à sa concentration et devient totale pour des molarités de 40 à 60 nM tandis que l'inhibition par la ribonucléase A employée dans les mêmes conditions n'est que de 50 % .

Le traitement préalable de l'angiogénine humaine par le PRI annihile totalement cette capacité d'inhiber la synthèse des protéines. Ceci démontre donc que cette activité de l'angiogénine humaine sur la synthèse des protéines est liée à son activité ribonucléasique.

Les auteurs ont également démontré que l'ARNm de la globine traité par une concentration d'angiogénine humaine de 300nM n'était plus capable de diriger la synthèse de cette protéine et qu'il était dégradé par l'enzyme. Cependant, l'ARNm ne semble pas être la cible prioritaire de l'angiogénine humaine; en effet, lorsque l'ARNm exogène est ajouté au système de traduction préalablement incubé avec l'angiogénine humaine, ce système devient incapable de synthétiser la protéine.

L'effet de l'angiogénine humaine sur les ARN de transfert a été aussi envisagé pour expliquer l'inhibition de traduction mais les expérimentations réalisées dans ce sens se sont révélées négatives.

L'inhibition de la synthèse des protéines serait donc fort probablement due à l'activité ribonucléasique de l'angiogénine humaine sur les ARN ribosomiques.

E - ACTIVATION DE LA PHOSPHOLIPASE C.

Récemment, BICKNELL & VALLEE (1988) ont démontré que l'angiogénine humaine augmentait l'activité de la phospholipase C spécifique de l'inositol des cellules d'artère pulmonaire, de veine ombilicale et d'endothélium de capillaire. Cet effet, proportionnel à la concentration en angiogénine, se traduit par une augmentation appréciable du taux de 1,2 diacylglycérol et d'inositol triphosphate. La réponse maximale est obtenue pour une concentration en angiogénine de 1 ng/ml.

Les cellules endothéliales artérielles répondent plus faiblement; en effet, pour ces cellules, la réponse ne peut être observée que pour des concentrations importantes en angiogénine.

IV - LES AUTRES FACTEURS ANGIOGENIQUES.

A - LES FACTEURS DE CROISSANCE SANS AFFINITE POUR L'HEPARINE.

1 - Facteurs de faible masse moléculaire.

Différents facteurs protéiques de masse moléculaire inférieure à 1000 Da ont été isolés de tumeurs. Citons par exemple un peptide de 400 à 800 Da isolé de tumeur Walker 256 du Rat par FENSELAU *et al.* (1981) et qui présente la particularité d'avoir une activité mitogène pour les cellules endothéliales d'aorte bovine ainsi qu'une activité angiogénique *in vivo* sur la membrane chorio-allantoïdienne d'oeuf de Poule comme sur la cornée de Rat.

2 - Les exudats de plaie.

D'autres peptides de masse moléculaire plus importante (supérieure à 1000) et possédant aussi une activité angiogénique ont été isolés,

ainsi en 1982 BANDA et al. isolèrent un facteur à partir d'exudats de plaie. Ce facteur provoque la migration des cellules endothéliales mais pas leur prolifération, il est libéré *in vitro* par les macrophages uniquement quand ceux-ci sont maintenus en culture dans une atmosphère appauvrie en oxygène (2 %)(KNIGHTON et al., 1983).

3 - Les facteurs de croissance transformants (TGF).

Ces facteurs (Transforming Growth Factors) ont la faculté de modifier le phénotype de cellules normales vers celui de cellules transformées (DE LARCO & TODARO, 1980). Outre cette activité transformante, les TGFs induisent également l'angiogénèse *in vivo*.

a - le TGF - α

Le TGF- α est un facteur excrété par de nombreuses cellules tumorales établies ainsi que par certaines cellules transformées à l'aide de rétrovirus (DE LARCO & TODARO, 1978).

Le TGF- α humain est une simple chaîne peptidique de 50 résidus d'acides aminés (DERYNCK et al., 1984); la molécule renferme trois ponts disulfures et présente une homologie de structure primaire importante (35 %) avec un autre facteur de croissance : le facteur de croissance épidermique (EGF).

C'est d'ailleurs par l'intermédiaire du récepteur de l'EGF que le TGF- α stimule *in vitro* la prolifération des cellules endothéliales (MASSAGUE, 1983 et TAM et al., 1984).

Le TGF- α induit également la vascularisation *in vivo* lorsqu'il est employé selon la technique des poches dans la joue de Hamster (SCHREIBER et al., 1986).

b - le TGF- β

Il fut initialement isolé de milieu de culture de cellules transformées puis purifié sur la base de sa capacité à stimuler la croissance de fibroblastes en milieu semi-solide (MOSES et al., 1981). Ce facteur a, par la suite, été isolé de tissus sains comme le placenta (FROLIK et al., 1983), les plaquettes sanguines (ASSOIAN et al., 1983) et le rein de Boeuf (ROBERTS et al., 1983).

La forme biologiquement active du TGF- β est un dimère peptidique de 25 kDa (112 résidus d'acides aminés par chaîne). Il est cependant excrété par la cellule sous forme inactive, le mécanisme par lequel il retrouve son activité est encore inconnu mais des expériences récentes (SPORN *et al.*, 1987 et KESKI-OJA *et al.*, 1987) tendraient à prouver la nécessité d'un clivage protéolytique pour la restauration de l'activité de la molécule.

Le TGF- β stimule la prolifération de cellules d'origine mésenchymateuse; il a, par exemple, été démontré qu'il était mitogène pour les ostéoblastes (CENTRELLA *et al.*, 1987 et ROBEY *et al.*, 1987).

Paradoxalement, le TGF- β est capable d'inhiber la croissance de nombreux autres types cellulaires, c'est le cas des cellules épithéliales et des lymphocytes T et B (KEHRL *et al.*, 1986 a et b).

L'activité angiogénique de ce facteur a été démontrée par ROBERTS *et al.* en 1986. En effet, une injection sous-cutanée de TGF- β inférieure à 1 μ g induit l'angiogénèse chez le Souriceau nouveau-né. De même, des doses de 1 à 10 ng produisent l'opacification de la cornée suivie d'une néovascularisation de celle-ci.

4 - Le facteur de nécrose tumorale de type α .

Le facteur de nécrose tumorale de type α (TNF- α) est un polypeptide découvert dans le sérum de Souris infectées par le bacille de Calmette-Guérin (CARSWELL *et al.*, 1975); il fut ensuite isolé des macrophages (BEUTTER *et al.*, 1985).

Sa séquence primaire est connue (PENNICA *et al.*, 1985), elle présente une homologie avec celle de la lymphotoxine (TNF- β).

Le TNF- α produit une régression totale de certaines tumeurs transplantées chez la Souris (CARSWELL *et al.*, 1975); de plus, il inhibe la formation de métastases chez l'animal.

Des observations *in vitro* ont également été réalisées : le TNF- α est cytostatique et même cytolytique pour plusieurs lignées cellulaires malignes ainsi que pour les cellules 3T3 transformées par voie virale (SUGARMAN *et al.*, 1985). Cependant, il n'a pas d'effet inhibiteur sur une variété de cellules normales (CARSWELL *et al.*, 1975) et peut même stimuler la prolifération de certains types cellulaires (SUGARMAN *et al.*, 1985).

Le TNF- α stimule la synthèse de prostaglandines E_2 , de l'interleukine 1, de collagénases et de l'interféron (BACHWICH *et al.*, 1986).

C'est aussi un inhibiteur de la prolifération des cellules endothéliales *in vitro* (FRATER-SCHRÖDER *et al.*, 1987 et SATO *et al.*, 1987), l'inhibition a lieu pour des concentrations de TNF- α variant de 0,1 à 10 ng/ml même lorsque la croissance des cellules est stimulée par le facteur de croissance fibroblastique (FGF). Son action est, par contre, réversible et non cytotoxique.

Paradoxalement, le TNF- α ne semble pas inhiber la prolifération cellulaire *in vivo* et ne supprime pas l'effet angiogénique du FGF sur la cornée de Lapin. Au contraire, dans ce système, il stimule la néovascularisation (FRATER-SCHRÖDER *et al.*, 1987). Le TNF- α induit également la formation de capillaires sanguins dans la cornée de Rat et dans la membrane chorio-allantoïdienne d'oeuf de Poule à des doses très faibles, inférieures à 3,5 ng (0,2 pmole) (LEIBOVICH *et al.*, 1987).

B - LES FACTEURS DE CROISSANCE QUI PRESENTENT UNE AFFINITE POUR L'HEPARINE.

Les plus connus et les plus étudiés de ces facteurs sont les facteurs de croissance fibroblastiques (FGF). Parmi les nombreuses revues générales concernant ces facteurs, nous pouvons citer celles de GOSPODAROWICZ (1986 et 1987) et de THOMAS (1987).

Ces facteurs de croissance dénommés classiquement FGF appartiennent à une famille de polypeptides qui présentent *in vitro* une activité mitogène potentielle pour une variété de cellules d'origine mésodermique comme les fibroblastes, les cellules endothéliales vasculaires et cornéennes, les chondrocytes, les ostéoblastes, les myoblastes, les cellules musculaires lisses et les cellules gliales (THOMAS et GIMENEZ-GALLEGO, 1985).

Ces facteurs possèdent également une activité angiogénique.

Deux types de FGF ont été décrits; ces deux espèces possèdent cependant la même masse moléculaire, les mêmes activités biologiques et une homologie de structure primaire de 55 %. Ces facteurs diffèrent par leur point isoélectrique et de ce fait, ils ont été dénommés respectivement FGF acide (aFGF) et FGF basique (bFGF).

1 - Propriétés physico-chimiques des FGF.

a - Le FGF acide (aFGF).

Le aFGF a été isolé pour la première fois à partir du tissu nerveux. La protéine purifiée a un point isoélectrique compris entre 5 et 7 et donne un doublet en électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS. Les masses moléculaires des protéines de ce doublet sont respectivement de 15,2 kDa et 15,9 kDa (THOMAS et GIMENEZ-GALLEG0, 1985).

Les séquences de ces deux aFGF sont identiques, seule la perte des six premiers résidus d'acides aminés de la région N-terminale d'un des deux protagonistes permet de les distinguer .

b - Le FGF basique (bFGF).

Le bFGF a été isolé de nombreux tissus (tissu nerveux, glande pituitaire, cortex cérébral, corps jaune, placenta).

Sa masse moléculaire, appréciée en gel de polyacrylamide en présence de SDS, se situe entre 16 kDa et 18 kDa, son point isoélectrique est de 9,6.

Souvent, le bFGF donne également un doublet, ceci pourrait résulter du clivage de la protéine entre les résidus d'acides aminés Gly-15 et His-16 (ESCH et al., 1985).

2 - Activités biologiques des facteurs de croissance fibroblastiques.

Les rôles des FGF *in vitro* ne sont pas connus du fait de leur activité sur de nombreux types cellulaires. Cependant, il est supposé qu'ils agissent en tant que facteurs de croissance universels jouant un rôle non seulement dans la stimulation et la coordination de la prolifération cellulaire pendant le développement embryonnaire et la croissance mais aussi dans la réparation et la régénération des tissus lors des processus de cicatrisation et de renouvellement tissulaire (GOSPODAROWICZ, 1987).

Certains auteurs émettent même l'hypothèse que d'autres facteurs angiogéniques puissent agir en favorisant la synthèse ou la libération de FGF (FOLKMAN et KLAGSBRUN, 1987).

Lors de maladies néoplasiques, les tumeurs solides ne peuvent se développer qu'à l'aide d'une vascularisation intense (FOLKMAN, 1974). Elles induisent donc l'angiogénèse de façon continue jusqu'à leur destruction ou la mort du patient... Il a été supposé que le FGF ou des peptides proches du FGF étaient impliqués dans l'angiogénèse tumorale (THOMAS et GIMENEZ-GALLEGO, 1985). Cette suggestion est désormais confortée par la découverte récente de trois oncogènes en relation avec le FGF basique (MARX, 1987). Le premier de ceux-ci, hst, isolé des cancers de l'estomac et de la vessie comme du sarcome de Kaposi, présente environ 45 % d'homologie de structure primaire avec le FGF basique. Int-2, isolé d'une tumeur mammaire chez la Souris, présente également une grande homologie avec le bFGF. Le troisième oncogène codant pour une protéine analogue au FGF fut isolé d'un cancer de la vessie.

3 - Relation entre le FGF et l'angiogénine.

Le test d'angiogénèse de la membrane chorio-allantoïdienne d'oeuf de Poule a été utilisé pour évaluer l'activité angiogénique d'échantillons renfermant des proportions variables d'angiogénine humaine et de aFGF (FETT et al., 1987). En effet, par cette approche, des renseignements concernant le mécanisme d'action de l'angiogénine humaine pouvaient être obtenus : une réponse additive peut signifier des interactions de chaque protagoniste avec son récepteur spécifique; à l'inverse, une réponse d'inhibition impliquerait une compétition des deux antagonistes vis-à-vis d'un même récepteur.

Au cours de cette expérimentation, aucune activité résultante de type additif ou synergique n'a pu être observée.

Cependant, un effet inhibiteur apparent a été mis en évidence quand l'angiogénine humaine et le aFGF sont ajoutés en proportions égales. Ceci pourrait être dû à des interactions ioniques entre les deux molécules, celles-ci étant de charges opposées à pH neutre.

De ce fait, aucune conclusion n'a pu être tirée en ce qui concerne le mécanisme d'action de l'angiogénine humaine.

C - FACTEURS ANGIOGENIQUES DIVERS.

1 - Les facteurs mécaniques.

Il semblerait, d'après certains auteurs (FOLKMAN & MOSCONA, 1978), qu'une corrélation puisse être établie entre la forme des cellules et leur prolifération.

En effet, plus les cellules sont plates, plus la synthèse de leur ADN est rapide. Par contre, les cellules endothéliales confluentes ont une forme ronde et la synthèse de leur ADN est plus lente.

2 - Les interactions intercellulaires.

Les membranes de cellules endothéliales confluentes sont capables d'inhiber la croissance de cellules endothéliales en pleine croissance (HEIMARK & SCHWARTZ, 1985). Ainsi les cellules endothéliales, par des interactions intercellulaires, pourraient contrôler leur propre croissance. Cependant, ce contrôle peut être réalisé par interactions entre cellules de nature différente; en effet, la prolifération de cellules endothéliales capillaires est inhibée lors de co-culture avec des péricytes alors que le milieu de culture de péricytes n'a pas cet effet inhibiteur (D'AMORE & THOMPSON, 1987).

Bien que ces interactions soient mises en évidence, aucune explication concernant le mécanisme ou les éléments membranaires mis en jeu n'a pu être encore fournie.

3 - La matrice extracellulaire.

En présence d'éléments de la matrice extracellulaire, des modifications morphologiques de cellules endothéliales ont été observées (MADRI & WILLIAMS, 1983). Ces cellules, mises en culture sur du collagène interstitiel, prolifèrent et migrent mais elles ne forment des structures tubulaires qu'après une longue période de culture. Par contre, lors de mise en culture sur la membrane basale, ces cellules ne prolifèrent pas et ne migrent pas, mais elles sont cependant capables de former des structures pseudo-vasculaires très rapidement.

Tous ces phénomènes restent jusqu'à présent inexplicés, toutefois, même si ces effets peuvent être directs, l'hypothèse la plus soutenue

actuellement est l'emprisonnement de facteurs de croissance par la matrice extra-cellulaire. Lors d'un stimulus angiogénique, une succession d'événements conduirait à la libération de ces facteurs et donc à la prolifération des cellules endothéliales.

4 - Le cuivre.

L'intervention du cuivre dans le mécanisme d'angiogénèse a été évoquée dès qu'il a été remarqué que des Lapins déficients en cuivre étaient incapables de réagir à un stimulus angiogénique (ZICHE et al., 1982).

De même, la céruléoplasmine, l'héparine et le tripeptide glycyl-L-histidyl-L-lysine ont des propriétés angiogéniques *in vivo* lorsqu'ils sont complexés au cuivre (RAJU et al., 1982).

5 - Les lipides.

Certaines prostaglandines comme le PGE₁ ou le PGE₂ possèdent une activité angiogénique (BENEZRA, 1978). Ainsi, une dose de 1 µg de PGE₁ est suffisante pour induire la vascularisation de la cornée (ZICHE et al., 1982). Le PGE₂, quant à lui, provoque le développement de vaisseaux sanguins dans la membrane chorio-allantoïdienne à des doses variant de 0,2 à 20 ng (FORM & AUERBACH, 1983).

6 - Les champs électromagnétiques pulsés.

Des champs électro-magnétiques pulsés ont déjà été utilisés en médecine pour le traitement de certaines fractures (BASSET et al., 1982 et BASSET, 1983). Il est de ce fait suggéré que la stimulation de l'ostéogénèse par les champs électriques résulte de l'induction de la néovascularisation au niveau de la fracture.

Ainsi récemment, YEN-PATTON et al. (1988) ont-ils montré que l'application d'un champ électro-magnétique pulsé à des cultures de cellules endothéliales d'aorte bovine ou de cordon ombilical se traduisait par l'augmentation de la vitesse de croissance et l'allongement de ces cellules ainsi que leur organisation en structures pseudo-vasculaires.

7 - Remarques.

Si les agents responsables de l'angiogénèse peuvent être, comme nous l'avons vu, d'origines très diverses, seuls les facteurs moléculaires présentent actuellement un intérêt accru car ils pourraient être largement utilisés en tant que principes actifs dans l'industrie pharmaceutique.

Bon nombre de ces molécules sont d'ores et déjà produites par génie génétique mais leur utilisation n'est cependant pas encore réalisée.

Le FGF est le facteur angiogénique le plus étudié, l'hypothèse la plus soutenue actuellement étant son existence en tant que facteur de croissance universel, celui-ci, emprisonné dans la matrice extracellulaire, serait libéré à la suite d'une succession d'événements déclenchés par d'autres facteurs moléculaires.

V - CONCLUSIONS.

L'angiogénine humaine est une protéine de 14,4 kDa composée de 123 résidus d'acides aminés dont l'enchaînement a été déterminé. Elle présente une homologie de 35 % avec la ribonucléase A. Sa structure tridimensionnelle probable a été établie sur la base des données structurales de la ribonucléase A, cependant, elle reste à confirmer par l'analyse en diffraction des rayons X après cristallisation de la molécule.

La principale propriété biologique de l'angiogénine humaine est sa capacité d'induire l'angiogénèse à des doses très faibles. Bien que l'homologie de structure avec la ribonucléase A soit importante, cette protéine ne présente aucune activité ribonucléasique vis-à-vis de substrats conventionnels des ribonucléases mais permet la dégradation partielle des ARN ribosomiques 18 et 28 S. Cette activité enzymatique tout comme son activité angiogénique est inhibée par l'inhibiteur placentaire des ribonucléases (PRI). De plus, le PRI possède une affinité beaucoup plus importante pour l'angiogénine humaine que pour la ribonucléase A.

In vitro, l'angiogénine humaine est capable de bloquer la synthèse des protéines de manière spécifique et de stimuler l'activité de la phospholipase C spécifique de l'inositol de certaines cellules endothéliales.

Récemment, l'angiogénine du sang de Boeuf a été isolée et partiellement caractérisée. Elle semble présenter les mêmes caractéristiques que l'angiogénine humaine, cependant son activité sur les ARN ribosomiques 18 et 28 S semble plus faible.

Bien que l'angiogénine humaine ait été parfaitement caractérisée sur le plan physico-chimique et que certaines de ses activités aient été décrites, aucune information sur son mode d'action n'a pu être obtenue jusqu'à présent.

L'angiogénine se fixe-t-elle sur un récepteur membranaire?

Agit-elle selon un mode endocrine, paracrine ou autocrine?

Pénètre-t-elle dans les cellules cibles ou induit-elle l'action d'une autre molécule en se fixant sur la membrane plasmique?

Existe-t-il une réelle corrélation entre ses activités secondaires et son activité angiogénique?

S'agit-il réellement d'une ribonucléase particulière?

Le PRI n'est-il pas l'agent de contrôle de l'angiogénèse provoquée par l'angiogénine?

Toutes ces questions sont malheureusement sans réponse dans l'état actuel des connaissances.

A l'époque où seule l'angiogénine humaine avait été purifiée à partir de cellules cancéreuses établies en lignée cellulaire (cellules HT-29) et partiellement caractérisée, nous avons isolé fortuitement une fraction renfermant principalement des peptides dont la masse moléculaire se situe aux environs de 15 kDa, et cela, à partir du lait de Vache. Il s'avéra très vite que l'une des protéines constituant cette fraction présentait une homologie importante avec l'angiogénine humaine. Nous avons donc établi un protocole de purification de l'angiogénine bovine à partir de lait de Vache, nous avons ensuite caractérisé physico-chimiquement cette molécule avant de vérifier qu'elle présentait certaines propriétés biologiques de l'angiogénine humaine. Les résultats que nous avons obtenus constituent la seconde partie de ce mémoire.

TRAVAUX PERSONNELS

ISOLEMENT ET PURIFICATION DE L'ANGIOGENINE BOVINE.

Lors d'essais de purification de la lactotransferrine bovine, une fraction renfermant des contaminants très basiques dont la masse moléculaire est d'environ 15 kDa a été isolée. Initialement, nous avons émis l'hypothèse que cette fraction correspondait à des produits de dégradation de la lactotransferrine bovine. Afin de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse nous avons envisagé de vérifier si cette fraction était reconnue à la fois par des anticorps poly- et monoclonaux spécifiques de la lactotransferrine bovine. Après électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS et de β -mercaptoéthanol, les protéines ont été transférées du gel sur une feuille de nitrocellulose. Ensuite, cette feuille a été colorée soit à l'Amidoschwartz, soit par immunorévélation en utilisant l'un ou l'autre des anticorps cités précédemment selon les techniques décrites page 45.

Le résultat est présenté figure 6 p.33 et nous pouvons remarquer que le contaminant d'environ 15 kDa est reconnu aussi bien par les anticorps polyclonaux préparés chez le Lapin que par les anticorps monoclonaux obtenus chez la Souris, dirigés contre la lactotransferrine bovine.

Il semblait donc, à priori, que ce peptide correspondait à un produit de dégradation de la lactotransferrine bovine. Il était alors intéressant de connaître sa structure primaire puisque celle de la lactotransferrine bovine était jusqu'alors inconnue. La préparation fut donc transmise au Laboratoire de Chimie des Bio-molécules de l'Institut Pasteur de Lille dirigé par le Professeur TARTAR en vue de la détermination de sa séquence. Cette analyse révéla la présence dans la préparation d'une protéine dont la séquence primaire de la partie N-terminale présentait une homologie importante avec l'angiogénine

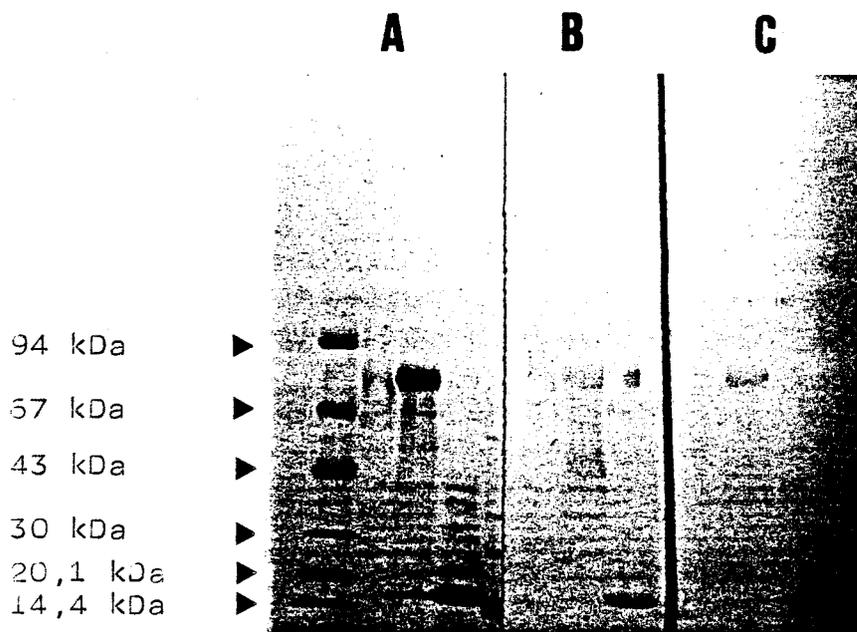


Figure 6 : Révélation d'une fraction à 17 kDa.

A : par l'Amidoschwartz

B : par immunorévélacion avec des anticorps polyclonaux spécifiques de la lactotransferrine bovine.

C : par immunorévélacion avec des anticorps monoclonaux spécifiques de la lactotransferrine bovine.

humaine, protéine qui n'avait, à l'époque, été isolée qu'à partir de surnageants de culture de cellules cancéreuses.

Dans le présent chapitre, nous décrirons donc une méthode d'isolement de l'angiogénine bovine à partir de lait de Vache et dans un deuxième temps, une méthode de préparation de l'angiogénine bovine à partir d'une préparation commerciale de lactotransferrine bovine.

Ces deux méthodes de purification ont conduit également à l'isolement de plusieurs peptides dont la nature n'est pas encore déterminée.

I - PURIFICATION DE L'ANGIOGENINE BOVINE A PARTIR DU LAIT DE VACHE.

A - MATERIEL ET METHODES.

1 - Délipidation du lait.

Nous avons purifié l'angiogénine à partir de lait de Vache stabilisé frais que nous nous procurons auprès d'une ferme locale.

L'élimination de la matière grasse est réalisée par centrifugation soit directement à la ferme au moyen d'une écrémeuse, soit par centrifugation à 3000 g pendant 15 minutes à 4° C au Laboratoire. Cette délipidation est indispensable pour éviter l'adsorption sur l'échangeur de cations de particules de matière grasse et donc l'encrassement de cet échangeur.

2 - Chromatographie de "Batch adsorption" des protéines basiques du lait de Vache sur résine SP Séphadex.

83 g de résine échangeuse de cations SP Séphadex C 50 (Pharmacia) sont ajoutés à 50 l de lait délipidé. Compte tenu du coefficient de gonflement de cette résine dans l'eau (60 ml/g), cette quantité correspond à 5 l d'échangeur équilibré dans l'eau. C'est d'ailleurs sous cette forme que la résine pourra être réutilisée.

Le contact d'une durée de 4 heures est réalisé sous agitation douce grâce à une hélice.

Après la fixation des protéines basiques, la suspension est filtrée sur büchner (diamètre = 30cm) en utilisant un filtre de soie "Monodur" (Soie monodur de Tripette et Renaud 100 % nylon Blutex T N° 60 code article 161902). La filtration est facilitée par tirage sous vide.

L'échangeur est alors lavé sous agitation douce, à l'aide d'une solution d'acétate de sodium 0,22 M ou même de l'eau déminéralisée jusqu'à ce que l'effluent soit limpide. Environ 25 l sont nécessaires à ce lavage.

Deux fractions sont ensuite éluées par des solutions d'acétate de sodium de concentrations respectives 0,35 M et 1,2 M.

3 - Chromatographie sur colonne de S-Sépharose Fast Flow.

La fraction obtenue précédemment par élution au moyen d'une solution d'acétate de sodium 1,2 M est diluée jusqu'à ce que sa concentration en acétate de sodium soit de 0,22 M et injectée sur colonne de S-Sépharose Fast-Flow (5 x 10 cm) à un débit de 1,5 l par heure. La colonne est lavée par 1 l de solution d'acétate de sodium 0,22 M. La fraction F1 enrichie en angiogénine est éluée par une solution d'acétate de sodium 0,4 M, mise à dialyser contre l'eau puis lyophilisée.

4 - Purification de l'angiogénine du lait de Vache par chromatographie sur système FPLC.

a - Purification de l'angiogénine bovine sur colonne de Phényl-superose HR 5/5.

Les protéines sont retenues sur colonne de Phényl-superose HR 5/5 (Pharmacia) dans des conditions de force ionique très élevée. Elles sont ensuite éluées sélectivement par abaissement progressif de la force ionique.

500 µl d'une solution à 6 mg/ml de la fraction F1 dissous dans un tampon phosphate 50 mM, sulfate d'ammonium 1,7 M pH 7 sont injectés sur la colonne préalablement équilibrée dans le même tampon. Après rinçage de la colonne par le tampon pendant 10 min., la concentration en sulfate d'ammonium est amenée à zéro par un gradient linéaire de 25 min., le débit utilisé est de 0,5 ml/min.

b - Purification de l'angiogénine bovine sur colonne Mono-S.

Il s'agit d'une nouvelle étape de chromatographie d'échange de cations sur colonne. Nous avons utilisé une colonne Mono S HR 5/5 (Pharmacia) équilibrée dans un tampon phosphate 10 mM, NaCl 150 mM pH 7 (PBS). 500 µl d'une solution à 2 mg/ml de fraction F1 dissoute dans le PBS sont injectés sur la colonne dont le débit est de 1 ml/min.

L'élution de l'angiogénine ainsi que celles des différentes fractions est obtenue en appliquant sur la colonne un gradient par paliers d'un tampon phosphate 10 mM, NaCl 1,15 M pH 7 (tampon B).

5 - Purification de l'angiogénine bovine par chromatographie liquide à haute pression (HPLC).

Dans le but de préparer un antisérum de qualité, réellement spécifique de l'angiogénine, nous avons purifié l'antigène par une nouvelle étape de chromatographie liquide à haute pression (HPLC) sur colonne PLRP-S (Polymer Laboratories) dont le support est un polymère de polystyrène greffé par le divinylbenzène (300 Å et 8 microns). Ainsi, le produit obtenu lors de la chromatographie de la fraction F1 sur colonne de Mono S (pic 2) est injecté. La chromatographie est réalisée dans un système acétonitrile-Acide trifluoroacétique 0,08 %/eau-Acide trifluoroacétique 0,1 %. L'élution est réalisée par un gradient continu de 20 % à 60 % en acétonitrile, en 30 minutes. La détection se fait à 214 nm.

B - RESULTATS.

1 - Chromatographie de "Batch adsorption" sur SP Séphadex.

La première fraction éluée de l'échangeur de cations renferme principalement la lactoperoxydase. L'élution de cette fraction est obtenue par 10 l de solution d'acétate de sodium 0,35 M ajoutés sous agitation en 5 fois.

La fraction enrichie en angiogénine est ensuite éluée par 5 l de solution d'acétate de sodium 1,2 M ajoutés également en 5 fois, sous agitation.

2 - Chromatographie sur colonne de S-Sépharose Fast flow.

Cette nouvelle étape de chromatographie d'échange d'ions permet de préparer une fraction F1 renfermant principalement l'angiogénine bovine, cette dernière étant éluée de la colonne par une solution d'acétate de sodium 0,4 M.

La chromatographie de 50 l de lait permet d'isoler environ 100 mg de fraction F1, soit un rendement de 2 mg par litre.

3 - Purification de l'angiogénine du lait de Vache.

Initialement nous avons imaginé purifier l'angiogénine bovine par chromatographie en phase réserve en système HPLC sur colonne μ Bondapak C18. Malheureusement en optimisant au maximum le système nous n'avons pu résoudre le mélange protéique que constitue la fraction F 1. En effet, nous obtenions des profils chromatographiques tels que celui représenté Fig 7 p. 38.

Nous avons donc entrepris de fractionner la fraction F 1 en système FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) car la diversité et la résolution des colonnes proposées par la firme Pharmacia qui commercialise ce système sont excellentes. Parmi, les différents types chromatographiques et conditions expérimentales que nous avons utilisés, deux ont donné d'excellents résultats : l'échange de cations sur colonne Mono S et la chromatographie d'adsorption hydrophobe sur colonne de Phényl superose. Nous allons donc développer les résultats obtenus selon ces deux méthodes.

a - Chromatographie sur colonne "Phényl-superose".

Le profil chromatographique obtenu est donné dans la figure 8 p.39. L'analyse en gel de polyacrylamide en présence de SDS du pic 1 présente une bande homogène de 15 kDa tandis que le pic 2 renferme principalement une protéine de masse moléculaire d'environ 16,5 kDa. La fraction correspondant au pic 1 a été transmise au Laboratoire de Chimie des Bio-molécules de l'Institut Pasteur de Lille afin que la séquence des acides aminés de sa partie N-terminale soit déterminée. L'analyse au microséquenceur des 50 premiers résidus d'acide aminé de ce peptide révèle une homologie de 26 % avec l'angiogénine humaine.

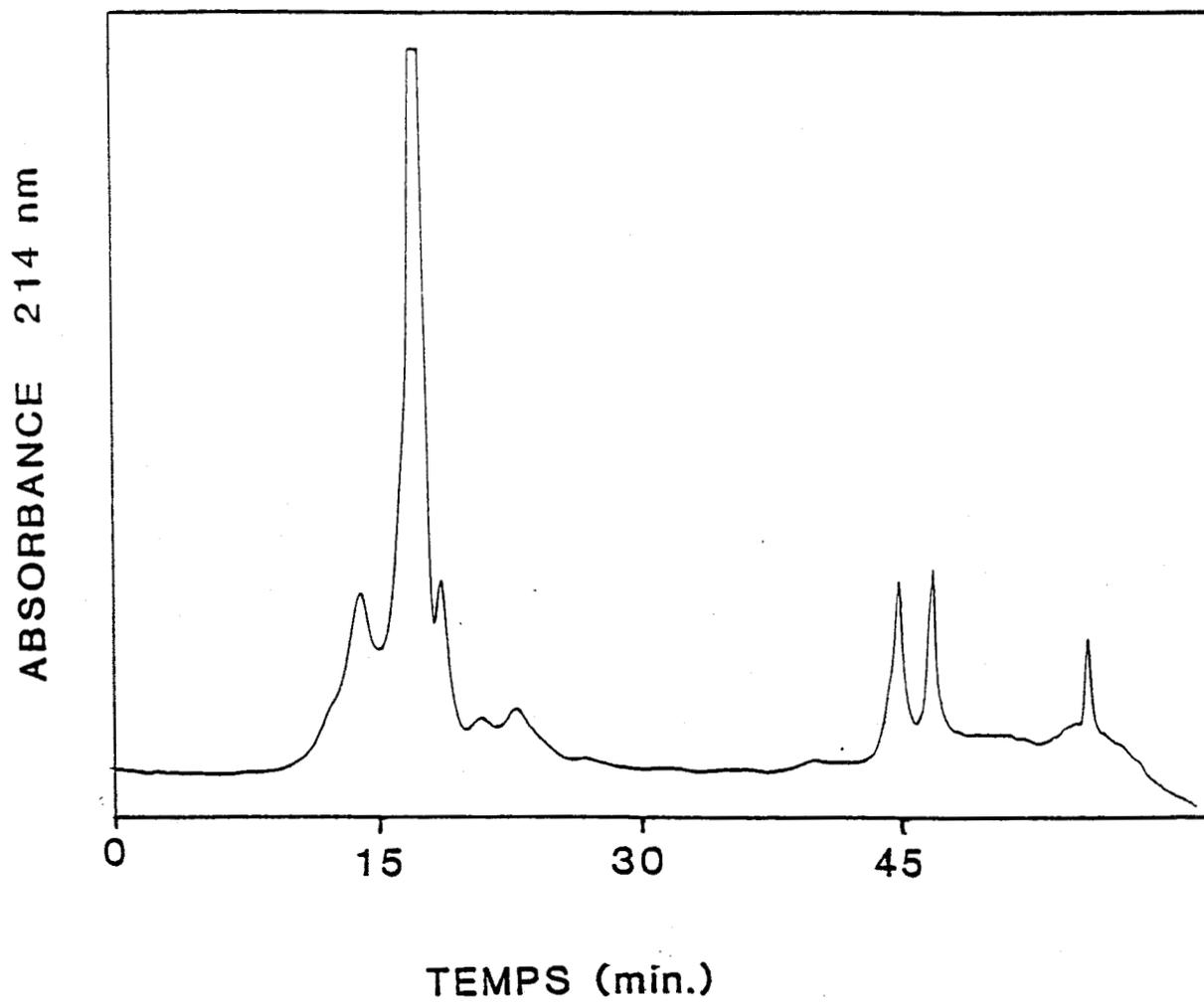
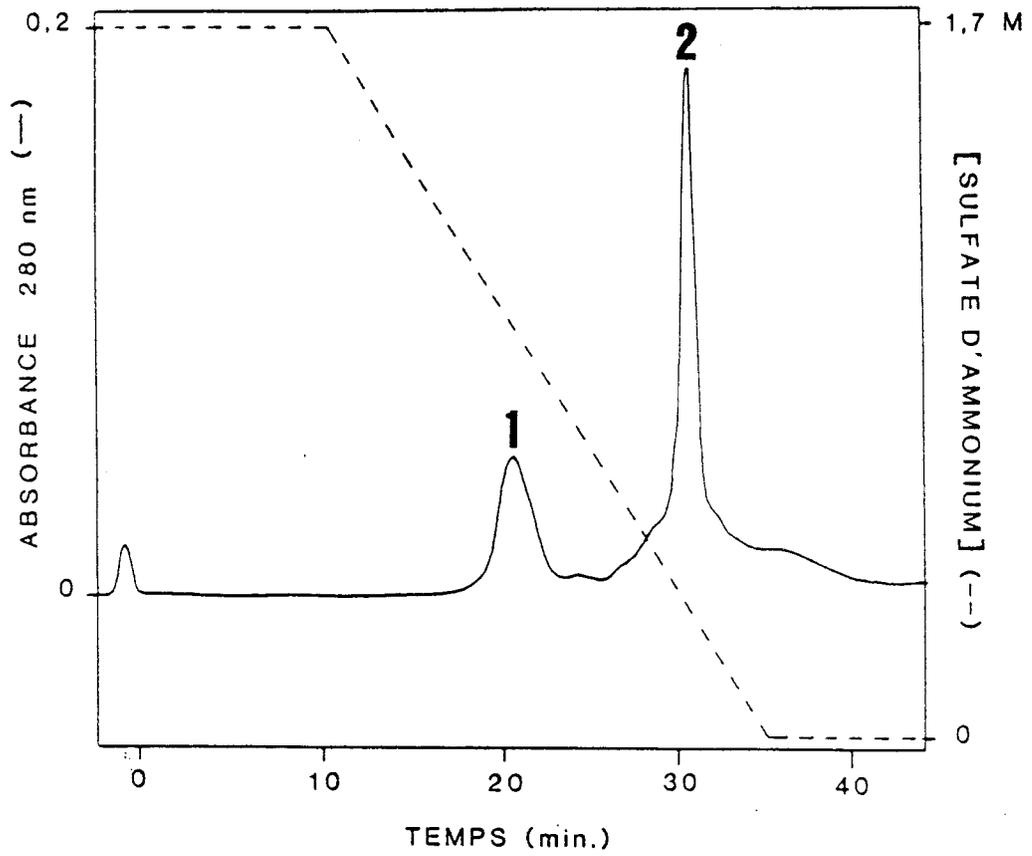


Figure 7 : Chromatographie de la faction F1 sur colonne μ -Bondapak (HPLC).

**A**

1 2 F1
 ↓ ↓ ↓

◀ 94 kDa

◀ 67 kDa

◀ 43 kDa

◀ 30 kDa

◀ 20,1 kDa

◀ 14,4 kDa

B

Figure 8 : A - Chromatographie de la faction F1 sur colonne de Phényl-Superose (FPLC).

B - Analyse en gel de polyacrylamide en présence de SDS.

Les rendements que nous avons obtenus avec cette méthode sont de l'ordre de 0,3 mg d'angiogénine purifiée par mg de fraction F 1.

Cette méthode permet donc de séparer l'angiogénine bovine des autres protéines de la fraction F1, cependant, compte tenu des conditions de force ionique élevée qui sont imposées à la protéine au cours de sa purification nous l'avons rapidement abandonnée au profit d'une méthode de chromatographie sur échangeur de cations.

b - Chromatographie sur colonne "Mono-S".

Le diagramme d'élution représenté Fig.9 p.41 montre que quatre fractions sont séparées. Nous remarquons que les fractions 0, 1 et 2 sont éluées à la même force ionique, soit 13 % en tampon B, alors que la fraction 3 n'est éluee qu'en augmentant considérablement la force ionique.

Les différentes fractions 0, 1, 2 et 3 ont été analysées en gel de polyacrylamide en présence de SDS, seule la fraction 2 présente une bande homogène à environ 15 kDa, le pic 1 présentant une bande supplémentaire à 16,5 kDa.

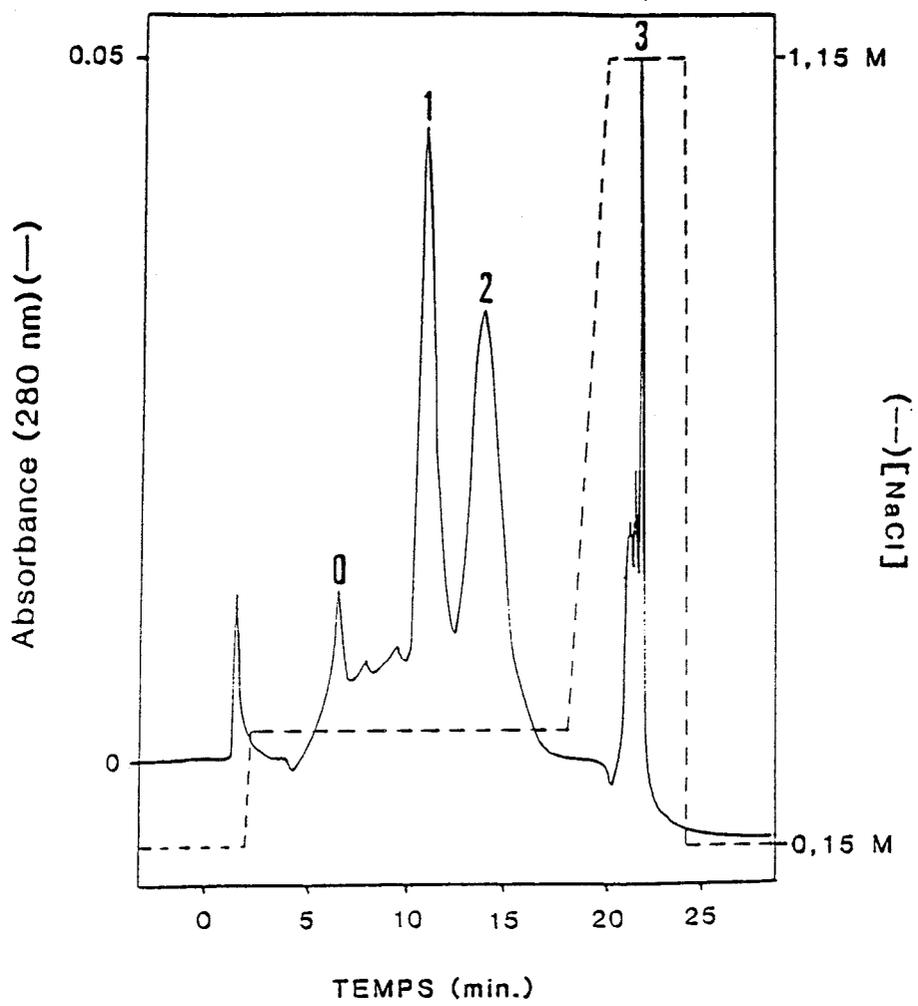
L'analyse au microséquenceur du pic 2 a révélé que celui-ci correspondait à l'angiogénine bovine. Par cette méthode, nous avons également pu obtenir 0,3 mg d'angiogénine par mg de fraction F 1.

c - Chromatographie de phase inverse sur système HPLC.

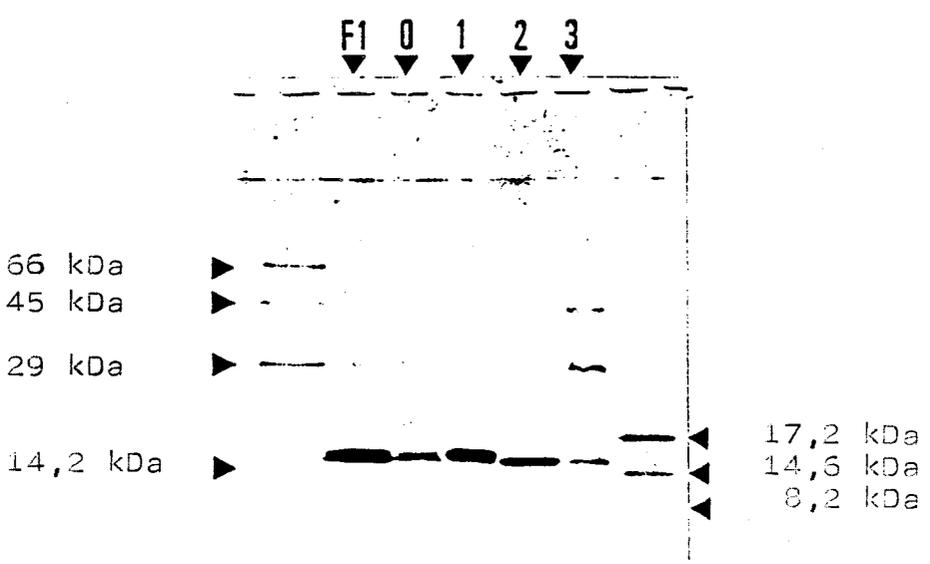
Le produit obtenu précédemment par chromatographie de la fraction F1 sur colonne Mono-S (pic 2) est injecté sur colonne PLRP-S. Sur le chromatogramme de la p.42 nous constatons qu'un seul produit est élué de la colonne. L'acétonitrile est ensuite évaporé par centrifugation sous vide. Cette préparation sera complétée d'adjuvant de Freund et, par la suite, injectée à un Lapin. Nous espérons ainsi obtenir des anticorps réellement spécifiques de l'angiogénine bovine.

C - DISCUSSION.

La bande à 15 kDa que nous avons observée initialement en gel de polyacrylamide en présence de SDS (gradient 5-15 %) correspond, en fait, à deux protéines de masses moléculaires apparentes respectives 15 et



A



B

Figure 9 : A - Chromatographie de la fraction F1 sur colonne Mono-S (FPLC).

B - Analyse en gel de polyacrylamide en présence de SDS.

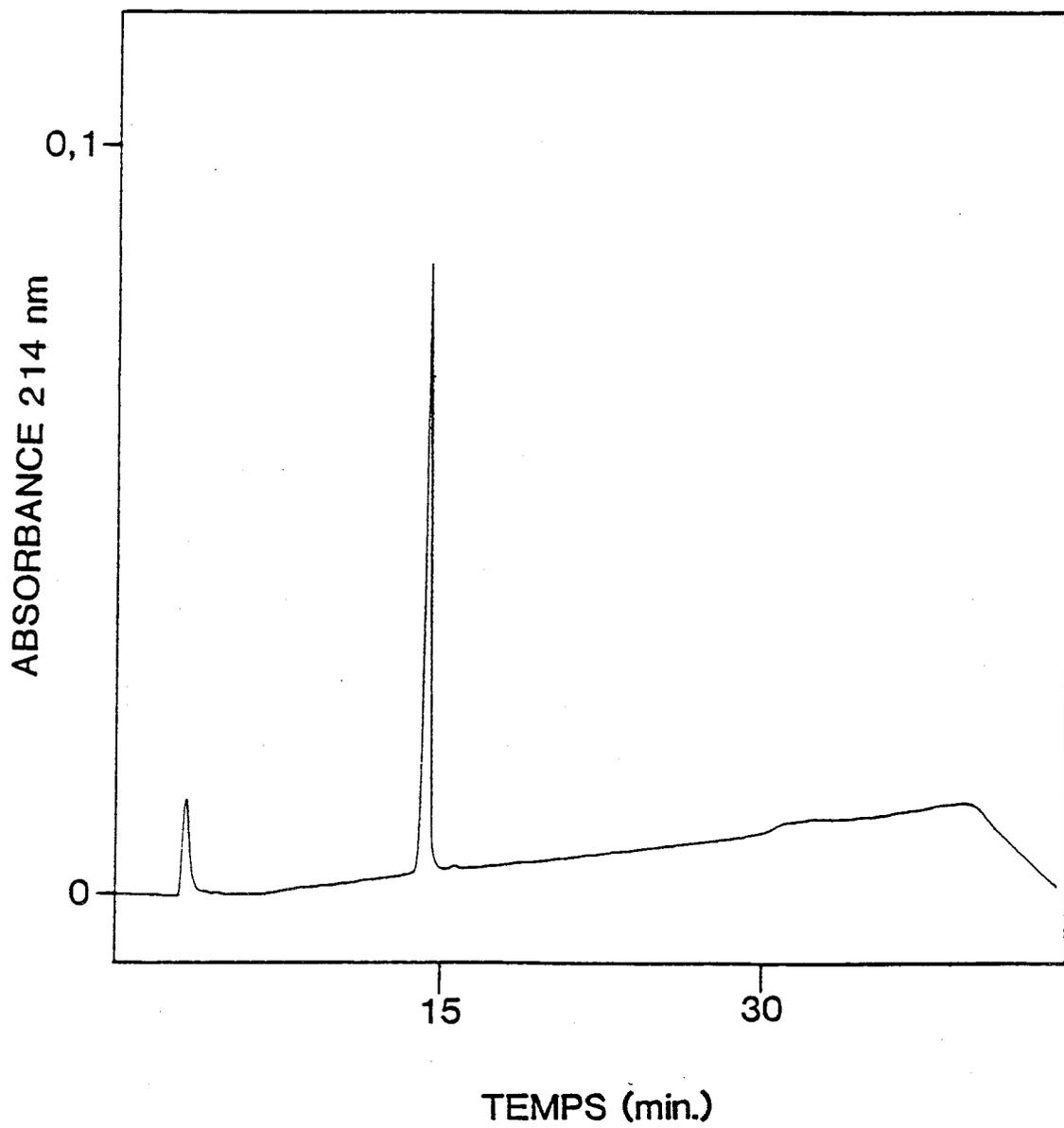


Figure 10 : Chromatographie de l'angiogénine bovine sur colonne PLRP-S (HPLC).

16,5 kDa. La première de ces protéines a été identifiée à l'angiogénine bovine.

La purification de l'angiogénine bovine à partir du lait peut être réalisée par une cascade d'échanges d'ions (d'abord sur SP Séphadex C50, puis sur S Sépharose Fast-Flow et enfin sur Mono S) ou par la succession de 2 échanges d'ions et d'une chromatographie d'adsorption hydrophobe sur colonne de phényl superose.

Par l'une ou l'autre des méthodes, les quantités d'angiogénine obtenues ont permis de déterminer que la fraction F1 renfermait environ 30 % d'angiogénine bovine . A partir de 50 l de lait délipidé, nous avons obtenu 100 mg de fraction F1, ce qui correspond donc à 30 mg environ d' angiogénine bovine. Nous obtenons donc un rendement final de l'ordre de 0,5 à 0,6 mg d'angiogénine bovine par litre de lait.

Ces méthodes permettent une préparation rapide de l'angiogénine bovine, préparation qui pourrait, par la suite, être optimisée en supprimant l'étape de lyophilisation intermédiaire de la fraction F1.

L'avantage de cette méthode est l'utilisation, au cours des deux premières étapes de la purification, de l'acétate de sodium en solution et non en système tampon, en effet, la variabilité du pH de ces solutions n'est pas de nature à modifier le comportement des protéines basiques du lait sur l'échangeur de cations. De plus, le débit rapide toléré par la colonne de S-Sépharose Fast Flow évite une étape supplémentaire de dessalage et de lyophilisation.

II - DETERMINATION DE LA NATURE DES DIFFERENTES FRACTIONS OBTENUES LORS DU FRACTIONNEMENT DE LA FRACTION F1 SUR COLONNE DE MONO S.

A -MATERIEL ET METHODES.

Afin de déterminer le degré de pureté de l'angiogénine du lait de Vache et de tenter d'élucider la nature des différentes protéines que nous avons séparées lors du fractionnement de la fraction F 1 sur colonne "Mono-S", nous avons préparé des anticorps spécifiques de l'angiogénine bovine ou de la fraction F 1 et utilisé les techniques immunochimiques classiques.

1 - Préparation des antiséras.

a - Antisérums dirigés contre la fraction F1.

Un antisérums a été préparé chez le Lapin à partir de la fraction F1 enrichie en angiogénine. L'immunisation des Lapins est effectuée selon la méthode décrite par VAITUKATIS *et al.* (1971). Un mélange renfermant 1 mg de fraction F1 dissous dans 1 ml de sérum physiologique, et 0,5 ml d'adjuvant de FREUND complet, est injecté sur le dos du Lapin en une quarantaine d'injections intradermiques. Parallèlement, un vaccin anticoquelucheux est injecté en sous-cutané. Après 15 jours, 0,5 mg de fraction F1 dissous dans 0,5 ml de sérum physiologique sont à nouveau injectés avec 0,25 ml d'adjuvant complet de FREUND. Un rappel est effectué tous les 15 jours avec 0,25 mg de fraction F1 dissous dans 0,5 ml d'adjuvant de FREUND complet.

b - Antisérums dirigés contre l'angiogénine.

L'angiogénine obtenue après purification en système HPLC sur colonne PLRP-S est supplémentée d'adjuvant de FREUND avant d'être injectée au Lapin selon la méthode décrite précédemment.

2 - Immunorévélation après électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS et électrotransfert sur feuille de nitrocellulose.

a - Electrophorèse en gel de polyacrylamide.

Les électrophorèses en gel de polyacrylamide sont réalisées dans un appareil vertical en plaques (1,5 X 140 X 180 mm) (Bio-Rad) dans le système tampon préconisé par LAEMMLI (1970). Le gel de séparation est constitué d'un gradient variant de 5 à 15 % en acrylamide dans un tampon Tris-glycocolle, HCl, pH 8,9 ou d'un gel de concentration constante. Le gel de concentration est à 5 % 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 (5 à 30 µg de protéines par dépôt) sont solubilisés dans un 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 minutes. 25 µl de la solution échantillon sont déposés sur le gel d'acrylamide.

b - Electrotransfert sur feuille de nitrocellulose (Western blotting).

Les protéines, séparées par électrophorèse en gel de polyacrylamide, sont ensuite transférées par électrophorèse (cellule de transfert Bio-Rad) sur une feuille de nitrocellulose (Schleicher et Schüll) dans le tampon Tris 25 mM, glyco-colle 192 mM, pH 8,4, méthanol 20 %, selon la méthode décrite par TOWBIN et al. (1979) et BURNETTE (1981). L'électrophorèse est réalisée sous 200 mV, à 4° C pendant 3 heures.

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

c - Immunorévélation.

Après le transfert nous réalisons un "bloquage" de la feuille de nitrocellulose visant à éviter les adsorptions non spécifiques. Ceci, est réalisé par une solution de PBS contenant 2 % de Tween 20 (polyoxyéthylène-sorbitan monolaurate, Sigma) pendant 2 minutes. La feuille est alors lavée 3 fois rapidement par une solution PBS - Tween 0,05 %

L'incubation est menée durant 3 heures à température ambiante dans le PBS - Tween 0,05 % contenant l'antisérum dans une proportion 1/1000.

Après 3 lavages rapides par le PBS-Tween 0,05 %, les anticorps anti IgG de Lapin marqués à la peroxydase (Institut Pasteur) sont mis en présence de la feuille de nitrocellulose pendant 1h30 à température ambiante dans un rapport de 1/2500.

3 lavages rapides par le PBS permettent d'éliminer la majeure partie des anticorps libres et du détergent. La révélation est réalisée par la 3,3' diaminobenzidine tétrahydrochloride (DAB) (Fluka) ou le 4-chloro-1-naphtol (BioRad) en présence d'eau oxygénée :

- 40 mg DAB pour 100 ml de PBS, addition d'1 ml d'eau oxygénée à

110 volume.

ou

- 60 mg de 4-chloro-1-naphtol dans 20 ml de méthanol pour 100 ml de PBS, addition de 60 μ l d'eau oxygénée à 110 volume.

3 - Techniques immunochimiques classiques.

L'immunoélectrophorèse a été réalisée selon la technique de GRABAR et WILLIAMS (1953) modifiée par SCHEIDEGGER (1955). Cette technique permet d'apprécier la pureté d'une préparation.

La double immunodiffusion radiale développée par OUCHTERLONY (1949) a été utilisée pour détecter l'angiogénine, mais également pour comparer les propriétés immunologiques des différentes fractions séparées par chromatographie sur colonne Mono-S.

La quantification de l'angiogénine bovine dans les différentes fractions a pu être réalisée par la technique d'immunodiffusion radiale de MANCINI *et al.* (1965).

4 - Détermination de la séquence N-terminale.

L'enchaînement des acides aminés de la partie N-terminale des protéines composant chacune des fractions a été déterminé au Laboratoire de Chimie des Biomolécules de l'Institut Pasteur de Lille.

B - RESULTATS.

1 - Analyse après électrotransfert sur feuille de nitrocellulose.

L'analyse des fractions 0, 1, 2 et 3 a été effectuée par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS, suivie d'un électrotransfert sur feuille de nitrocellulose. Les protéines ayant migré suivant leur masse moléculaire sont ensuite révélées par un antisérum selon la technique de TOWBIN *et al.* (1979). Dans un premier temps, nous avons vérifié la pureté de la fraction 2 correspondant à l'angiogénine bovine. Pour cela, après le transfert, les protéines sont révélées par un antisérum dirigé contre les protéines de la fraction F1. Une seule bande a pu être mise en évidence avec cette technique (Fig.11A p.48). La fraction 2 renferme donc uniquement l'angiogénine bovine.

Dans un deuxième temps, chaque fraction a été révélée par un antisérum spécifique de l'angiogénine bovine, préparé chez le Lapin (Fig.11B p.48). Nous pouvons constater qu'une bande à 15 kDa est révélée dans chacune des fractions. De plus, une bande à 16,5 kDa est révélée dans la fraction 1 ainsi qu'une bande à 29 kDa dans la fraction 3. Les anticorps dirigés contre l'angiogénine bovine reconnaissent donc trois protéines différentes : l'angiogénine et deux polypeptides de masses moléculaires respectives de 16,5 et 29 kDa.

Ces résultats laissent supposer l'existence de variants de l'angiogénine bovine, celle de dimères d'angiogénine bovine (bande à 29 kDa) ou encore celle de protéines possédant des épitopes communs avec l'angiogénine bovine.

2 - Analyse en immunoélectrophorèse.

Après migration par électrophorèse en gélose puis diffusion contre deux antiséras, nous observons que les fractions 0, 1 et 2 ne donnent qu'un seul arc de précipitation contre un antisérum spécifique de l'angiogénine bovine et contre l'antisérum dirigé contre les protéines de la fraction F1 (Fig.11C p.48). La fraction 3 donne un seul arc de précipitation contre le premier antisérum et deux arcs contre le second. D'après ces résultats, il est difficile de conclure que les fractions sont pures; en effet, il est probable que seules les protéines de la fraction 3 ont des points isoélectriques suffisamment différents pour permettre leur séparation par cette technique. Ces protéines étant très basiques, elles migrent peu ou pas du tout lors de l'électrophorèse à pH 8,6 et restent donc confondues, ne donnant qu'un seul arc de précipitation.

3 - Analyse par double immunodiffusion radiale.

Les fractions 0, 1, 2 et 3 ont été mises à diffuser contre un antisérum spécifique de l'angiogénine bovine selon la technique d'OUCHTERLONY (1949). Ces immunodiffusions montrent que les quatre fractions contiennent une protéine qui est identique du point de vue immunologique puisque la fusion totale des arcs de précipitation peut être observée (Fig.11D p.48).

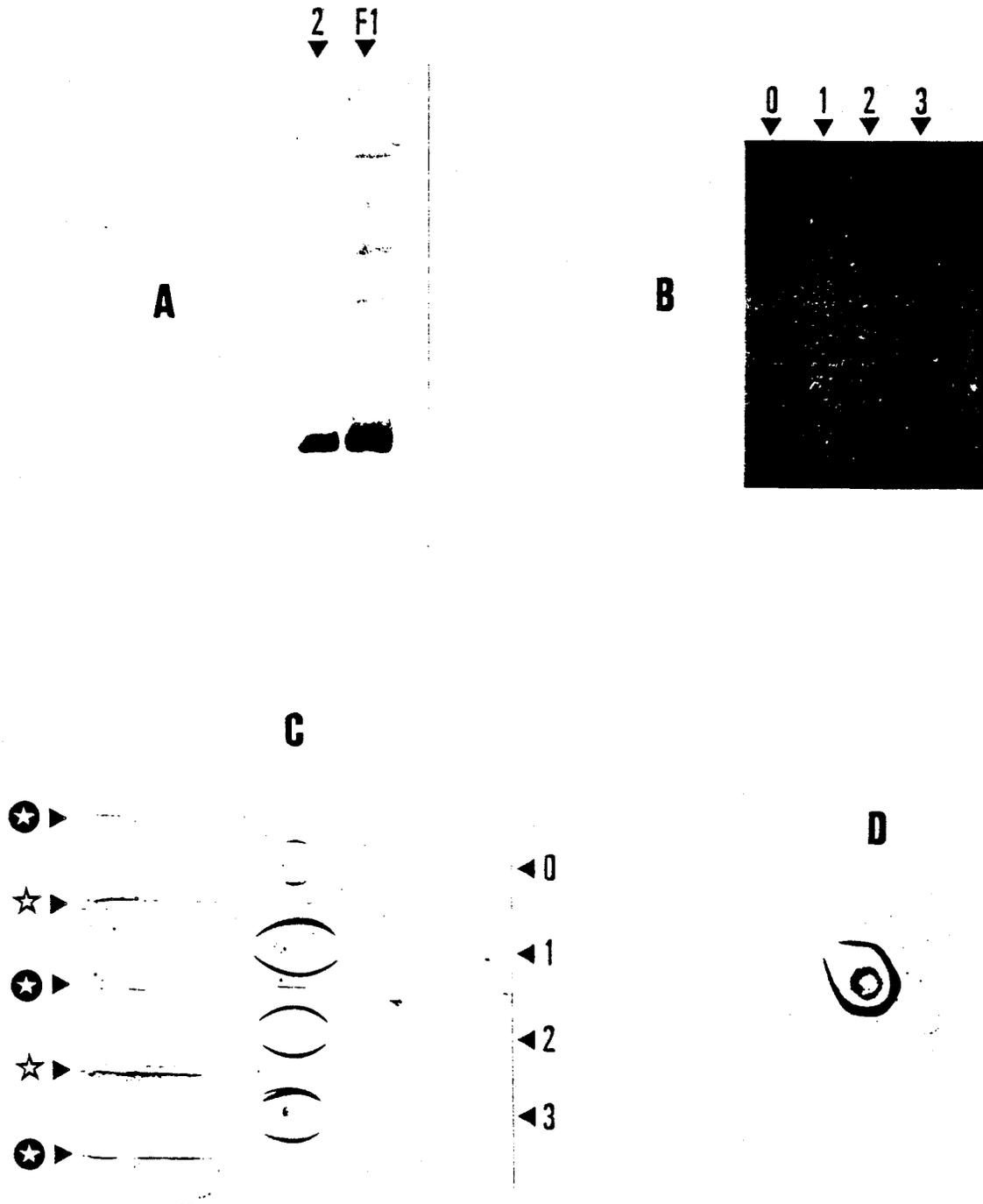


Figure 11 : A - Electrotransfert sur feuille de nitrocellulose.
Immunorévélation par un immunsérum dirigé contre la fraction F1.

B - Electrotransfert sur feuille de nitrocellulose.
Immunorévélation par un immunsérum spécifique de l'angiogénine bovine.

C - Analyse en immunoélectrophorèse.

★ Antisérum spécifique de l'angiogénine bovine

☆ Antisérum spécifique de la fraction F1

D - Analyse par double immuno diffusion radiale.

4 - Analyse par immunodiffusion radiale.

Ce dosage est réalisé selon la technique de MANCINI *et al.* (1965), par immunodiffusion radiale. Ainsi, à partir d'une gamme de concentrations connues en angiogénine pure, nous avons pu doser le taux d'angiogénine bovine présent dans chaque fraction. Ainsi, nous avons pu déterminer que les fractions 0, 1 et 3 renferment respectivement 0,31 mg, 0,57 mg et 0,24 mg de protéines reconnues par l'antisérum et par mg de protéines présentes dans chaque fraction.

5 - Analyse des acides aminés de la partie N-terminale.

Cette analyse a révélé que chacune des fractions renfermait un peptide dont l'enchaînement des acides aminés de la partie N-terminale s'alignait sur la structure primaire de l'angiogénine humaine et qui correspond donc à l'angiogénine bovine. Notons toutefois que les peptides et protéines présentant un résidu d'acide pyroglutamique en position N-terminale ne sont pas séquencés par cette technique et qu'il est possible que certains composants des différentes fractions n'aient pas été analysés de ce fait.

C - CONCLUSION.

Toutes les fractions obtenues par la chromatographie de la fraction F1 sur colonne de Mono S semblent contenir de l'angiogénine bovine. Il est possible que cette molécule s'agrège pour donner des dimères (bande de 29 kDa), cependant, il semble que des variations de l'angiogénine bovine existent puisque tous les pics renferment des protéines de 15 kDa qui sont reconnues par l'antisérum spécifique de l'angiogénine bovine, or, ces différentes protéines sont éluées à des forces ioniques différentes.

III - PURIFICATION DE L'ANGIOGENINE BOVINE A PARTIR D'UNE PREPARATION INDUSTRIELLE DE LACTOTRANSFERRINE.

L'analyse en gel de polyacrylamide en présence de SDS de différentes préparations commerciales de lactotransferrine bovine a révélé la présence de contaminants protéiques d'environ 20 et 15 kDa dans l'une d'elles (Fig.12A p.51).

Dans le but d'identifier les différents contaminants protéiques de l'échantillon considéré, nous avons initialement envisagé de séparer ceux-ci en une seule étape de chromatographie sur système FPLC (colonne Mono S HR 5/5). Cependant, malgré la bonne résolution de cette technique (cf. Fig.12B p.51), il n'était pas envisageable de préparer des quantités suffisantes de matériel permettant la caractérisation des contaminants par cette méthode. De ce fait, nous avons préféré réaliser une étape préalable de fractionnement par tamisage moléculaire sur colonne de Séphadex G 75 superfine.

A - CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE DE SEPHADEX G 75 SUPERFINE.

1 - Matériels et méthode.

500 mg de lactotransferrine commerciale en solution dans une solution de bicarbonate d'ammonium 0,1 M sont injectés sur une colonne (3 x 95 cm) de Séphadex G75 superfine. L'élution est réalisée avec une solution de bicarbonate d'ammonium 0,1 M, le débit de la colonne étant de 20 ml par heure. Après chromatographie, le dessalage des fractions est réalisé par dialyse et celles-ci sont lyophilisées.

2 - Résultats.

Le profil chromatographique obtenu montre la présence de quatre fractions, la première correspondant à l'épaulement du pic majeur (Fig. 13A.p.52).

Ces fractions ont été analysées en gel de polyacrylamide en présence de SDS (Fig.13B p.52).

Ainsi nous pouvons constater que la fraction I correspond à des polymères de lactotransferrine bovine (essentiellement dimères et trimères) ; la fraction II présente une bande homogène à 80 kDa

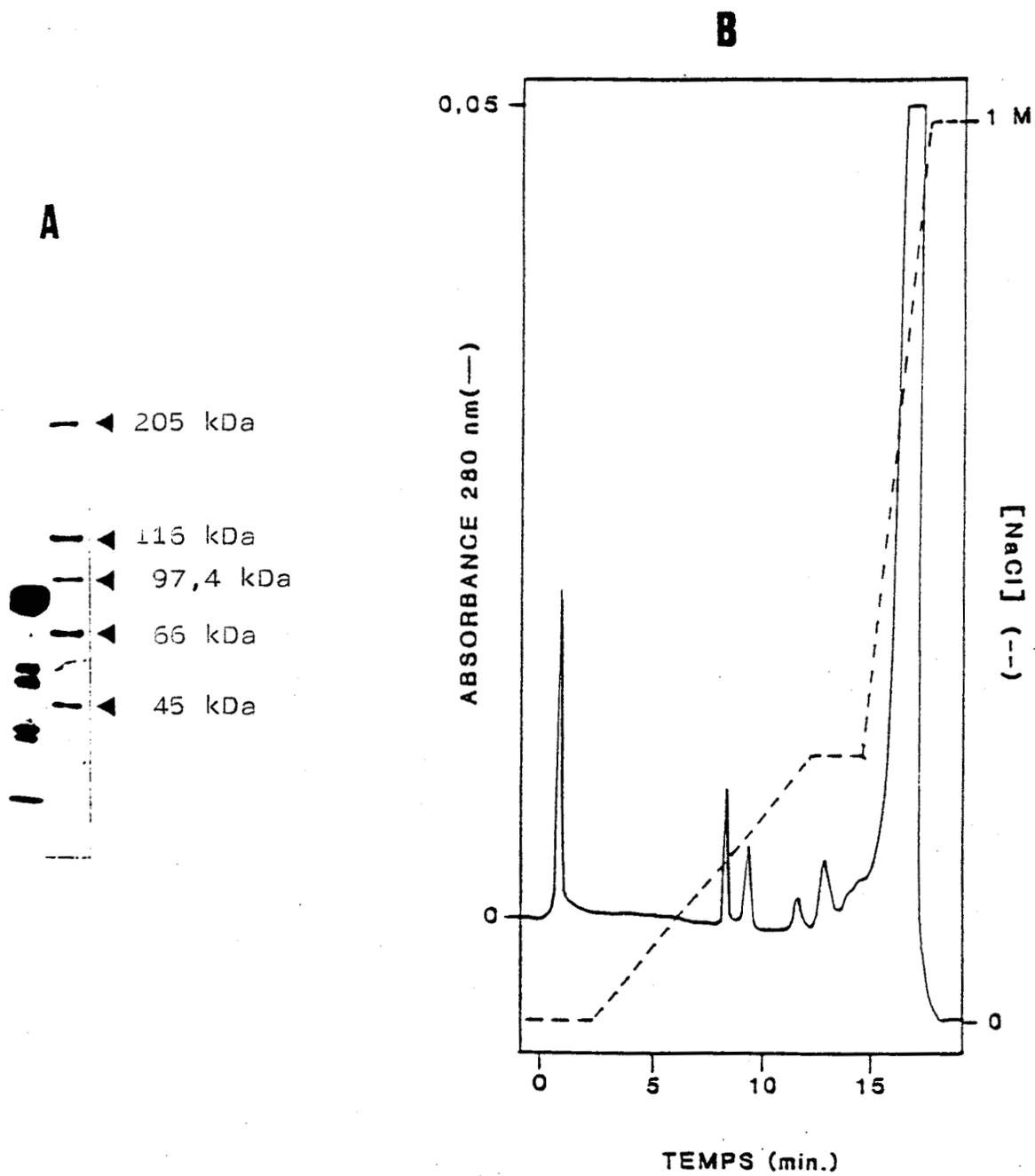
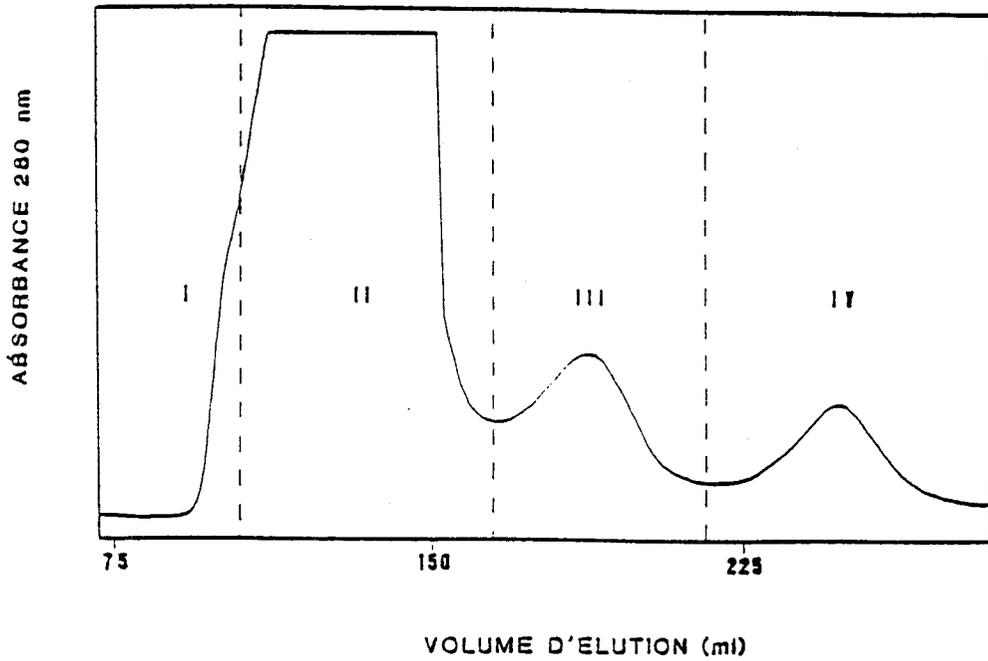
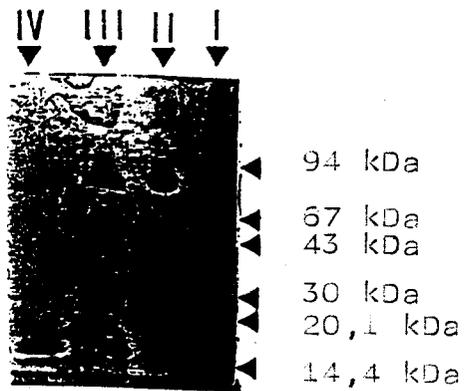


Figure 12 : A - Analyse en gel de polyacrylamide en présence de SDS d'une lactotransferrine commerciale.

B - Chromatographie cette lactotransferrine sur colonne Mono-S (FPLC).



A



B

Figure 13 : A - Chromatographie de lactotransferrine commerciale sur colonne de Séphadex G75.

B - Analyse en gel de polyacrylamide en présence de SDS.

correspondant à la lactotransferrine bovine. Les protéines séparées en fin de chromatographie ont, quant à elles, des masses moléculaires respectives de 21 kDa pour la fraction III et 15 kDa pour la fraction IV.

3 - Interprétation.

Cette technique de tamisage moléculaire a permis d'obtenir quatre fractions distinctes. Les deux premières correspondent à la lactotransferrine bovine et à ses polymères, alors que dans les deux suivantes (fractions III et IV), nous trouvons des protéines de 21 kDa et 15 kDa. Les fractions III et IV représentent respectivement 3,2 % et 2,8 % de la lactotransferrine bovine commerciale.

Ces deux dernières fractions sont bien séparées et peuvent servir de base pour un sous-fractionnement sur colonne d'échange de cations sur colonne Mono S comme nous l'avons fait précédemment pour purifier l'angiogénine à partir du lait de Vache.

B - SOUS-FRACTIONNEMENT DES FRACTIONS III ET IV SUR COLONNE DE MONO S.

1 - Matériels et Méthode.

Les fractions III et IV sont dissoutes dans un tampon phosphate 50 mM pH 7 et filtrées sur filtre millipore de porosité 0,22 μm .

Après injection d'une des fraction (III ou IV) sur colonne "Mono-s" préalablement équilibrée en tampon phosphate 50 mM pH 7 (tampon A) à un débit de 1 ml/min, l'élution est réalisée par augmentation du pourcentage d'un tampon phosphate 50 mM, NaCl 1 M, pH 7 (tampon B). Le profil du gradient a été optimisé pour chacune des deux fractions et figure sur les chromatogrammes des pages 54 et 56.

2 - Résultats.

a - Analyse de la fraction III.

La chromatographie sur colonne Mono S permet de résoudre la fraction III et d'obtenir 3 pics majeurs (Fig.14A p.54). Les protéines correspondant à ces pics ont été analysées en gel de polyacrylamide en

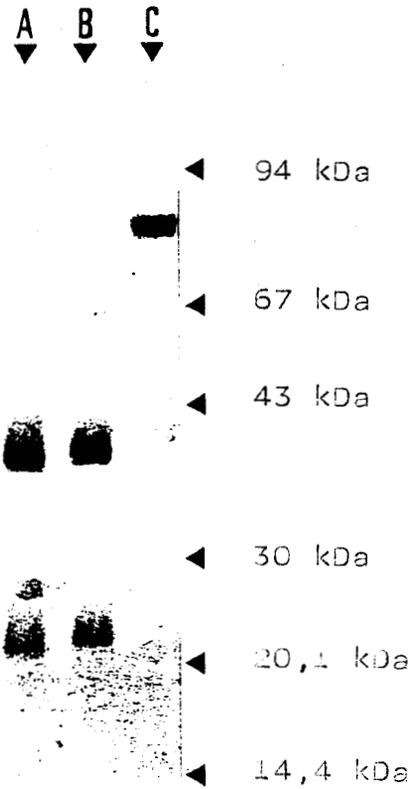
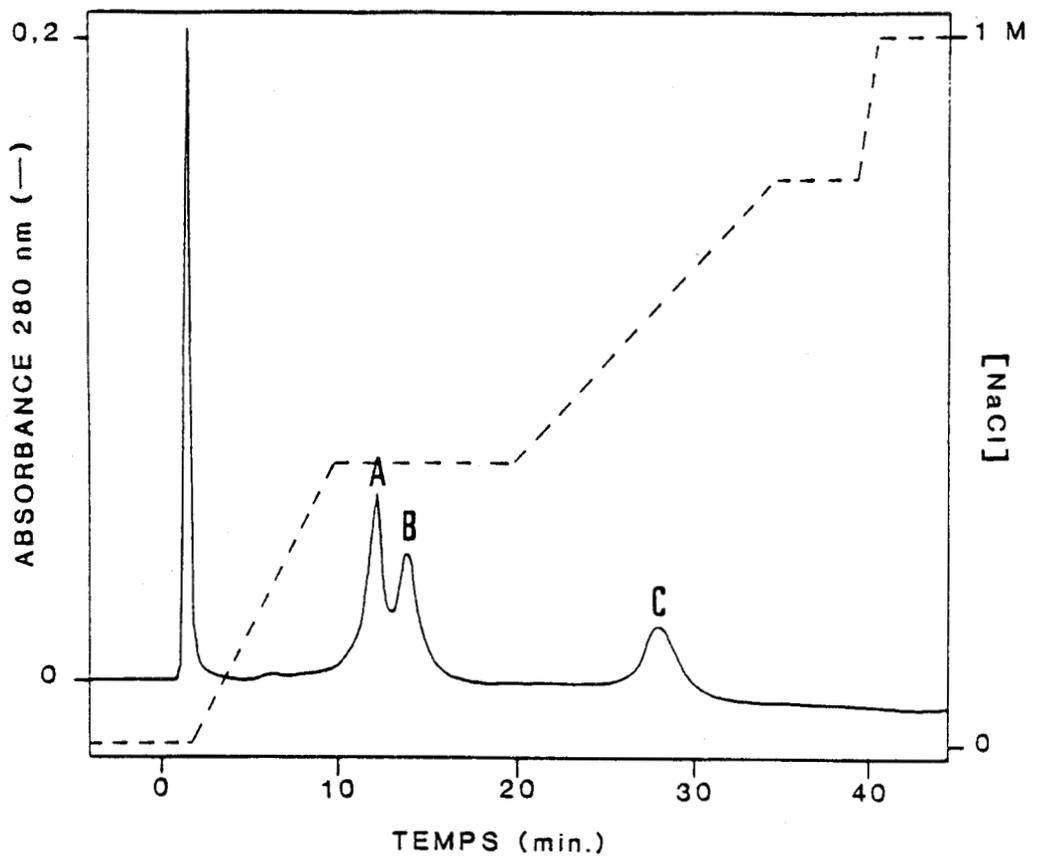


Figure 14 : A - Chromatographie de la fraction III sur colonne Mono-S (FPLC).

B - Analyse en gel de polyacrylamide en présence de SDS.

présence de SDS (Fig.14B p.54). Ainsi, dans la piste correspondant au pic A, nous pouvons observer 2 bandes à environ 21 et 40 kDa, la piste B (pic B) présente également 2 bandes à environ 22 et 41 kDa. Le pic C correspond, quant à lui, à la lactotransferrine bovine résiduelle.

Pour chacun des pics A et B, nous pouvons émettre l'hypothèse d'une dimérisation des protéines d'environ 20 kDa pour donner les bandes aux environs de 40kDa. Notons également qu'en présence de β -mercaptoéthanol, le profil électrophorétique obtenu reste identique.

b - Analyse de la fraction IV.

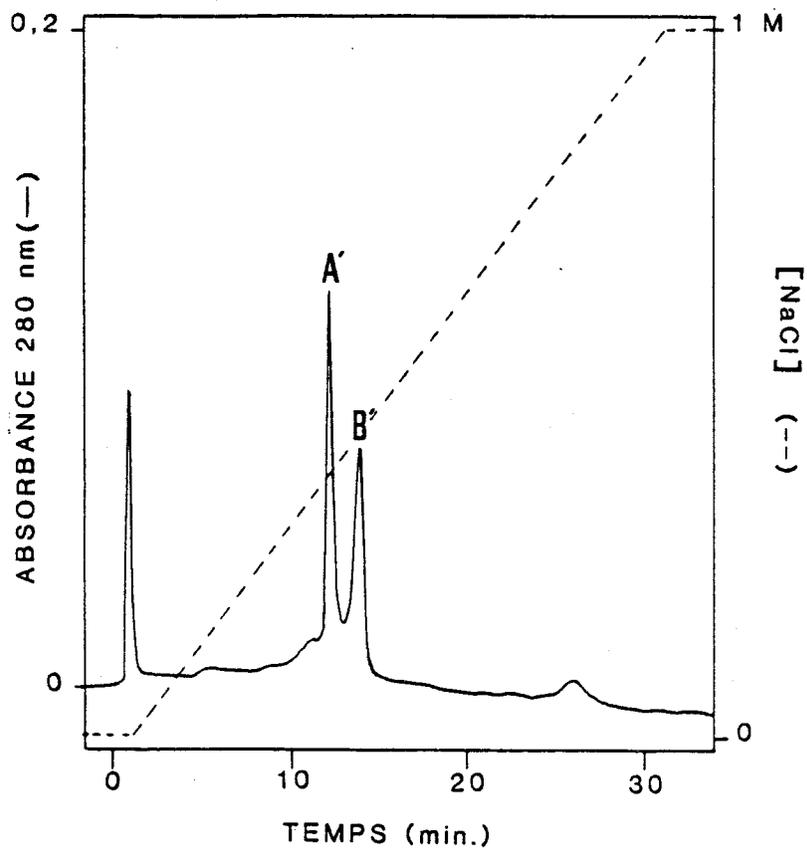
Cette fraction peut être résolue sur Mono S en 2 pics A' et B' (Fig. 15A p.56) correspondant à des protéines de masses moléculaires apparentes respectives de 16,5 et 15 kDa (Fig.15B p.56). Cette fraction IV présente un profil chromatographique sur Mono S identique à celui obtenu lors de la purification de l'angiogénine bovine. De plus, lors du transfert de cette fraction sur feuille de nitrocellulose après électrophorèse en gel de polyacrylamide dans des conditions dénaturantes, cette fraction est reconnue par un immunosérum spécifique de l'angiogénine bovine. Sur la base de ces données, nous pouvons conclure que la protéine de masse moléculaire apparente de 15 kDa est l'angiogénine bovine. La nature de la protéine de 16,5 kDa est jusqu'à présent inconnue, cependant la séquence primaire de sa partie N-terminale est en cours d'élucidation. Cette détermination est réalisée en collaboration avec le Laboratoire de Chimie des Bio-molécules de l'Institut Pasteur de Lille.

C - INTERPRETATIONS.

La chromatographie de tamisage moléculaire de lactotransferrine bovine d'origine commerciale permet de séparer quatre fractions, les fractions III et IV correspondant à des contaminations de nature protéique.

La fraction III peut être séparée en 2 protéines de 21 et 22 kDa et la fraction IV renferme l'angiogénine bovine et une protéine d'environ 16,5 kDa.

La quantité relative d'angiogénine bovine obtenue par cette méthode représente environ 1 % de la lactotransferrine bovine.



A' B'

17,2 kDa
14,6 kDa

B

Figure 15 : A - Chromatographie de la fraction IV sur colonne Mono-S (FPLC).

B - Analyse en gel de polyacrylamide en présence de SDS.

IV - CONCLUSION.

La méthode de purification de l'angiogénine du lait de Vache est très rapide et facile à mettre en oeuvre. En effet, l'étape de "batch adsorption" sur SP Séphadex permet d'éviter la décaséination préalable du lait, étape qui le plus souvent est fastidieuse et qui provoque également la co-précipitation de protéines du lactosérum. Les solutions utilisées pour l'obtention d'une fraction enrichie en angiogénine bovine sont rapidement préparées puisqu'il ne s'agit pas véritablement de tampons et que seul l'ajustement de la concentration en acétate de sodium est suffisant pour permettre une élution sélective des diverses fractions.

L'utilisation du système de chromatographie "FPLC" permet de purifier l'angiogénine d'une manière excellente, que ce soit sur colonne d'interactions hydrophobes (Phenylsuperose) ou d'échange de cations (Mono S).

Les diverses fractions obtenues par fractionnement de la fraction F1 sur Mono S semblent toutes renfermer l'angiogénine. Il n'est donc pas à exclure que certains variants génétiques de la molécule puissent exister comme c'est le cas pour les principales protéines du lait de Vache, ou que l'angiogénine ait subi quelques altérations lors de sa purification. Il a d'ailleurs été décrit très récemment qu'une angiogénine isolée à partir du plasma de Boeuf présente la perte du résidu d'histidine de sa partie C-terminale (BOND & VALLEE, 1988).

Le lait de Vache est actuellement la source naturelle d'angiogénine la plus importante puisque nous avons toujours obtenu des rendements de 0,5 à 0,6 mg d'angiogénine par litre de lait alors que les concentrations plasmatiques décrites jusqu'à présent ne sont que de l'ordre de 150 µg/l.

ETUDE DES PROPRIETES DE L'ANGIOGENINE BOVINE.

I - DETERMINATION DES PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DE L'ANGIOGENINE BOVINE.

A - MASSE MOLECULAIRE DE L'ANGIOGENINE BOVINE.

La masse moléculaire apparente de l'angiogénine bovine a été déterminée après analyse en gel de polyacrylamide à 15 % en présence de SDS et β -mercaptoéthanol selon la technique de LAEMMLI (Fig.16 p.59). L'angiogénine se présente comme une bande homogène de 15 kDa.

La masse moléculaire réelle de la protéine a, par la suite, été déduite de sa séquence, elle est de 14,577 kDa.

B - POINT ISOELECTRIQUE.

1 - Matériel et méthode.

Nous avons tenté de déterminer le pI de l'angiogénine bovine selon la technique électrophorétique d'isoélectrofocalisation. Tout d'abord, nous avons utilisé un gel Pharmacia Phast System IEF 3-9 (Pharmacia). Ensuite, nous avons également utilisé les gels LKB PAGE Plate pH 3,5-9,5.

L'électrofocalisation est réalisée en gel de polyacrylamide à 5 %, contenant 2,4 % (p/v) en AMPHOLINES (LKB) de pH 3,5 à 9,5. Le système de migration est horizontal en couche mince (LKB, 245 X 110 X 1 mm). L'anode et la cathode baignent respectivement, dans une solution d'acide phosphorique 1M et une solution de soude 1M; L'électrophorèse se fait à 4°C sous une tension de 1500 V pendant 1 H 50. Les protéines sont ensuite précipitées par l'acide trifluoroacétique, les ampholines diffusent hors du gel, la coloration se fait par le bleu de Coomassie.

2 - Résultat.

Dans l'un des systèmes comme dans l'autre, l'angiogénine se positionne au front de migration. Nous pouvons donc conclure que le pI



Figure 16 : Analyse de l'angiogénine bovine en gel de polyacrylamide à 15 % en présence de SDS et de β -mercaptoéthanol.

de l'angiogénine bovine est supérieur à 9,5. Cette caractéristique confirme l'analogie avec l'angiogénine humaine.

C - DETERMINATION DE LA COMPOSITION EN ACIDES AMINES DE L'ANGIOGENINE BOVINE.

1 - Matériel et méthode.

La détermination de la composition en acides aminés de l'angiogénine bovine a été réalisée selon la technique d'hydrolyse totale des protéines par l'acide chlorhydrique 5,6 N dans le phénol à 0,5 % pendant 72 heures sous vide. L'hydrolisat est ensuite injecté sur analyseur d'acides aminés Beckman 7300.

2 - Résultat.

Le tableau I p.61 présente une comparaison des compositions en acides aminés de l'angiogénine bovine et de l'angiogénine humaine. Nous pouvons remarquer que les compositions en acides aminés des angiogénines humaine et bovine sont très voisines, ce qui confirme également l'homologie existant entre ces deux protéines.

D - RECHERCHE D'UNE COPULE GLYCANNIQUE.

1 - Matériel et méthodes.

a - Chromatographie en phase gazeuse sur colonne OV 210.

La recherche éventuelle de sucres peut être effectuée par chromatographie en phase gazeuse après méthanolyse et trifluoroacétylation suivant la méthode décrite par ZANETTA *et al.*, en 1972. A environ 2,5 mg de protéine sont ajoutés 30 µg d'une solution de mésoinositol (témoin interne). Après lyophilisation, la méthanolyse est réalisée dans un tube hermétiquement fermé. Après la méthanolyse par 1 ml de $\text{CH}_3\text{OH}/\text{HCl}$ 0,5 N pendant 24 heures à 80° C, on évapore le $\text{CH}_3\text{OH}/\text{HCl}$ sous azote.

Tableau I : Comparaison de la composition en acides aminés des angiogénines bovine et humaine.

| Acide aminé | Angiogénine bovine (a) | Angiogénine humaine (b) |
|-------------|------------------------|-------------------------|
| Phe | 5,8 | 5 |
| Leu | 5,5 | 6 |
| Ile | 7,3 | 7 |
| Met | 2,1 | 1 |
| Val | 5,3 | 5 |
| Pro | 6,9 | 8 |
| Ser | 7,1 | 9 |
| Thr | 7,5 | 7 |
| Ala | 5,3 | 5 |
| Tyr | 5,7 | 4 |
| His | 5,0 | 6 |
| Glu(Gln) | 13,6 | 10 |
| Asp(Asn) | 18,2 | 15 |
| Lys | 7,9 | 7 |
| Cys | - | 6 |
| Trp | - | 1 |
| Arg | 13,9 | 13 |
| Gly | 8,9 | 8 |

(a) données exprimées en nombre de résidus d'acide aminé par molécule, sur la base d'une masse moléculaire de 15 kDa.

(b) composition déterminée d'après la structure primaire établie par STRYDOM *et al.* (1985).

Le résidu sec est repris par 150 μ l de dichlorométhane et 150 μ l d'anhydride trifluoroacétique, puis chauffé 5 minutes à 150° C. Le produit ainsi méthanolysé se conserve à -20° C.

Les monosaccharides trifluoroacétylés sont analysés en chromatographie en phase gazeuse. La colonne utilisée est une colonne de verre (0,3 C 300 cm) remplie de silicone OV 210 à 5 % sur Varaport 30, mesh 80-100.

La température est programmée de 100° à 220°C à raison de 2°C/mn. Le débit du gaz vecteur (N₂) est de 10 ml/mn et la pression d'entrée de 0,4 bars.

b - Chromatographie d'affinité sur colonne de concanavoline A-Sepharose 4 B (Con A).

Les protéines sont chromatographiées sur colonne de Con A (10 mg de Con A/ml de gel ; pharmacia) équilibrée dans le tampon acétate de sodium 5 mM MnCl₂ 1 mM, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 1 mM, NaCl 0,1 M pH 6,5 et selon le protocole décrit par KRUSIUS *et al.*, en 1976. Après lavage de la colonne, l'élution des glycoprotéines est réalisée par le passage du tampon précédent renfermant de l' α -D-méthyl-gluco-pyranoside 15 mM, puis 200 mM.

2 - Résultats.

Initialement, ne connaissant pas la structure primaire de l'angiogénine bovine, nous avons recherché à savoir si cette protéine était une glycoprotéine. Nous avons donc utilisé la chromatographie sur concanavoline A et la chromatographie en phase gazeuse pour rechercher la présence éventuelle de sucres. Par ces deux techniques, nous n'avons pas pu mettre en évidence une partie glucidique. L'angiogénine bovine n'est donc pas une glycoprotéine.

Ce résultat a été conforté par la suite, lorsque nous avons connu sa structure primaire, en effet, la différence minime entre les masses moléculaires apparente (déterminée d'après l'analyse en gel de polyacrylamide) et réelle (déterminée d'après la séquence) ne permet pas d'envisager l'existence d'une copule glucidique sur l'angiogénine bovine, de plus la structure primaire de l'angiogénine bovine ne

présente pas la séquence Asn-X-Ser(ou Thr), séquence caractéristique des sites de glycosylation des N-glycosyl protéines (MARSHALL, 1972).

E - CONCLUSIONS.

L'angiogénine bovine est une protéine de masse moléculaire apparente de 15 kDa dont la composition en acides aminés est très voisine de celle de l'angiogénine humaine. Son point isoélectrique très élevé (supérieur à 9,5) explique pourquoi cette protéine peut être purifiée par une succession de chromatographies d'échange d'ions. Cette protéine n'est pas glycosyllée.

II - DETERMINATION DE L'ACTIVITE ANGIOGENIQUE DE L'ANGIOGENINE BOVINE.

A - MATERIEL ET METHODE.

1 - Principe.

La mise en évidence d'une activité angiogénique sur la membrane chorio-allantoïdienne est réalisée sur l'oeuf de Poule à travers une fenêtre découpée dans la coquille. Lors d'une réponse angiogénique positive, des nouveaux capillaires se développent en direction du stimulus angiogénique déposé sur la membrane.

2 - Préparation des échantillons.

L'angiogénine est dissoute stérilement dans la méthylcellulose à 1 % sous agitation pendant 12 heures à 4°C. Ensuite, 10 µl de différentes dilutions d'angiogénine ainsi préparées, sont déposés sur du parafilm, puis séchés sous air stérile. Des pastilles "témoins" sans angiogénine sont préparées de la même façon.

3 - Protocole expérimental.

Le protocole a été décrit par AUSPRUNK et al.(1974). Les différentes étapes sont les suivantes :

- jour 0 : les oeufs de Poule fécondés sont réceptionnés et orientés;
- jour 2 : les oeufs sont placés en couveuse à 37°C;
- jour 3 : le niveau des oeufs est baissé par prélèvement de 2ml de blanc avec une seringue stérile, le trou de la coquille est ensuite bouché par de la paraffine;
- jour 4 : des fenêtres sont percées dans la coquille des oeufs, puis occultées par du ruban adhésif;
- jour 9 : les pastilles d'angiogénine sont déposées sur la membrane chorio-allantoïdienne à travers la fenêtre;

La lecture se fait après 10, 11, 12 et 13 jours d'incubation en couveuse.

Nous avons à notre disposition une couveuse dont la capacité est de 25 oeufs. Le pourcentage de pousse étant dans les meilleurs cas de 80 %, il nous restait donc une vingtaine d'oeufs à notre disposition pour chaque expérimentation. Cinq oeufs dans chaque expérimentation ont été utilisés comme témoins blancs, c'est-à-dire que nous placions sur la membrane une pastille ne renfermant aucun échantillon.

Le développement des vaisseaux sanguins a été apprécié "à l'aveugle" par deux chercheurs du Laboratoire , c'est-à-dire que la correspondance entre les numéros indiqués sur les oeufs et les doses d'angiogénine appliquées n'étaient pas connues.

B - RESULTATS.

Ne possédant pas un nombre suffisant d'oeufs pour une même expérimentation, nous avons regroupé les résultats de plusieurs expériences. En effet, pour pouvoir réaliser une étude statistique complète, nous aurions dû disposer d'une centaine d'oeufs par dose d'angiogénine et cela au cours d'un même test. Cependant, le but de cette expérimentation était simplement de vérifier que l'angiogénine bovine était capable d'induire la formation de nouveaux vaisseaux sanguins.

Pour des doses de 50 ng (3,5 p Moles) d'angiogénine bovine par oeuf la réponse a été positive 24 fois sur 25. Par contre, quand la dose

d'angiogénine bovine est dix fois moins importante (5 ng soit 350 fMoles) le nombre de réponses positives est de 7 pour 38 oeufs.

En ce qui concerne les témoins blancs aucun oeuf sur 19 n'a été jugé positif.

Pour des doses inférieures à 5 ng, nous n'avons jamais pu observer le phénomène d'angiogénèse.

C - INTERPRETATION.

L'activité angiogénique de l'angiogénine bovine a donc été vérifiée pour des doses de 5 à 50 ng. Selon FETT et al. (1985), l'angiogénine humaine est capable d'induire la prolifération de nouveaux capillaires sanguins à des doses dix fois inférieures. Cependant, du fait de l'imprécision inhérente à nos expérimentations, nous ne pouvons pas conclure que l'angiogénine bovine est moins active que son analogue humaine.

III - RECHERCHE D'UNE ACTIVITE MITOGENE DE L'ANGIOGENINE BOVINE SUR LES CELLULES CCL 39.

Les activités mitogènes ont été mesurées sur des fibroblastes de poumon de Hamster chinois établis en lignée cellulaire (cellules CCL 39). Dès la confluence des cellules, le milieu de culture est remplacé par un milieu sans sérum de Veau et différentes concentrations d'angiogénine bovine sont ajoutées au milieu. Après 24 heures d'incubation avec les fractions, la thymidine tritiée est ajoutée et son incorporation rendant compte de la croissance des cellules est mesurée en scintillation liquide.

A - MATERIEL ET METHODE.

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

Figure 17 : Observation du phénomène d'angiogénèse provoqué par l'angiogénine bovine (50 ng) sur la membrane chorioallantoïdienne d'oeuf de Poule.

fungizone. Les cultures sont incubées à 37°C dans une atmosphère à 5 % de CO₂.

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 sontensemencées dans des plaques de 24 puits (Limbro, Flow laboratories) à raison de 40 000 cellules dans 0,5 ml de milieu de culture par puit. 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 le 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 placé dans une fiole à scintillation, 3 ml de liquide scintillant (Aqualite, Baker) sont ajoutés. La radioactivité est mesurée avec un compteur de radioactivité β (Beckman).

B - RESULTATS.

Même lorsque la concentration en angiogénine bovine est très importante 0,1 mg/ml aucune incorporation supplémentaire de thymidine tritiée n'a pu être observée. L'angiogénine ne possède donc pas d'activité "facteur de croissance" sur ces cellules qui pourtant, sont habituellement très sensibles à ce genre de molécules. Nous pouvions nous attendre à ce résultat négatif; en effet, si l'angiogénine est un facteur induisant spécifiquement l'angiogénèse, il n'y a aucune raison qu'elle puisse provoquer la prolifération de cellules fibroblastiques qui ne sont pas mises en cause lors de ce phénomène.

C - CONCLUSION.

Parallèlement à la recherche d'une activité de type "facteur de croissance" de l'angiogénine bovine sur les cellules CCL 39, CECCHELI et al. (1988) ont étudié l'activité de l'angiogénine bovine sur les cellules endothéliales d'aorte et de capillaire de cerveau bovin. Les résultats obtenus par ces auteurs montrent que l'angiogénine bovine n'a aucune activité sur la croissance des cellules endothéliales d'aorte. Par contre, en présence d'angiogénine, les cellules endothéliales de capillaire bovin voient leur croissance stimulée. Cependant, cette activité requiert une concentration minimale d'angiogénine bovine de 100 ng/ml alors que le FGF présente la même activité à la concentration de 4 ng/ml. Les auteurs en ont donc conclu que l'angiogénine bovine agit sur les cellules endothéliales capillaires mais que son activité ne peut être en aucun cas comparée à celle d'un véritable facteur de croissance. De plus, aucun phénomène de synergie avec le FGF n'a pu être observé.

L'angiogénine bovine est donc incapable de stimuler la croissance des cellules fibroblastiques CCL 39 et des cellules endothéliales d'aorte bovine. Ces résultats sont logiques puisque les premières ne sont pas impliquées dans le processus de formation des capillaires et qu'il est établi que les vaisseaux sanguins de taille importante ne donnent généralement pas de bourgeon (RIFKIN et al., 1982). Il est donc a priori normal que les cellules d'aorte ne répondent pas au stimulus angiogénique.

Par contre, les cellules endothéliales de capillaire de cerveau de Boeuf voient leur prolifération stimulée par l'angiogénine bovine. Cependant, cette stimulation n'est appréciable que pour des doses importantes d'angiogénine et reste également beaucoup plus faible que la stimulation provoquée par le FGF. Aucun effet de synergie entre le FGF et l'angiogénine n'a été observé.

Il semblerait donc que l'angiogénine bovine puisse agir indirectement sur les cellules endothéliales de capillaire, entraînant une série d'événements qui permettrait la libération d'un autre facteur. Néanmoins, l'hypothèse d'un mode d'action direct, par fixation spécifique de l'angiogénine à un récepteur de la membrane plasmique ne peut être écarté.

DETERMINATION
DE LA STRUCTURE PRIMAIRE DE
L'ANGIOGENINE BOVINE.

Le but de ce travail a été de comparer la structure primaire de l'angiogénine bovine à la séquence de l'angiogénine humaine décrite par STRYDOM et al. en 1985. Il fallait également vérifier si l'angiogénine bovine présentait une homologie avec la ribonucléase A et si les acides aminés du site catalytique de celle-ci étaient conservés ou remplacés.

De plus, l'élucidation du mécanisme par lequel l'angiogénine induit la prolifération de nouveaux capillaires sanguins passera dans l'avenir, par la connaissance exacte de sa structure.

Ce travail a été réalisé en collaboration avec le Laboratoire de Chimie des biomolécules de l'Institut Pasteur de LILLE sous la direction du Professeur TARTAR et a fait l'objet d'un mémoire que nous faisons figurer dans les pages suivantes. Les remarques et commentaires importants le concernant seront discutés par la suite.

The complete amino acid sequence of bovine milk angiogenin

P. Maes, D. Damart*, C. Rommens, J. Montreuil*, G. Spik* and A. Tartar

*Service de Chimie des Biomolécules, Unité Associée au CNRS D-1000, Institut Pasteur de Lille, 1 rue Calmette 59109 Lille, France and *Laboratoire de Chimie Biologique, Unité Associée au CNRS 217, Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France*

Received 7 October 1988

The amino acid sequence of angiogenin isolated from bovine milk was deduced by gas-phase sequencing of the protein and its fragments. The protein contains 125 residues and has a calculated molecular mass of 14 577 Da. The sequence is highly homologous (65% identity) to the sequence of human angiogenin, most of the differences being the result of conservative replacements. Like human angiogenin, the bovine protein is also homologous to bovine pancreatic RNase A (34% identity) and the three major active site residues known to be involved in the catalytic process, His-14, Lys-41 and His-115, are conserved. When tested against conventional substrates for RNase A activity, bovine angiogenin displays the same selective ribonucleolytic activity as human angiogenin. The sequence of bovine angiogenin contains the cell recognition tripeptide Arg-Gly-Asp which is not present in the human protein.

Protein sequence; Ribonuclease; Angiogenesis; Angiogenin; (Bovine milk)

1. INTRODUCTION

Human angiogenin, isolated from HT-29 tumor conditioned media [1] and from human plasma [2] by the group of Vallee is able to induce blood vessel growth in the chick chorioallantoic membrane and the rabbit cornea.

The primary structure of this small single-chain protein ($M_r = 14400$) has significant homology (35% identity) with human pancreatic RNase A [3]. This homology was shown to be biologically functional as human angiogenin displays specific ribonucleolytic activities, catalyzing the cleavage of 28 and 18 S rRNA [4]. Both angiogenic and RNase activities are selectively inhibited by placenta ribonuclease inhibitor [5].

Correspondence address: A. Tartar, Institut Pasteur de Lille, 1, rue Calmette, 59109 Lille Cedex, France

Abbreviations: RNase, ribonuclease; HPLC, high-pressure liquid chromatography; CNBr, cyanogen bromide; A, C, G and U, adenylic, cytidylic, guanylic and uridylic acids, respectively

Bovine angiogenin was recently isolated from bovine serum [6] and, in 10-fold larger quantities, from bovine milk [7]. We report in this paper the complete amino acid sequence of the bovine protein and its comparison with human angiogenin and bovine RNase A.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Materials

Angiogenin was purified from bovine milk as described [7].

2.2. Sequence determination

For reduction and alkylation, 1 nmol angiogenin purified from bovine milk [7] was dissolved in 1-propanol and 0.5 M sodium bicarbonate (1:1, v/v) reduced with 10 μ l of a 5% solution of tributylphosphine under N_2 for 1 h at room temperature and then alkylated with 9 μ g of iodoacetamide. After 2 h, the product was desalted by reversed-phase chromatography using an octadecylsilane column eluted by two-step gradient.

The S-aminocarboxymethylated protein was dissolved in 0.1 M ammonium acetate, pH 4, and digested with *S. aureus* V8 protease at 37°C for 24 h at an enzyme/substrate ratio of 1:50 (w/w).

Cleavage at Asn-Gly bonds was performed by treatment with 2 M hydroxylamine hydrochloride in 0.2 M potassium car-

bonate containing 6 mg guanidine hydrochloride per μg of sample for 18 h at 23°C. In both cases, the resulting peptides were separated by reversed-phase HPLC (Nucleosil RP C18 column, 0.1% trifluoroacetic acid/acetonitrile, 0–60% gradient over 120 min).

A sample was also submitted to CNBr cleavage for 10 h on glass fiber and the resulting fragments were sequenced without separation. Peptides were sequenced on an Applied Biosystems 470 A gas phase sequencer. PTH amino acid derivatives were identified by HPLC using an Applied Biosystems 120 A on-line PTH analyzer.

2.3. Ribonucleolytic activity

Determination of the ribonucleolytic activity of bovine milk angiogenin was carried out according to the procedures described in [4] the following substrates were used: polyribonucleotides [poly(A); poly(U); poly(G); poly(C)]; cytidine cyclic 2',3'-phosphate (C>p); 2',5'-dinucleotides (ApN, CpN, GpN, UpN, where N is A, C, G or V) from Sigma, wheat germ RNA from Calbiochem and 18 and 28 S RNA isolated from calf liver from Pharmacia.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Sequence determination

The complete amino acid sequence of bovine angiogenin is shown in fig.1, together with the peptides used for the sequence determination. The primary structure is made devoid of any glycosylation signal sequence (Asn-X-Ser/Thr) and no evidence for posttranslational modification was observed from the sequencing data. At the difference with human angiogenin whose N-terminal amino acid was blocked [3], extensive N-terminal sequencing of the intact protein allowed the determination of 47 residues. This sequence perfectly fits the amino acid sequence recently reported [6] for angiogenin isolated from bovine serum.

The complete sequence was deduced primarily based on the complete set of 8 peptides generated by *S. aureus* V8 protease digestion of the S-carboxymethylated protein, which were isolated by reversed-phase HPLC. Except for residues 96–99 which were determined by sequencing fragment HA-2, because peptide V8-4 could not be sequenced further than Tyr 95, all the residues shown in fig.1 were identified at least twice in the sequence analysis. The V-8 peptides were aligned by sequencing overlapping peptides generated by hydroxylamine cleavage of Asn-Gly bonds and CNBr cleavage.

3.2. Characteristics of the sequence

Bovine angiogenin contains 125 residues cor-

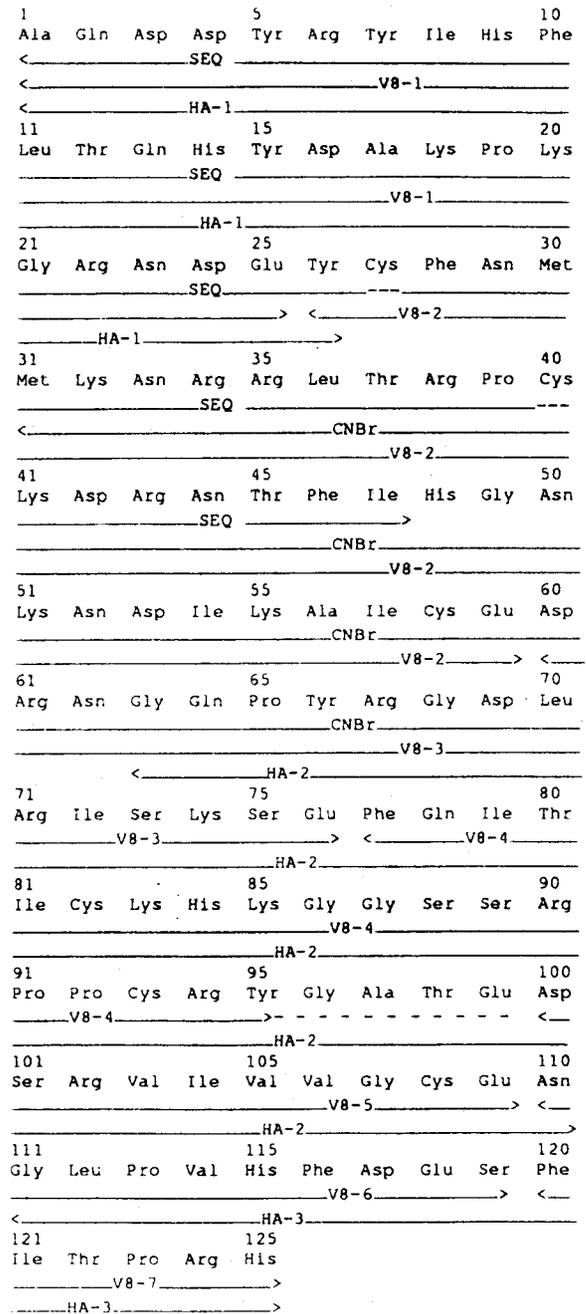


Fig.1. Amino acid sequence of bovine angiogenin and peptides used for sequence determination. SEQ, degradation of the intact protein; V8, peptides from digestion with *S. aureus* V8 protease; CNBr, cyanogen bromide peptides; HA, peptides generated by cleavage with hydroxylamine. Dashed lines denote tracts of sequences inferred from comparison with sequences of different peptides.

responding to a calculated molecular mass of 14577 Da [3]. Comparison of the sequence of human and bovine angiogenin shows (fig.2) a high degree of homology, consistent with usual interspecies variations: 79 of the 123 residues (64% identity) of human angiogenin are conserved, while, in the other positions, most differences are the result from conservative replacements. No gap had to be used for optimal alignment. Contrary to human angiogenin, in which the amino-terminal residue is pyroglutamic acid, in bovine angiogenin an additional alanine residue is found in this position, thus avoiding cyclisation of the glutamine side chain, following the removal of the leader sequence by the signal peptidase. In the C-terminal position, an additional histidine residue is responsible, with the N-terminal alanine residue, for the difference in size between the two proteins. In both angiogenins, the six cysteine residues involved in disulfide bridges are found in the same positions reflecting the highly conserved tertiary structure of these molecules.

As shown previously, one of the most surprising features of the human angiogenin sequence was its homology with the sequence of human pancreatic RNase A [4]. Here we demonstrate (fig.2) that the sequence of bovine angiogenin shares a similar

homology (34% identity) with the sequence of bovine RNase A [8]. Human and bovine pancreatic RNases differ, however, from human and bovine angiogenin by the presence of one disulfide bridge (Cys-65–Cys-72 RNase numbering) in addition to the six cysteine residues located at the same positions as in the angiogenin molecule. However, as this bond could be selectively reduced in RNase A without any effect on ribonucleolytic activity [9], it may be concluded that its presence is not critical for the enzymatic activity.

As shown in table 1, among the different residues known to be present in the active region of RNase, most are also found in both angiogenin sequences with the notable exception of Gln-69 which is deleted in the two proteins. Another interesting difference is Phe at position 116 of bovine angiogenin, since the Phe → Leu substitution in position 120 of RNase was shown to induce a 7-fold decrease in its enzymatic activity [10].

Three amino acid residues are known to be directly involved in the catalytic process of pancreatic RNase A: His-12, His-119 and Lys-41. Interestingly, most of the amino acids surrounding these residues are conserved in the two angiogenins while they differ largely from those found in the corresponding RNase: 11 identical residues among

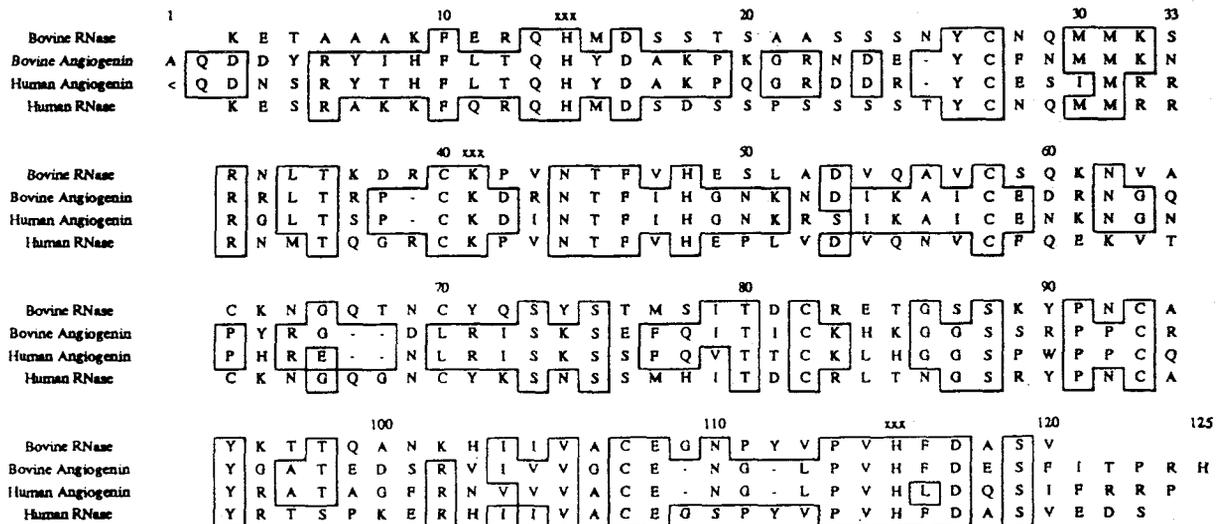


Fig.2. Comparison of amino acid sequences of bovine pancreatic ribonuclease [8], bovine angiogenin, human angiogenin [3], and human pancreatic ribonuclease (Chamoux, M. et al., unpublished). The alignment is numbered according to the bovine angiogenin sequence. Gaps were introduced in four places to retain the highest homologies. Identities between bovine angiogenin and either of the other proteins are boxed. xxx, residues known to be involved in catalysis by bovine RNase.

Table 1

Residues in the active site of RNase and corresponding amino acids in human and bovine angiogenin: RNase residues and proposed roles were compiled by Shapiro et al. [4] from several X-ray and neutron diffraction studies of bovine RNase A and RNase S with inhibitors

| RNase residue | Proposed role(s) | Human angiogenin residue | Bovine angiogenin residue |
|---------------|--|--------------------------|---------------------------|
| His-12 | removes 2'OH proton; H bonds to phosphate | His-13 | His-13 |
| His-119 | protonates 5'O | His-114 | His-115 |
| Lys-41 | stabilizes intermediate; H bonds to 2'OH | Lys-40 | Lys-41 |
| Gln-11 | H bonds from side chain NH to phosphate | Gln-12 | Gln-13 |
| Val-43 | | Ile-42 | Arg-43 |
| Asn-44 | | Asn-43 | Asn-44 |
| Thr-45 | H bonds from NH and OH to pyrimidine O2 and N3 | Thr-44 | Thr-45 |
| Gln-69 | H bonds from side chain C=O to purine N or O6 | deleted | deleted |
| Asn-71 | H bonds from side chain C=O to purine N or O6 | Asn-68 | Asp-69 |
| Glu-111 | H bonds from COO ⁻ to purine N1 | Glu-108 | Glu-109 |
| Phe-120 | H bonds from amide NH to phosphate | Leu-115 | Phe-116 |
| Asp-121 | H bonds from COO ⁻ to His-119 Im | Asp-116 | Asp-117 |
| Ser-123 | H bonds from OH to uracil O4 | Ser-118 | Ser-119 |

an 11 amino acid stretch (9–19) surrounding His-14 (bovine numbering), 14 identical residues among a 16 amino acid stretch (35–51) surrounding Lys-41, and 10 identical residues among a 12 amino acid stretch (106–119) surrounding His-115.

As these strong local homologies probably reflect similar unusual ribonucleolytic activities as those found with human angiogenin [4], we have determined the catalytic properties of bovine angiogenin. When the protein isolated from bovine milk was tested against polyribonucleotides, dinucleotides and wheat-germ RNA no ribonucleolytic activity could be detected. However, when the hydrolysates of 18 and 28 S RNA isolated from calf liver were analysed by agarose gel electrophoresis under denaturing conditions degradation products were detected indicating an endonucleolytic activity of angiogenin. These results are in full agreement with those reported by Bond et al. [6] for the protein isolated from bovine serum and confirm that bovine angiogenin has the same enzymatic activities as human angiogenin.

A major difference between bovine angiogenin and the three other related proteins is the presence in position 67 of an Arg-Gly-Asp sequence. This tripeptidic sequence represents a recognition site in fibronectin and other adhesive proteins from Arg-Gly-Asp directed adhesion receptor localized in en-

dothelial cells [11]. Our preliminary results, which show that bovine angiogenin induces the proliferation of bovine brain capillary endothelial cells at concentrations ranging from 10 to 100 ng, suggest that this tripeptide could be involved in the interaction of bovine angiogenin with the endothelial cells (Chamoux, M. et al., unpublished).

Acknowledgements: This work was supported by grants from the Centre National de la Recherche Scientifique (Unité de Recherche Associée D-1000, Director: Professor A. Tartar; Unité Associée 217, Director: Professor J. Montreuil), by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale; by the Institut Pasteur de Lille and by the Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois.

REFERENCES

- [1] Fett, J.W., Strydom, D.J., Lobb, R.R., Alderman, E.M. and Vallee, B.L. (1985) *Biochemistry* 24, 5480–5486.
- [2] Shapiro, R., Strydom, D.J., Olson, K.A. and Vallee, B.L. (1987) *Biochemistry* 26, 5141–5146.
- [3] Strydom, D.J., Fett, J.W., Lobb, R.R., Alderman, E.M., Bethune, J.L., Riordan, J.F. and Vallee, B.L. (1985) *Biochemistry* 24, 5486–5494.
- [4] Shapiro, R., Riordan, J.F. and Vallee, B.L. (1986) *Biochemistry* 25, 3527–3532.
- [5] Shapiro, R. and Vallee, B.L. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 2238–2241.
- [6] Bond, M.D. and Vallee, B.L. (1988) *Biochemistry* 27, 6282–6287.

- [7] Spick, G., Damart, D., Chamoux, M., Maes, P., Tartar, A. and Montreuil, J. (1988) *Biochem. J.*, submitted.
- [8] Smyth, D.G., Stein, W.H. and Moore, S. (1963) *J. Biol. Chem.* 237, 1845-1850.
- [9] Sperling, R., Burstein, Y. and Steinberg, I.Z. (1969) *Biochemistry* 8, 3810-3820.
- [10] Lin, M.C., Gutte, B., Caldi, D.G., Moore, S. and Merrifield, R.B. (1972) *J. Biol. Chem.* 247, 4768-4774.
- [11] Ruoslahti, E. and Pierschbacher, M.F. (1986) *Cell* 44, 517-539.
- [12] Beintema, J.J., Weitzes, P., Weickmann, J.L. and Glitz, D.G. (1984) *Anal. Biochem.* 136, 48-64.

DISCUSSION.

L'angiogénine bovine est donc une protéine de masse moléculaire calculée 14 577 Da qui présente des homologues de structure de 65 % avec l'angiogénine humaine et de 34 % avec la ribonucléase A.

Les acides aminés impliqués dans le site catalytique de la ribonucléase A sont conservés. A ce point, il faut noter qu'à la position 116 de l'angiogénine bovine se trouve un résidu de phénylalanine alors qu'à la position correspondante, le résidu d'acide aminé de l'angiogénine humaine est la leucine. Or, il a été décrit par LIN et al. (1972) que la substitution Phe -> Leu en position 120 de la ribonucléase A (position correspondant à Phe-116 sur l'angiogénine bovine et à Leu-115 sur l'angiogénine humaine) se traduit par une diminution de son activité. Il faudra donc vérifier que cette différence avec l'angiogénine humaine n'est pas de nature à modifier les propriétés ribonucléasiques de l'angiogénine bovine.

Un autre point intéressant est la présence en position 67 de la séquence Arg-Gly-Asp. Cette séquence tripeptidique, qui n'existe pas sur l'angiogénine humaine, est responsable de la fixation de protéines comme la fibronectine, à des récepteurs de la surface des cellules endothéliales (RUOSLAHTLI et PIERSCHBACKER, 1986). De plus, lorsque les acides aminés de l'angiogénine bovine sont replacés dans la structure tridimensionnelle de l'angiogénine humaine établie par PALMER et al. (1986) (Fig.18 p.76), nous pouvons constater que le tripeptide Arg-Gly-Asp est situé en position externe sur la molécule et donc qu'il serait très facilement accessible. Ainsi, il se pourrait que ce tripeptide soit impliqué dans la reconnaissance de l'angiogénine bovine par les cellules endothéliales de capillaires sanguins et donc dans leur prolifération et leur organisation en réseau vasculaire.

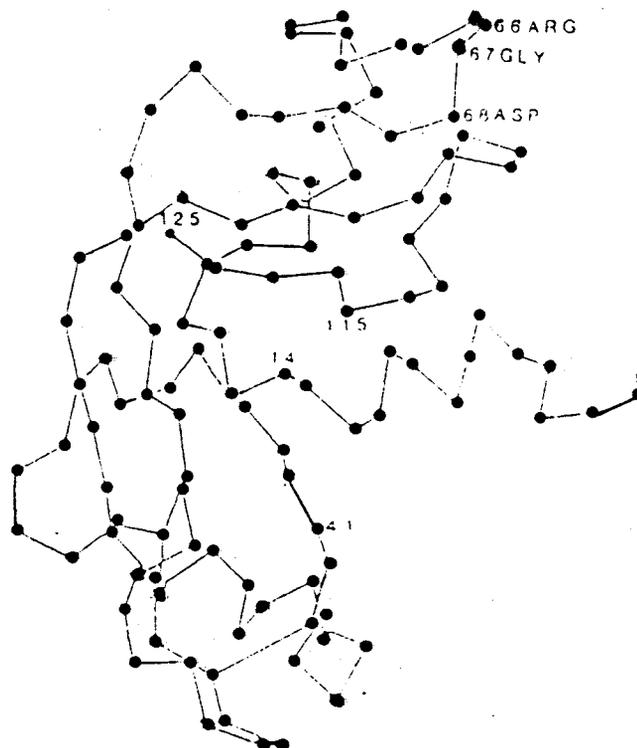


Figure 18 : Structure tridimensionnelle probable de l'angiogénine bovine.

ACTIVITE RIBONUCLEASIQUE DE L'ANGIOGENINE BOVINE .

Comme nous l'avons décrit précédemment l'angiogénine bovine présente, certes, de nombreuses homologues de séquence avec son analogue d'origine humaine, cependant le résidu d'acide aminé en position 115 qui d'après LIN et al. (1972) joue un rôle essentiel dans l'activité catalytique de la ribonucléase A, diffère d'une espèce à l'autre. En effet, on retrouve à cette position la phénylalanine sur la séquence de l'angiogénine bovine tandis que l'acide aminé en position 116 correspondant, de l'angiogénine humaine, est la leucine, c'est-à-dire qu'à cette position l'angiogénine bovine et la ribonucléase A renferme le même résidu d'acide aminé. Nous nous demandions donc si la substitution Phe-->Leu pouvait être de nature à modifier la spécificité de l'angiogénine bovine et à engendrer une activité de type ribonucléase A. Il était donc indispensable de rechercher une activité ribonucléasique éventuelle de l'angiogénine bovine vis-à-vis de substrats conventionnels ou non de la ribonucléase A.

Les ribonucléases sont des enzymes communs à de nombreux milieux et très résistants, notamment à la dénaturation thermique. De ce fait, il est impératif que les tampons et le matériel utilisés lors de recherches d'activités ribonucléasiques soient totalement dépourvus de ribonucléases.

Toute la vaisselle est donc mise à 200°C pendant 6 heures et les tampons sont autoclavés à 121°C sous une pression de 1 bar pendant 2 heures. L'utilisation de gants est également de rigueur, en effet, des ribonucléases sont présentes à la surface de la peau.

I - ACTIVITE DE L'ANGIOGENINE BOVINE VIS-A-VIS DES HOMOPOLYRIBONUCLEOTIDES.

Il s'agit de vérifier si l'angiogénine bovine est capable de dégrader l'acide polyadénylique (poly A), l'acide polycytidylique (poly C), l'acide polyuridylique (poly U) et l'acide polyguanidylique (poly G).

A - MATERIEL ET METHODE.

Le dosage des protéines a été réalisé selon la méthode de LOWRY et al. (1951) nous avons utilisé une modification de la méthode de ZIMMERMAN & SANDEEN (1965) pour la détermination de l'activité ribonucléasique.

1 - Dosage des protéines.

a) Réactifs.

- 1) : 2 % Na₂ Co₃ anhydre dans la soude 0,1 M
- 2) : 1 % CuSo₄
- 3) : 2 % Tartrate double de sodium et de potassium
- 4) : Réactif de Folin - Ciocalteus dilué au 1/2
- 5) : 0,5 ml (3) + 0,5 ml (2) + 50 ml (1)

b) Gamme étalon.

On utilise la sérum albumine bovine (BSA) comme témoin puisque cette protéine n'est pas glycosyllée. A partir d'une solution à 1 mg/ml de BSA on prépare donc une gamme de 0 à 100 µg.

c) Dosage.

Dans un tube à hémolyse on ajoute 100 µl de solution à doser (1 à 50 µg de protéine) et 500 µl de solution (5). Après agitation et repos de 10 minutes, 50 µl de solution (4) sont ajoutés. La lecture s'effectue à 750 nm (spectrophotomètre Shimadzu MPS 2000) après une période de développement de la coloration de 30 minutes à température ambiante et à l'obscurité.

2 - Mesure de l'activité ribonucléasique sur les homopolyribonucléotides.

La méthode utilisée est celle mise au point par ZIMMERMAN et SANDEEN (1965) modifiée par SHAPIRO et al. (1986).

Les homopolyribonucléotides (100 µg) sont incubés dans un tampon Tris 40 mM pH 8 en présence de 5 µg de BSA et d'angiogénine bovine ou de

ribonucléase A à la concentration de 20 nM. Le volume totale de chaque incubat est de 250 μ l.

Après l'incubation de 2H30 à 37°C, 250 μ l d'acide perchlorique 1,2 N glacial contenant 20 mM de nitrate de lanthane sont ajoutés. Les incubats sont placés dans la glace pendant 15 minutes puis centrifugés à 13500 g durant également 15 minutes, à 4°C. 250 μ l de surnageant sont alors prélevés et dilués trois fois par addition de 500 μ l d'eau.

Les absorbances sont mesurées, contre l'eau dans des cuves de 2 mm d'épaisseur, à 260nm pour l'acide polyadénylique, (poly A), l'acide polyguanylique (poly G) et l'acide polyuridylique (poly U) et à 280nm pour l'acide polycytidylique.

Le spectrophotomètre utilisé est le modèle MPS 2000 de Shimadzu à double faisceau.

B - RESULTATS.

Les résultats sont donnés dans le tableau II p.80. Nous avons réalisé le dosage en triple pour chaque substrat.

Comme nous pouvons le constater l'angiogénine bovine n'a aucune activité sur les polyhomoribonucléotides alors que la ribonucléase A utilisée à la même concentration est capable de dégrader le poly U et le poly C.

II - ACTIVITE DE L'ANGIOGENINE BOVINE SUR LES DINUCLEOTIDES PHOSPHATES.

A - MATERIEL ET METHODE.

Nous avons utilisé la méthode employée par SHAPIRO et al. (1986). Les nucléotides (0,1 mM) sont incubés en présence d'angiogénine bovine ou de ribonucléase A (27 nM) dans un tampon Mes 0,1M pH 6, NaCl 0,1 M pendant 2 heures à température ambiante, le volume final de l'incubation étant de 250 μ l.

Pour chaque nucléotide, nous avons réalisé trois types d'incubation: le substrat sans enzyme, le substrat en présence de ribonucléase A et le substrat en présence d'angiogénine bovine. Un aliquote de chaque incubat est ensuite injecté sur une cartouche d'octadécylsilane Radial-Pak 8NVC 18-4 (Waters) comprimée dans un module de compression radiale (Waters).

Tableau II : Activité ribonucléasique de la ribonucléase A et de l'angiogénine bovine sur les homopolyribonucléotides (mesure de l'absorbance).

| Polyhomori- bonucléotide | sans enzyme | avec l'angiogénine | avec la ribonucléase A |
|-----------------------------|-------------|--------------------|------------------------|
| Poly A | 0,004 | 0,003 | 0,003 |
| Poly G | 0 | 0 | 0 |
| Poly U | 0,05 | 0,07 | 0,89 |
| Poly C | 0,066 | 0,063 | 0,48 |

Les absorbances sont mesurées dans des cuves de 2 mm, à 260 nm pour le poly A, le poly G, le poly U et à 280 nm pour le poly C.

Les valeurs données correspondent à la moyenne de 3 expérimentations.

L'élution des nucléotides est réalisée par un gradient linéaire de 35 minutes depuis un tampon phosphate de potassium 0,1M pH 7 jusqu'à un tampon phosphate de potassium 90 mM pH 7 dans le méthanol à 32,5 % à un débit de 0,8 ml/minute.

Selon ou non, l'apparition de produits de dégradation du dinucléotide testé, nous pouvons conclure à une activité ribonucléasique.

Les dinucléotides utilisés au cours de ces expériences ont été fournis par la firme Sigma.

B - RESULTATS.

Nous avons constaté que la ribonucléase A possède une activité ribonucléasique sur les dinucléotides phosphates dont le nucléotide en position 3' est la cytidine ou l'uracile, quelle que soit la nature du nucléotide en position 5'. Ces dinucléotides CpN et UpN (où N peut être A, G, C ou U) sont en effet des substrats conventionnels de la ribonucléase A. Cependant, nous pouvons remarquer que l'angiogénine bovine n'a aucune activité catalytique sur ceux-ci. Ainsi, si nous prenons par exemple le cytidyl(3'-5')adénosine, nous pouvons remarquer (Fig.19 p.82) que ce substrat est clivé par la ribonucléase A (Fig.19B) et donne deux produits dont les temps de rétention sur la colonne sont plus courts. Par contre, en présence d'angiogénine, ce substrat reste intact (Fig 19C).

La ribonucléase A et l'angiogénine bovine n'hydrolysent pas les autres dinucléotides phosphates utilisés dont la nature est précisée p.84.

C - INTERPRETATION.

L'activité ribonucléasique de la ribonucléase A largement décrite auparavant a été vérifiée et témoigne de la bonne qualité des substrats. Sur aucun des substrats dinucléotidiques utilisés, l'angiogénine bovine n'a d'activité catalytique puisque les substrats sont retrouvés intacts et qu'aucun de leurs produits de dégradation n'a pu être détecté.

ABSORBANCE 254 nm

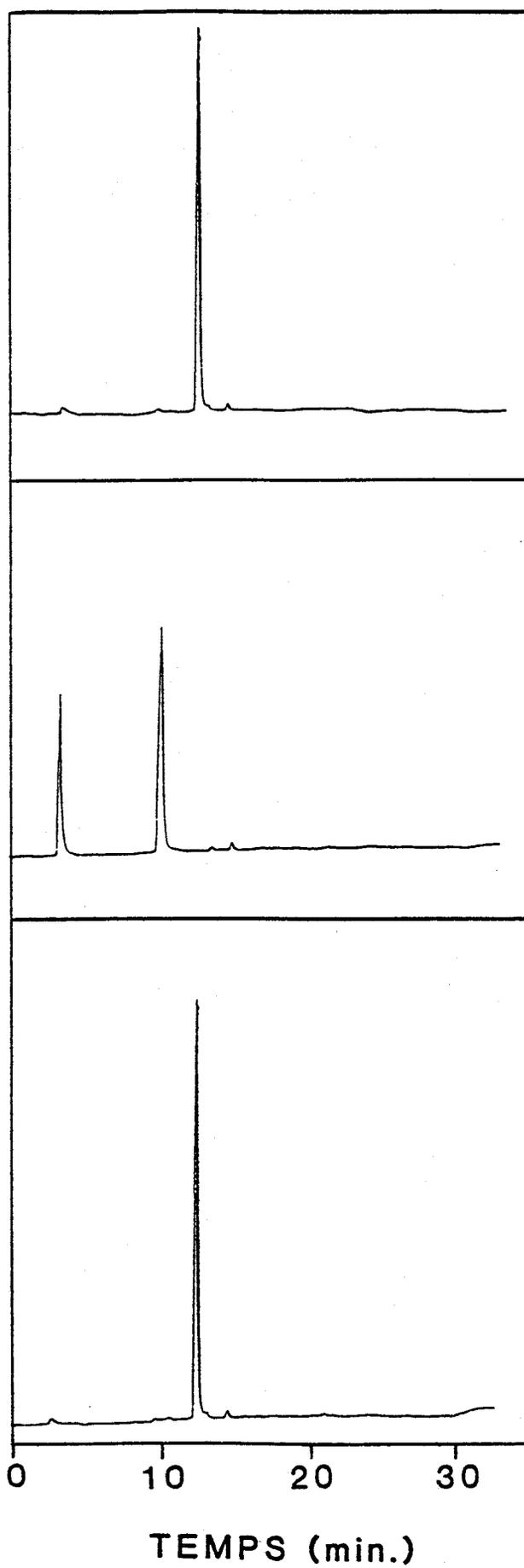


Figure 19 : Activité ribonucléasique sur le CpA.

A - Témoin CpA

B - CpA en présence de ribonucléase A.

C - CpA en présence d'angiogénine bovine.

III - ACTIVITE DE L'ANGIOGENINE BOVINE SUR L'ARN DE GERME DE BLE.

A - MATERIEL ET METHODE.

Nous avons utilisé la méthode de BLANK & DEKKER (1981). 0,8 mg d'ARN de germe de blé sont incubés dans un tampon Tris 35 mM, pH 8,5, saccharose 50 mM, NaCl 0,8 mg. 30 µg de BSA sont ajoutés ainsi que l'angiogénine bovine ou la ribonucléase A à la concentration de 28 nM. Le volume final de l'incubat est de 300 µl. Celui-ci est alors placé à 37°C pendant 5 heures. La réaction est ensuite stoppée par l'addition de 700 µl d'une solution glaciale d'acide perchlorique à 3,4 %. Après 10 minutes de repos dans la glace, les échantillons sont centrifugés à 13500 g pendant 10 minutes à 4°C. L'absorbance du surnageant est enfin mesurée à 260nm.

B - RESULTATS.

Les valeurs d'absorbance mesurées par le témoin et l'angiogénine bovine sont très proches, de l'ordre de 0,06 tandis que pour l'incubat correspondant à la ribonucléase A, cette absorbance atteint la valeur de 2. L'angiogénine bovine contrairement à la ribonucléase A n'a donc aucune activité sur l'ARN de germe de blé.

IV - ACTIVITE DE L'ANGIOGENINE BOVINE SUR LES MONONUCLEOTIDES PHOSPHATES CYCLIQUES.

A - MATERIEL ET METHODE.

Nous avons utilisé 2 méthodes différentes : une méthode spectrophotométrique basée sur la modification des méthodes de RICHARDS (1955) et CROOK (1960) et une méthode utilisant la chromatographie liquide à haute pression (HPLC), technique précédemment utilisée pour l'étude d'une activité ribonucléasique sur les dinucléotides.

Dans la première méthode, l'angiogénine (28 nM) est incubée dans des cuves de spectrophotomètre (Shimadzu MPS 2000) thermostaté à 37°C en présence de cytidine cyclique (C>p) (0,28 mM) ou d'uridine cyclique (U>p) (0,58 mM), dans un tampon Mes 0,1M pH 6,5, NaCl 0,1 M.

Tableau III : Substrats potentiels utilisés pour l'étude de l'activité ribonucléasique de l'angiogénine bovine.

| Substrats de la ribonucléase pancréatique | |
|---|-----------------|
| poly(C) | C>p |
| poly(U) | U>p |
| ARN de germe de blé | CpN* |
| | UpN |
| Autres nucléotides | |
| poly(A) | ApN |
| poly(G) | GpN |
| CpA(2',5') | Poly(A).poly(u) |
| CpC(2',5') | G>p |
| UpA(2',5') | A>p |
| * N = A, C, G ou U | |

L'absorbance est mesurée continuellement à 284 nm pour le C>p et à 280 nm pour l'U>p, contre le substrat incubé sans enzyme.

B - RESULTATS.

L'utilisation de ces 2 méthodes révèle qu'aucune dégradation sensible des substrats (U>p et C>p) n'a pu être observée en présence d'angiogénine bovine, seule l'activité de la ribonucléase A a pu être visualisée.

V - ACTIVITE DE L'ANGIOGENINE BOVINE SUR LES ARN RIBOSOMIQUES 18 ET 28 S.

A - MATERIEL ET METHODE.

La méthode que nous avons utilisée cette fois-ci est une méthode électrophorétique (MANIATIS et al., 1982).

0,1 unité d'ARN ribosomiaux 18 et 28 S de foie de Veau (Pharmacia), soit environ 4 µg sont incubés dans un tampon Tris 0,1M pH 8,3, NaCl 0,025 M en présence d'une concentration en angiogénine bovine de 0,66 µM à 37°C pendant 1 H 30.

L'incubat est ensuite centrifugé 1 minute à 13500 g et 2 µl de tampon échantillon sont ajoutés.

Après une nouvelle étape de centrifugation (1 minute à 13500 g) la totalité de l'incubat est déposée sur un gel d'agarose à 1,1 %, ce gel étant réalisé avec un tampon borate 50 mM, EDTA 0,1 mM, renfermant de l'hydromethylmercure à raison de 20 mM.

Après migration dans ces conditions dénaturantes pendant 45 minutes sous 100 V, le gel est démoulé et coloré dans une solution d'acétate d'ammonium 0,5 M renfermant le bromure d'éthidium à raison de 0,5 µg/ml, pendant 15 minutes. L'excès de bromure d'éthidium est ensuite éliminé par immersion du gel dans l'acétate d'ammonium 0,5 M pendant 15 minutes.

Le résultat est finalement apprécié sur table d'émission U.V. à 312 nm.

Composition du tampon échantillon : - bleu de bromophénol 0,25 %,
 - xylène cyanol 0,25 %,
 - Glycérol 30 %.

Nous avons utilisé la même technique pour vérifier que l'inhibiteur placentaire des ribonucléases était capable d'anéantir l'action de l'angiogénine bovine sur ces ARN et 18 et 28 S. Nous avons utilisé l'inhibiteur placentaire de ribonucléase commercialisé par Pharmacia sous le nom de RNasin. L'unité de RNasin définie par cette firme est capable d'inhiber l'activité de 2,5 ng de Ribonucléase A et le titre de la solution était de 40 000 unités/ml. Dans ces conditions 1 µl de RNasin est capable d'inhiber l'activité de 100 ng de Ribonucléase. Nous avons donc ajouté 1 µl de cet inhibiteur dans nos incubats.

B - RESULTATS.

Sur la figure 20 p.87 représentant un tel gel d'agarose après coloration, nous pouvons remarquer que les bandes d'ARNs 18 et 28 S ont totalement disparu dans le puits 6 correspondant à la présence d'angiogénine bovine à 0,66 µM. Par contre, des bandes correspondant à des chaînes de 100 à 500 nucléotides peuvent être observées. Le témoin (piste 5) est resté intact. Nous avons également vérifié que l'inhibiteur placentaire des ribonucléases inhibait l'activité de l'angiogénine bovine, en effet sur la Fig.21 p.88 nous pouvons remarquer que dans les pistes 1,2,3 et 4 correspondant respectivement au témoin ARN 18 et 28 S, au témoin ARN + RNasin, aux ARN en présence de RNasin et d'Angiogénine et aux ARN en présence de RNasin et de Ribonucléase A que les ARN ribosomiques 18 et 28 S n'ont pas été dégradés. Par contre, la ribonucléase A dégrade totalement les ARN (piste 6)) et l'angiogénine bovine ne les dégrade que partiellement (piste 8), la piste 7 correspond à un témoin ARN 18 et 28 S.

VI - INHIBITION "in vitro" DE LA SYNTHÈSE DES PROTÉINES.

Comme nous l'avons mentionné dans la partie générale, l'angiogénine humaine est capable de bloquer la synthèse des protéines in vitro à des concentrations de 40 à 60 nM. Par contre, dans les mêmes conditions la ribonucléase A n'inhibait cette synthèse que de moitié. Ayant à notre disposition des systèmes de traduction "in vitro" il était facile de vérifier que l'angiogénine bovine agissait de la même façon que l'angiogénine humaine et que l'activité principale de cette protéine

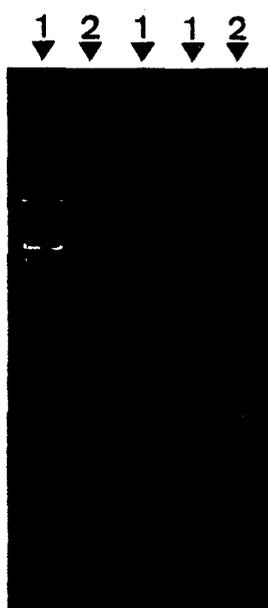


Figure 20 : Gel d'agarose à 1,1 % en présence d'hydroxyméthylmercure

1 - Témoin ARNr 18 et 28 S de foie de Veau.

2 - Activité de l'angiogénine bovine sur les ARNr 18 et 28 S



Figure 21 : Inhibition de l'activité ribonucléasique de l'angiogénine bovine par l'inhibiteur placentaire des ribonucléases.

était bien le blocage de cette synthèse par dégradation des ARNs ribosomiques.

A - MATERIEL ET METHODE.

Nous avons utilisé les systèmes de traduction commercialisé par la firme Promega Biotech et suivi les recommandations expérimentales données par cette firme.

Ce système de traduction comprend un lysat de réticulocytes de Lapin, un mélange d'acides aminés dont la méthionine est exclue et de l'ARN de virus BMV (Brome Mosaic Virus). Dans les incubats nous avons ajouté la méthionine marquée au soufre ^{35}S , ce qui nous a permis d'évaluer la synthèse protéique en présence ou non de différentes concentrations d'angiogénine bovine ou de ribonucléase A.

Pour évaluer l'inhibition de la synthèse protéique provoquée par l'angiogénine nous avons réalisé le milieu d'incubation suivant :

- 20 μl de lysat de réticulocytes de Lapin,
- 1 μl de solution d'acides aminés à 1 mM, hormis la méthionine,
- 1 μl de solution de ^{35}S -méthionine à 1000 Ci/mmmole,
- 1 μl de solution d'ARN de BMV (Brome Mosaic Virus) à 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

q.s.p. 30 μl : - par de l'eau dans le cas du témoin de traduction (donnant 100 % de synthèse).

- par une solution d'angiogénine bovine ou de ribonucléase A.

Les incubats sont placés à 30 °C pendant une heure à l'issue de laquelle 2 μl sont prélevés et additionnés d'1 ml de solution de soude 0,1 M dans l'eau oxygénée à 1,5 %. Après 10 minutes à 37 °C, 4 ml d'acide trichloroacétique à 25 % sont ajoutés et les incubats sont placés dans la glace pendant 30 minutes avant d'être filtrés sur fibre de verre (Whatman). Les filtres sont rincés d'abord par une solution d'acide trichloroacétique à 5 % puis par l'éthanol avant d'être séchés en étuve.

Chaque filtre est alors placé dans une fiole de comptage avec 4 ml de liquide scintillant (Lipofluor, Baker). La radioactivité est enfin mesurée dans un compteur de radioactivité β (Beckman).

B - RESULTATS.

Les résultats sont donnés sous forme d'histogramme dans la figure 22 p.91 de ce mémoire. Nous avons évalué l'incorporation de ³⁵S-Méthionine en pourcentage de l'incorporation maximale, mesurée lorsqu'aucun inhibiteur n'est ajouté à l'incubat.

A la concentration de 350 nM, l'angiogénine bovine comme la ribonucléase A inhibe totalement la synthèse protéique *in vitro*. Cependant, nous pouvons constater qu'au fur et à mesure que la concentration en ces enzymes diminue, l'effet inhibiteur de la ribonucléase A est plus important que celui de l'angiogénine bovine. En effet, à la concentration de 21,8 nM, la ribonucléase A est encore capable d'inhiber la synthèse protéique d'environ 36 % alors que l'angiogénine bovine employée à la même concentration n'a plus cet effet inhibiteur.

Cette inhibition de la synthèse protéique a également été vérifiée par autoradiographie (Fig.23 p.92). La piste A correspond au témoin de traduction, dans les pistes B, C et D ont été déposés 5 µl d'incubat renfermant les concentrations respectives d'angiogénine bovine de 175, 87,5 et 43,7 nM. Après une période d'autoradiographie de 15 jours à -70 °C, seuls les dépôts correspondant au témoin sans enzyme et à l'incubat renfermant 43,7 nM d'angiogénine bovine ont été capables d'impressionner le film. Dans les puits B et C, seule la radioactivité résiduelle peut être observée au niveau du front de migration.

C - INTERPRETATION.

Les résultats obtenus sont en contradiction avec ceux de ST CLAIR *et al.* (1987) concernant l'angiogénine humaine. En effet ces auteurs suggéraient que l'angiogénine humaine pouvait inhiber la synthèse protéique *in vitro* de façon plus spécifique que ne le faisait la ribonucléase A. L'angiogénine bovine ne semble pas posséder cette caractéristique puisque l'inhibition qu'elle provoque est du même ordre de grandeur que celle due à la ribonucléase A.

Cependant, BOND & VALLEE (1988) décrivaient récemment que l'activité ribonucléasique de l'angiogénine bovine d'origine sérique sur les ARNs 18 et 28 S était approximativement 3 fois plus faible que celle

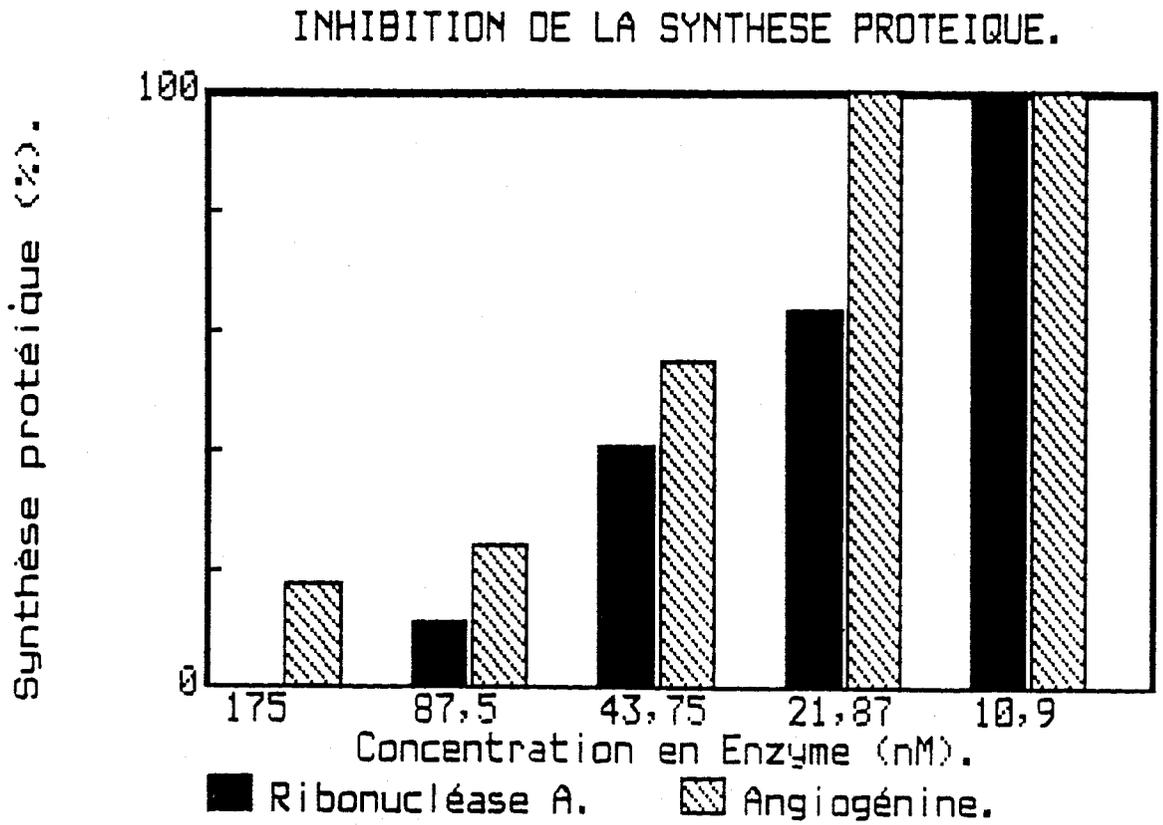


Figure 22 : Inhibition de la synthèse protéique *in vitro* par l'angiogénine bovine et la ribonucléase A bovine.

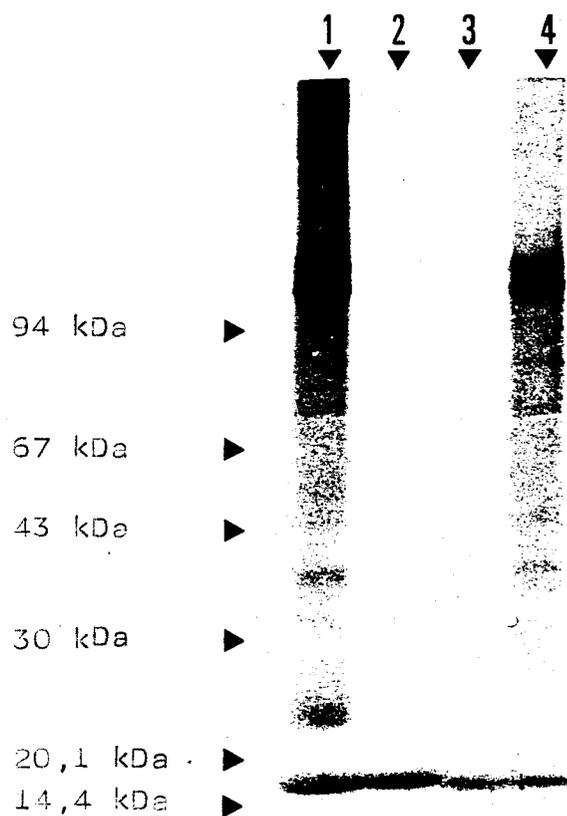


Figure 23 : Appréciation par autoradiographie de l'inhibition de la synthèse protéique provoquée par l'angiogénine bovine.

1 - Témoin positif de traduction.

2 - En présence de l'angiogénine bovine à 175 nM.

3 - En présence de l'angiogénine bovine à 87,5 nM.

4 - En présence de l'angiogénine bovine à 43,7 nM.

de l'angiogénine humaine. De ce fait, il paraît logique que l'inhibition de la synthèse protéique provoquée par l'angiogénine bovine soit également plus faible. Les résultats remettent donc en question la spécificité du blocage de la synthèse protéique provoquée par l'angiogénine.

VII - CONCLUSION.

Nous avons donc démontré que l'angiogénine bovine ne possède aucune activité ribonucléasique sur les substrats conventionnels des ribonucléases. Par contre, elle est capable de dégrader partiellement les ARNs ribosomiques 18 et 28 S, les produits de dégradation de ces ARNs étant des polyribonucléotides de 100 à 500 bases. Cette activité est totalement inhibée par l'inhibiteur placentaire des ribonucléases. Ces résultats corroborent donc ceux de SHAPIRO *et al.* (1986) et SHAPIRO et VALLEE (1987b) concernant l'angiogénine humaine et complètent ceux de BOND et VALLEE (1988) sur l'angiogénine bovine isolée du sang de boeuf. Vue la substitution de l'acide aminé en position 116 (Leu->Phe), il était important de vérifier que l'angiogénine bovine possédait bien la même spécificité de substrat que l'angiogénine humaine. Cependant, cette substitution ne semble pas être de nature à modifier la spécificité de l'angiogénine. Ces résultats renforcent donc également les travaux de HARPER *et al.* (1988) qui suggéraient que la spécificité de substrat de l'angiogénine était portée par la partie N-terminale de la molécule.

Cependant, le blocage spécifique de la synthèse des protéines par l'angiogénine est remis en cause puisque les inhibitions de cette synthèse "*in vitro*" provoquée par l'angiogénine bovine et la ribonucléase A sont du même ordre de grandeur. Néanmoins, BOND & VALLEE (1988) ont décrit que l'activité ribonucléasique de l'angiogénine bovine est environ trois fois plus faible que celle de la protéine humaine. Il est donc logique que le blocage de la synthèse des protéines "*in vitro*" survienne pour des concentrations en angiogénine bovine plus importantes. Il semble donc que l'activité angiogénique ne soit pas liée à l'inhibition de la synthèse protéique.

CONCLUSION GENERALE .

Les travaux que nous avons effectués font suite aux résultats acquis au Laboratoire depuis une trentaine d'années concernant les divers constituants des laits. Sur la base de ces connaissances, nous avons décrit, dans le lait de Vache, une nouvelle protéine dont la nature, grâce à une collaboration suivie avec le laboratoire de Chimie des Biomolécules de l'Institut Pasteur de Lille, a pu être déterminée; il s'agit de l'angiogénine bovine.

A l'époque où nous avons isolé ce peptide, seule l'angiogénine humaine avait été isolée à partir de surnageants de culture de cellules malignes HT-29 établies en lignée cellulaire (FETT et al., 1985). Par la suite, l'isolement de l'angiogénine en quantité plus importante à partir de plasma humain a permis au groupe de VALLEE d'obtenir des renseignements sur les propriétés de cette molécule. Nous appuyant sur ces travaux, nous avons comparé les propriétés de l'angiogénine bovine et de l'angiogénine humaine. Les conclusions générales que nous pouvons tirer de l'ensemble de nos travaux sont les suivantes :

1 - L'isolement et la purification de l'angiogénine bovine peuvent être réalisés rapidement soit par la succession de trois chromatographies d'échange de cations, soit par une série de deux chromatographies d'échange de cations et d'une chromatographie d'adsorption de type hydrophobe. Par l'une ou l'autre de ces méthodes que nous avons mises au point, l'angiogénine bovine est obtenue dans un état de pureté remarquable avec des rendements élevés, de l'ordre de 0,5 à 0,6 mg par litre de lait de Vache.

L'angiogénine bovine peut être également isolée à partir d'une préparation commerciale de lactotransferrine bovine. Ainsi, nous avons pu purifier l'angiogénine bovine et définir que l'échantillon de lactotransferrine considéré renfermait environ 1 % d'angiogénine.

2 - Ayant isolé l'angiogénine du lait de Vache en quantité suffisamment importante, nous avons pu, ensuite, étudier certaines de ses propriétés

physico-chimiques et biologiques. L'angiogénine bovine est une protéine de masse moléculaire apparente de 15 kDa dont le point isoélectrique est supérieur à 9,5, elle n'est pas glycosylée et sa composition en acides aminés présente de nombreux points communs avec celle de l'angiogénine humaine.

Nous avons vérifié son activité angiogénique sur la membrane chorio-allantoïdienne d'oeuf de Poule pour des doses de 5 ng, cependant, une étude statistique complète portant sur un nombre plus important d'oeufs serait nécessaire. Néanmoins, l'isolement récent de l'angiogénine bovine plasmatique par BOND & VALLEE (1988) a permis à ces auteurs de démontrer une activité angiogénique de cette protéine, selon la même technique, pour des doses minimales de 0,62 ng. L'activité angiogénique de l'angiogénine bovine sur la cornée de Lapin devra également être réalisée.

L'angiogénine bovine ne possède pas d'activité de type "facteur de croissance" sur des cellules fibroblastiques de poumon de Hamster chinois (cellules CCL 39), ni sur les cellules endothéliales d'aorte bovine. Ces résultats étaient prévisibles puisque les premières ne sont pas impliquées dans le processus de néovascularisation et qu'il a été décrit (RIFKIN et al., 1982) que les gros vaisseaux sanguins ne présentent pas de bourgeon.

Cependant, des expériences menées parallèlement (CECCHIELI et al., 1988) ont montré que l'angiogénine bovine pouvait stimuler la croissance de cellules endothéliales de capillaires de cerveau bovin. Cette activité, très faible, ne peut néanmoins être comparée à l'activité d'un véritable facteur de croissance, suggérant ainsi une activité indirecte de l'angiogénine bovine sur ces cellules.

3 - La structure primaire complète de l'angiogénine bovine a été déterminée en collaboration avec le laboratoire de Chimie des Biomolécules de l'Institut Pasteur de Lille. Cette séquence, constituée de l'enchaînement de 124 résidus d'acides aminés, présente des homologies respectives de 65 % et 34 % avec les séquences de l'angiogénine humaine et de la ribonucléase A bovine.

Quelques différences importantes entre les structures primaires des deux angiogénines sont à noter : l'angiogénine bovine ne présente pas un résidu d'acide pyroglutamique en position N-terminale puisque nous avons décrit un résidu supplémentaire d'alanine à cette position. La séquence

Arg-Gly-Asp est présente sur la protéine du lait de Vache contrairement à l'angiogénine humaine. Cette séquence est responsable de l'adhésion de diverses protéines comme la fibronectine à la surface de cellules endothéliales (RUOSLAHTLI & PIERSCHBACKER, 1986), de plus, en remplaçant la séquence Arg-Gly-Asp sur le modèle moléculaire de l'angiogénine humaine proposé par PALMER et al. (1986), il apparaît qu'elle se trouverait en position externe sur la molécule d'angiogénine bovine et donc, qu'elle serait facilement accessible. Cette remarque pose le problème de l'existence d'un récepteur de l'angiogénine à la surface des cellules endothéliales : existe-t-il un récepteur spécifique de l'angiogénine ou ce récepteur est-il commun à toutes les protéines présentant la séquence Arg-Gly-Asp?

La dernière différence majeure entre les deux angiogénines, du point de vue de leur structure primaire, est la substitution du résidu de leucine 115 de l'angiogénine humaine par un résidu de phenylalanine-116 sur l'angiogénine bovine. Or, il a été décrit par LIN et al. en 1972 qu'une substitution analogue sur la ribonucléase A se traduisait par une diminution de son activité ribonucléasique. Nous avons donc entrepris d'étudier l'activité ribonucléasique de l'angiogénine bovine.

4 - Parmi tous les substrats conventionnels ou non de la ribonucléase A, nous avons montré que seuls les ARN ribosomiques 18 et 28 S sont sensibles à l'activité de l'angiogénine bovine, les produits de dégradation étant des fragments de 100 à 500 nucléotides. Ces résultats corroborent donc ceux de SHAPIRO et al. (1986) concernant l'angiogénine humaine et les travaux récents de BOND & VALLEE (1988) sur l'angiogénine bovine plasmatique. Nous démontrons ainsi que la substitution sus-mentionnée n'est pas de nature à modifier la spécificité de l'angiogénine.

La seule différence d'activité que nous avons pu observer entre les deux angiogénines se situe au niveau du blocage de la synthèse protéique *in vitro*. ST CLAIR et al. (1987) avaient montré que l'angiogénine humaine bloquait la synthèse des protéines *in vitro* beaucoup plus spécifiquement que la ribonucléase A. Or, nous avons démontré que l'inhibition provoquée par l'angiogénine bovine est du même ordre de grandeur que l'inhibition due à l'action de la ribonucléase A. Ce résultat est néanmoins logique puisque BOND & VALLEE (1988) ont démontré que l'activité ribonucléasique de l'angiogénine bovine plasmatique sur

les ARN ribosomiques 18 et 28 S est environ trois fois plus faible que l'activité ribonucléasique de l'angiogénine humaine. Notre observation met néanmoins en cause la relation qui a été établie entre cette activité ribonucléasique et l'activité angiogénique de la molécule.

De nombreux points communs entre les angiogénines des espèces humaine et bovine ont été décrits. Notre travail pose, une fois de plus, le problème du mode d'action de l'angiogénine, qui, comme nous l'avons précédemment discuté pourrait différer, selon les espèces,. Les perspectives ouvertes par notre description sont nombreuses puisque l'angiogénine n'a été découverte que récemment et que peu d'équipes de recherche s'y sont intéressé jusqu'à présent. La concentration élevée de l'angiogénine dans le lait de Vache devrait permettre de la purifier en grande quantité et d'avoir ainsi un matériel protéique suffisamment important pour réaliser des études qui, peut-être, permettront de répondre aux différentes questions suivantes :

Quelle est la signification de la présence de l'angiogénine dans le lait?

Certaines hormones et facteurs de croissance sont présents dans les laits. Ces molécules semblent être impliquées dans le développement du tractus gastro-intestinal du nouveau-né. De plus, la concentration en facteur de croissance du lait est maximale après le vêlage et décroît au fur et à mesure de l'allaitement (SHING & KLAGSBRUN, 1984), si bien qu'une corrélation peut être établie entre les besoins du nouveau-né et la concentration en facteur de croissance dans le lait. Nous sommes donc en mesure de nous demander si l'angiogénine du lait de Vache est utilisée par le Veau au cours des premiers jours de sa vie et dans ce cas comment le nouveau-né peut-il utiliser une protéine dont la principale caractéristique est d'induire la prolifération de nouveaux capillaires sanguins? L'utilisation de l'angiogénine par le nouveau-né impliquerait la présence sur certaines cellules du tractus digestif de récepteurs de l'angiogénine nécessaires pour le passage de cette molécule dans la circulation sanguine. Notons, à ce sujet, que pour toutes les espèces, le passage de certaines protéines maternelles dans le lait peut être différent. En effet, il a été décrit que chez l'espèce

bovine, contrairement à l'espèce humaine, le placenta est imperméable aux immunoglobulines et que la Vache fournit au Veau les anticorps qui lui sont indispensables pour survivre. De la même façon, le Veau, contrairement au nourrisson, pourrait nécessiter l'angiogénine à sa naissance et la présence de la séquence Arg-Gly-Asp dans la structure primaire de l'angiogénine bovine pourrait représenter le signal indispensable pour la reconnaissance de l'angiogénine par les entérocytes. L'angiogénine humaine, capable de franchir la barrière placentaire, n'aurait donc pas à être utilisée par le nourrisson, ce qui expliquerait qu'elle soit dépourvue de ce signal de reconnaissance.

La seconde hypothèse que nous pouvons émettre sur la présence de l'angiogénine dans le lait de Vache est son implication dans le processus de développement de la glande mammaire.

Lors de la gestation, la glande mammaire subit quelques modifications importantes indispensables pour la production des constituants du lait immédiatement après la naissance. Lors de ce développement, une vascularisation intense de la glande mammaire se produit. De ce fait, nous pouvons nous demander si l'angiogénine de la circulation sanguine intervient lors de ce phénomène et si la présence de l'angiogénine dans le lait n'est pas le reflet de la concentration importante de cette molécule dans la glande mammaire.

Nous pouvons également mentionner qu'en 1982, JENSEN *et al.* ont décrit que le tissu mammaire humain normal pouvait induire l'angiogénèse. Ces auteurs avaient alors conclu que ce phénomène était un marqueur probable de la précancérisation. Cette observation n'était-elle pas simplement due à la présence habituelle d'un facteur angiogénique dans la glande mammaire?

Quel est le mode d'action de l'angiogénine?

La corrélation entre l'activité ribonucléasique de l'angiogénine et son activité angiogénique est désormais remise en cause. Le mécanisme d'action de cette molécule pourrait impliquer l'existence de récepteurs membranaires, non seulement sur les cellules endothéliales des capillaires sanguins, mais aussi sur d'autres cellules qui, sous

l'action de l'angiogénine, libéreraient un autre facteur angiogénique capable de stimuler la croissance des cellules endothéliales.

Si les cellules endothéliales possèdent un récepteur spécifique de l'angiogénine, le mécanisme d'action peut néanmoins être indirect, l'angiogénine induisant un signal permettant la libération d'un autre facteur angiogénique. Ce facteur serait utilisé par la cellule endothéliale elle-même.

L'élucidation du mode d'action de l'angiogénine passera donc obligatoirement par la recherche d'un récepteur membranaire.

Que signifie l'affinité importante de l'inhibiteur placentaire des ribonucléases (PRI) pour l'angiogénine?

Depuis qu'il a été démontré que l'affinité du PRI est plus importante pour l'angiogénine que pour la ribonucléase A, nous sommes en mesure de nous demander si le PRI n'est pas le véritable agent de régulation de l'angiogénèse induite par l'angiogénine. La production de cet inhibiteur pourrait être régulée par des facteurs hormonaux. Les recherches sur l'angiogénine devront donc, par la suite, prendre en ligne de compte cette molécule.

L'angiogénine est-elle commune à tous les laits de mammifères?

Il sera indispensable, dans le futur, de vérifier la présence de l'angiogénine dans le lait de différents mammifères. A ce point nous pouvons préciser que l'angiogénine du lait de Femme a été recherchée dans notre Laboratoire et qu'aucune preuve de sa présence n'a pu être obtenue jusqu'à présent. La connaissance des structures des différentes angiogénines restant à isoler devrait permettre d'obtenir des renseignements sur les séquences peptidiques de la molécules, impliquées dans le mécanisme d'action. De plus, nous pourrions peut-être apporter une réponse à la question que nous avons posée précédemment sur l'utilisation ou non de l'angiogénine par les nouveaux-nés.

L'angiogénine est-elle impliquée dans la vascularisation tumorale?

Le développement d'une tumeur passe par le développement de son propre réseau vasculaire (FOLKMAN, 1974). De plus, les extraits tumoraux

sont doués de propriétés angiogéniques. Il serait donc nécessaire de vérifier la concentration sanguine en angiogénine de sujets atteints de cancer et de rechercher la présence de l'angiogénine dans les biopsies de ces malades. Si le taux d'angiogénine plasmatique évolue lors de la cancerisation, la mesure de celui-ci pourrait constituer un véritable test de dépistage rapide du cancer.

...et à propos de l'utilisation thérapeutique de l'angiogénine?

La découverte de cette molécule est encore trop récente et la connaissance des propriétés de l'angiogénine encore trop restreinte pour que l'utilisation de cette molécule en Pharmacie puisse être envisagée immédiatement. Néanmoins, nous pouvons espérer, d'ici quelques années, l'emploi de l'angiogénine dans divers domaines thérapeutiques comme la cicatrisation des plaies, le traitement des brûlés, la cosmétologie, la régénération des tissus traumatisés et peut-être les traitements anticancéreux. En effet, si l'angiogénine était impliquée dans le processus de cancerisation, l'emploi local d'un inhibiteur hautement spécifique comme par exemple le PRI, pourrait permettre l'arrêt de la vascularisation tumorale et donc, de la croissance des tumeurs.

Toutes ces questions seront certainement élucidées dans le futur mais nous pouvons affirmer, sans nous tromper, que l'angiogénine doit encore nous livrer la majeure partie de ses secrets.

BIBLIOGRAPHIE

- ASSOIAN R.K., KOMORIYA A., MEYERS C.A., MILLER D.M., SPORN M.B.. Transforming growth factor- β in human platelets. Identification of a major storage site, purification and characterization. *J. Biol. Chem.* (1983) 258, 7155-7160.
- AUSPRUNK D.H., FOLKMAN J.. Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. *Microvasc. Res.* (1977) 14, 53-65.
- AUSPRUNK D.H., KNIGHTON D.R., FOLKMAN J.. Differentiation of vascular endothelium in the chick chorio-allantois : a structural and autoradiographic study. *Develop. Biol.* (1974) 38, 237-248.
- BACHWICH P.R., CHENSUE S.W., LARRICK J.W., KUNKEL S.L.. Tumor necrosis factor stimulates interleukin-1 and prostaglandin E₂ production in resting macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1986) 136, 94-101.
- BANDA M.J., KNIGHTON D.R., HUNT T.K., WERB Z.. Isolation of a non-mitogenic angiogenesis factor from wound fluid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1982) 79, 7773-7777.
- BASSET C.A.L.. Biomedical implications of pulsing electromagnetic fields. *Sing. Rounds* (1983) 22-32.
- BASSET C.A.L., MITCHELL S.N., SCHINK M.M.. Treatment of therapeutically resistant non-unions with bone grafts and pulsing electromagnetic fields. *J. Bone Joint Surg.* (1982) 64a, 1214-1220.
- BENEZRA D.. Neovasculogenic ability of prostaglandins, growth factors and synthetic chemoattractants. *Am. J. Ophthalmol.* (1978) 86, 455-461.
- BEUTTER B., GREENWALD D., HULMES J.D., CHANG M., PAN Y.C.E., MATHISON J., ULEVITCH R., CERAMI A.. Identity of tumour necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin. *Nature* (1985) 316, 552-555.
- BICKNELL R., VALLEE B.L.. Angiogenin activates endothelial cell phospholipase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1988) 85, 5961-5965.
- BLACKBURN P., WILSON G., MOORE S.. Ribonuclease inhibitor from human placenta : purification and properties. *J. Biol. Chem.* (1977) 252, 5904-5910.
- BLANK A., DEKKER A.. Ribonucleases of human serum, urine, cerebrospinal fluid and leukocytes. Activity staining following electrophoresis in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels. *Biochemistry* (1981) 20, 2261-2267.

- BOND M.D., VALLEE B.L.. Isolation of bovine angiogenin using placental ribonuclease inhibitor binding assay. *Biochemistry* (1988) 27, 6282-6287.
- BREM H., FOLKMAN J.. *J. Exp. Med.* (1975) 141, 427-439.
- BURNETTE M.N.. "Western blotting" : electrophoretic transfert of proteins from SDS-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibodies and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* (1981) 112, 195-203.
- CARSWELL E.A., OLD L.J., KASSEL R.L., GREEN S., FIORE N., VILLIAMSON B.. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1975) 72, 3666-3670.
- CECCHELI R. et al. (1988). Communication personnelle.
- CENTRELLA M., Mc CARTHY G., CANALIS E.. Transforming growth factor β is a bifunctional regulator of replication and collagen synthesis in osteoblast-enriched cell cultures from fetal rat bone. *J. Biol. Chem.* (1987) 262, 2869-2874.
- CLARK E.R., CLARK E.L.. Microscopic observations on the growth of blood capillaires in the living mammal. *Am. J. Anat.* (1939) 64, 251-301.
- CROOK E.E., MATHIAS A.P., RABIN B.R.. Spectrometric assay of bovine pancreatic ribonuclease by the use of cytidine 2':3'-phosphate. *Biochem. J.* (1960) 74, 234-238.
- D'AMORE P.A., THOMPSON R.W.. Mechanisms of Angiogenesis. *Ann. Rev. Physiol.* (1987) 49, 453-464.
- DE LARCO J.F. & TODARO G.J.. Growth factors from murine sarcoma virus-transformed cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1978) 75, 4001-4005.
- DE LARCO J.F. & TODARO G.J. *J. Cell. Physiol.* (1980) 102, 267-
- DENEFFLE P., KOVARIK S., GUITTON J.D., CARTWRIGHT T., MAYAUX J.F.. Chemical synthesis of a gene coding for human angiogenin, its expression in *E. Coli* and conversion of the product into its active form. *Gene* (1987) 56, 61-70.
- DERYNCK R., ROBERTS A.B., WINKLER M.E., CHEN E.Y., GOEDDEL D.V.. Human transforming growth factor- α : precursor structure and expression in *E. Coli*. *Cell* (1984) 38, 287-297.
- ESCH F., BAIRD A., LING N., VENO N., HILL F., DENOROY L., KLEPPER R., GOSPODAROWICZ D., BOHLEN P., GUILLEMIN R.. Primary structure of bovine pituitary basic fibroblast growth factor (FGF) and comparison with the amino-terminal sequence of bovine brain acidic FGF. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1985) 82, 6507-6511.

- FENSELAU A., WATT S., MELLO R.J.. Tumor angiogenic factor. Purification from the Walker 256 rat tumor. J. Biol. Chem. (1981) 256, 9605-9611.
- FETT J.W., BETHUNE J.L., VALLEE B.L.. Induction of angiogenesis by mixture of two angiogenic proteins, Angiogenin and acidic fibroblast growth factor, in the chick chorio allantoic membrane. Biochem. Biophys. Res. Commun.(1987) 146, 1122-1131.
- FETT J.W., STRYDOM D.J., LOBB R.R., ALDERMAN E.M., BETHUNE J.L., RIORDAN J.F., VALLEE B.L.. Isolation and characterisation of Angiogenin, an angiogenic protein from human carcinoma cells. Biochemistry (1985) 24, 5480-5486.
- FOLKMAN J.. Tumor angiogenesis. Adv. Canc. Res. (1974) 19, 331-358.
- FOLKMAN J.. Tumor angiogenesis factor. Cancer Res. (1974) 34, 2109-2113.
- FOLKMAN J.. Tumor angiogenesis. Adv. Canc. Res. (1985) 43, 175-203.
- FOLKMAN J., HAUDENSCHILD C.. Angiogenesis in vitro. Nature (1980) 288, 551-556.
- FOLKMAN J., HAUDENSCHILD C., ZETTER B.R.. Long term culture of capillary endothelial cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1979) 76, 5217-5221.
- FOLKMAN J., KLAGSBRUN M.. Angiogenic factors. Science (1987) 235, 442-447.
- FOLKMAN J. & MOSCONA A.. Role of cell shape in growth control. Nature (1978) 273, 345-349.
- FORM D.M., AUERBACH G.. PGE2 and angiogenesis. Proc. Exp. Biol. Med. (1983) 172, 214-219.
- FRATER-SCHRÖDER M., RISAU W., HALLMANN R., GAUTSCHI P., BÖHLEN P.. Tumor necrosis factor type α , a potent inhibitor of endothelial cell growth in vitro, is angiogenic in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1987) 84, 5277-5281.
- FROLIK C.A., DART L.L., MEYERS C.A., MILLER D.M., SPORN M.B.. Purification and initial characterization of a type β transforming growth factor from human placenta. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1983) 80, 3676-3680.
- GIMBRONE M.A.; Jr., COTRAN R.S., LEAPMAN S.B., FOLKMAN J.. Tumor growth and neovascularization : an experimental model using the Rabbit cornea. J. Natl. Cancer Inst. (1974) 52, 413-427.
- GOSPODAROWICZ D.. Fibroblast growth factor : structural and biological properties. Nucl. Med. Biol. (1987) 14, 421-434.
- GOSPODAROWICZ D., NEUFELD G., SCHWEIGERER L.. Fibroblast growth factor. Mol. Cell. Endocrinol. (1986) 46, 187-204.

- GOSPODAROWICZ D., THAKRAL K.K.. Production of a corpus luteum angiogenic factor responsible for proliferation of capillaries and neovascularization of the corpus luteum. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1978) 75, 847-851.
- GRABAR P., WILLIAMS C.A.. Méthode immuno-électrophorétique d'analyse de mélanges de substances antigéniques. Biochim. Biophys. Acta (1953) 17, 65.
- GREENBLATT M., SHUBIK P.. Tumor angiogenesis : transfilter diffusion studies in the hamster by the transparent chamber technique. J. Nat. Cancer Inst. (1968) 41, 111-124.
- GROSS J.L., MOSCATELLI D., RIFKIN D.B.. Increased capillary endothelial cell protease activity in response to angiogenic stimuli in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1983) 80, 2623-2627.
- HARPER J.W., AULD D.S., RIORDAN J.F., VALLEE B.L.. Enzymatically active Angiogenin/Ribonuclease A hybrids formed by peptide interchange. Biochemistry (1988) 27, 219-226.
- HEIMARK R.L. & SCHWARTZ S.M.. The role of membrane-membrane interactions in the regulation of endothelial cell growth. J. Cell. Biol. (1985) 100, 1934-1940.
- JENSEN H.M., CHEN I., DEVAULT M.R., LEWIS A.E.. Angiogenesis induced by "normal" human breast tissue : a probable marker for precancer. Science (1982) 218, 293-295.
- KALEBIC T., GARBISA S., GLASER B., LIOTTA L.A.. Basement membrane collagen : degradation by migrating endothelial cells. Science (1983) 221, 281-283.
- KEHRL J.H., ROBERTS A.B., WAKEFIELD L.M., JAKOWLEW S.B., SPORN M.B., FAUCI A.S.. Transforming growth factor beta is an important immunomodulatory protein for human B-lymphocytes. J. Immunol. (1986a) 137, 3855-3860.
- KEHRL J.H., WAKEFIELD L.M., ROBERTS A.B., JAKOWLEW S.B., ALVAREZ-MON M., DERYNCK R., SPORN M.B., FAUCI A.S.. Production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. J. Exp. Med. (1986b) 163, 1037-1050.
- KESKI-OJA J., LYONS R.M., MOSES H.L.. Inactive secreted forms of transforming growth factor- β : activation by proteolysis. J. Cell. Biochem. Suppl. (1987) 11A, 60-66.
- KLAGSBRUN M.. Human milk stimulates DNA synthesis and cellular proliferation in cultured fibroblasts. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1978) 75, 5057-5061.
- KLAGSBRUN M., KNIGHTON D., FOLKMAN J.. Tumor angiogenesis activity in cells grown in tissue culture. Cancer Research (1976) 36, 110-114.

- KNIGHTON D.R., AUSPRUNK D., TAPPER D., FOLKMAN J.. Avascular and vascular phases of tumour growth in the chick embryo. Br. J. Cancer (1977) 35, 347-356.
- KNIGHTON D.R., HUNT T.K., SCHEUENSTUHL H., HALLIDAY B.J., WERB Z., BANDA M.J.. Oxygen tension regulates the expression of angiogenesis factor by macrophages. Science (1983) 221, 1283-1285.
- KRUSIUS T., FINNE J., RAUVALA H.. The structural basis of the different affinities of two types of acidic N-glycosidic glycopeptides for concanavalin A-Sepharose. FEBS Lett. (1976) 71, 117-120.
- KURACHI K., DAVIE E.W., STRYDOM D.J., RIORDAN J.F., VALLEE B.L.. Sequence of the cDNA and gene for Angiogenin, a human angiogenesis factor. Biochemistry (1985) 24, 5494-5499.
- KURACHI K., RYBAK S.M., FETT J.W., SHAPIRO R., STRYDOM D.J., OLSON K.A., RIORDAN J.F., DAVIE E. W., VALLEE B.L.. Expression of human angiogenin in cultured baby hamster kidney cells. Biochemistry (1988) 27, 6557-6562.
- LAEMMLI U.K.. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature (1970) 227, 680-682.
- LANGER R., BREM H., FALTERMAN K., KLEIN M., FOLKMAN J.. Isolation of a cartilage factor that inhibits tumor neovascularization. Science (1976) 193, 70-72.
- LANGER R., FOLKMAN J.. Polymers for the sustained release of proteins and macromolecules. Nature (1976) 263, 797-800.
- LEE F.S., AULD D.S., VALLEE B.L.. Tryptophan fluorescence as a probe of placental ribonuclease inhibitor binding to angiogenin. Biochemistry (1989a) 28, 219-224.
- LEE F.S., SHAPIRO R., VALLEE B.. Tight-binding inhibition of angiogenin and ribonuclease A by placental ribonuclease inhibitor. Biochemistry (1989b) 28, 225-230.
- LEIBOVICH S.J., POLVERINI P.J., SHEPARD H.M., WISEMAN D.M., SHIVELY V., NUSEIR N.. Macrophage induced angiogenesis is mediated by tumor necrosis factor α . Nature (1987) 329, 630-632.
- LIN M.C., GUTTE B., CALDI D.G., MOORE S., MERRIFIELD R.B.. Reactivation of des(119-124) ribonuclease A by mixture with synthetic COOH-terminal peptides; the role of phenylalanine-120*. J. Biol. Chem. (1972) 247, 4768-4774.
- LOWRY O.M., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L., RANDALL R.J.. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. (1951) 193, 265.
- MADRI J.A., WILLIAMS S.K.. Capillary endothelial cell cultures : phenotypic modulation by matrix components. J. Cell. Biol. (1983) 97, 153-165.

- MANCINI G., CARBONARA A.O., HEREMANS J.F.. Immunochemical quantitation of antigens by simple radial immunodiffusion. *Immunochemistry* (1965) 2, 235-254.
- MANIATIS T., FRITSCH E.F., SAMBROOK J.. Molecular cloning. A laboratory manual. (1982) Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- MARSHALL R.D.. Glycoproteins. *Ann. Rev. Biochem.* (1972) 41, 673-702.
- MARX J.. Oncogene action probed. *Science* (1987) 237, 602-603.
- MASSAGUE J.. Epidermal growth factor like transforming growth factor. Interaction with epidermal growth factor receptors in human placenta membranes and A 431 cells. *J. Biol. Chem.* (1983) 258, 13614-13620.
- MONTREUIL J.. La maternisation des laits. Etat actuel de la question. *Ann. Nutr. Alim.* (1971) 25, A1-A381.
- MOSES H.L., BRANUM E.L., PROPER J.A., ROBINSON R.A.. Transforming growth factor production by chemically transformed cells. *Cancer Res.* (1981) 41, 2842-2848.
- MURAY J.B., BROWN L., LANGER R., KLAGSBRUN M.. A micro sustained release system for epidermal growth factor. *In vitro* (1983) 19, 743-748.
- MUTHUKKARUPPAN V.R., AUERBACH R.. Angiogenesis in the Mouse cornea. *Science* (1979) 205, 1416-1417.
- OUCHTERLONY O.. Antigen-antibody reactions in gel. *Acta Pathol. Microbiol. Scandinav.* (1949) 26, 507-510.
- PALMER K.A., SCHERAGA H.A., RIORDAN J.F., VALLEE B.L.. A preliminary three-dimensional structure of Angiogenin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1986) 83, 1965-1969.
- PENNICA D., NEDWIN E.E., HAYFLICK J.S., SEEBURG P.H., DERYNCK R., PALLADINO M.A., KOHR W.J., AGGARWAL B.B., GOEDEL D.V.. Human tumour necrosis factor : precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature* (1985) 312, 724-729.
- PLOUET J., COURTY J., OLIVIE M., COURTOIS Y., BARRITAUULT D.. A highly reliable and sensitive assay for the purification of cellular growth factors. *Cell. Mol. Biol.* (1984) 30, 105-110.
- RAJU K.S., ALLESANDRI G., ZICHE M., GULLINO P.M.. Ceruloplasmin, copper ions, and angiogenesis. *J. Natl. Cancer Inst.* (1982) 69, 1183-1188.
- RICHARDS F.M. *C.R. Trav. Lab. Carlsberg, Ser. Chim.* (1955) 29, 315-321.
- RICHARDS F.M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1958) 44, 162-166.

- RICHARDS F.M. & VITHAYATHIL P.J.. The preparation of a subtilisin-modified ribonuclease and the separation of the peptide and protein components. J. Biol. Chem. (1959) 234, 1459-1465.
- RIFKIN D.B., GROSS J.L., MOSCATELLI D., JAFFE E.. Protease and angiogenesis : production of plasminogen activator and collagenase by endothelial cells.
In "Pathobiology of the endothelial cell" (1982) (Nossel H.L. & Vogel H.J., eds.) pp. 191-197. Academic Press, New-York.
- ROBERTS A. B., ANZANO M.A., MEYERS C.A., WIDEMAN J., BLACHER R., PAN Y.C.E., STEIN S., LEHRMAN S.R., SMITH J. M., LAMB L.C., SPORN M.B.. Purification and properties of a type β transforming growth factor from bovine kidney. Biochemistry (1983) 22, 5692-5698.
- ROBERTS A.B., SPORN M.B., ASSOIAN R.K., SMITH J.M., ROCHE N.S., WAKEFIELD L.M., HEINE U.I., LIOTTA L.A., FALANGA V., KEHRL J.H., FAUCI A.S.. Transforming growth factor type β : rapid induction of fibrosis and angiogenesis *in vivo* and stimulation of collagen formation *in vitro*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1986) 83, 4167-4171.
- ROBEY P.G., YOUNG M.F., FLANDERS K.C., ROCHE N.S., KONDAIAH P., REDDI A.H., TERMINE J.D., SPORN M.B., ROBERTS A.B.. Osteoblasts synthesise and respond to transforming growth factor-type β (TGF- β) in vitro. J. Cell. Biol. (1987) 105, 457-463.
- RUOSLAHTI E., PIERSCHBACHER M.D.. Arg-Gly-Asp : a versatile cell recognition signal. Cell (1986) 44, 517-539.
- RYBAK S.M., VALLEE S.. Base cleavage specificity of Angiogenin with *Saccharomyces cerevisiae* and *E. Coli* 5 S RNAs. Biochemistry (1988) 27, 2288-2294.
- RYBAK S.M., YAO Q.Z., VALLEE B.L.. Angiogenin mRNA in human tumor and normal cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. (1987) 146, 1240-1248.
- SATO N., FUKUDA K., NARIUCHI H., SAGARA N.. Tumor necrosis factor inhibiting angiogenesis in vitro. JNCI (1987) 79, 1383-1391.
- SCHEIDEGGER J.J.. Une micro-méthode de l'immunoélectrophorèse. Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. (1955) 7, 103.
- SCHNEIDER R., SCHNEIDER-SCHERZER E., THURNHER M., AUER B., SCHWEIGER M.. The primary structure of human ribonuclease/angiogenine inhibitor discloses a novel highly diversified protein superfamily with a common repetitive module. EMBO J. (1988) 7, 4151-4156.
- SCHREIBER A.B., WINKLER M.E., DERYNCK R.. Transforming growth factor- α a more potent angiogenic mediator than epidermal growth factor. Science (1986) 232, 1250-1253.
- SHAPIRO R., RIORDAN J.F., VALLEE B.L.. Characteristic ribonucleic activity of human Angiogenin. Biochemistry (1986) 25, 3527-3532.
- SHAPIRO R., STRYDOM D.J., OLSON K.A., VALLEE B.L.. Isolation of Angiogenin from normal human plasma. Biochemistry (1987a) 26, 5141-5146.

- SHAPIRO R., VALLEE B.L.. Human placental ribonuclease inhibitor abolishes both angiogenic and ribonucleolytic activities of Angiogenin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1987b) 84, 2238-2241.
- SHAPIRO R., WEREMOWICZ S., RIORDAN J.F., VALLEE B.L.. Ribonucleolytic activity of Angiogenin : essential histidine, lysine and arginine residues. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1987c) 84, 8783-8787.
- SHING Y.W., KLAGSBRUN M.. Human and bovine milk contain different sets of growth factors. Endocrinology (1984) 115, 273-282.
- SPIK G., MONTREUIL J.. Rôle de la lactotransferrine dans les mécanismes moléculaires de la défense antibactérienne. Bull. Europ. Physiopath. Resp. (1983) 19, 123-130.
- SPLAWINSKI J., MICHNA M., PALCZAK R., KONTUREK S., SPLAWINSKA B.. Angiogenesis: quantitative assesement by the chick chorioallantoic membrane assay. Meth. and Find. Exptl. Clin. Pharmacol. (1988) 10, 221-226.
- SPORN M.B., ROBERTS A.B., WAKEFIELD L.M., DE CROMBRUGGHE B.. Some recent advances in the chemistry and biology of transforming growth factor- β . J. Cell. Biol. (1987) 105, 1039-1045.
- ST. CLAIR D.K., RYBAK S.M., RIORDAN J.F., VALLEE B.L.. Angiogenin abolishes cell-free protein synthesis by specific ribonucleolytic inactivation of ribosomes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1987) 84, 8330-8334.
- STRYDOM D.J., FETT J.W., LOBB R.R., ALDERMAN E.M., BETHUNE J.L., RIORDAN J.F., VALLEE B.L.. Amino-acid sequence of human tumor derived Angiogenin. Biochemistry (1985) 24, 5486-5494.
- SUGARMAN B.J., AGGARWAL B.B., HASS P.E., FIGARI I.S., PALLADINO M.A. Jr., SHEPARD H.M.. Recombinant human tumor necrosis factor- α : effects on proliferation of normal and transformed cells in vitro. Science (1985) 230, 943-947.
- TAM J.P., MARQUARDT H., ROSBERGER D.F., WONG T.W., TODARO G.J.. Synthesis of biologically active rat transforming growth factor I. Nature (1984) 309, 376-378.
- THOMAS K.A.. Fibroblast growth factors. FASEB J. (1987) 1, 434-440.
- THOMAS K.A., GIMENEZ-GALLEGO G.. Fibroblast growth factors : broad spectrum mitogens with potent angiogenic activity. TIBS (1985) 11, 81-84.
- TOWBIN H., STAHELIN T., GORDON J.. Electrophoretic transfert of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1979) 76, 4350-4354.

- VAITUKATIS J., ROBBINS J.B., NIESCHIAG E., ROSS G.T.. A method for producing specific antibodies with small doses of immunogen. J. Clin. End. (1971) 33, 988-991.
- WAGNER R.C.. Endothelial cell embryology and growth. Adv. Microcirc. (1980) 9, 45-75.
- WEINER H.L., WEINER L.H., SWAIN J.L.. Tissue distribution and developmental expression of the messenger RNA encoding Angiogenin. Science (1987) 237, 280-282.
- YEN-PATTON G.P.A., PATTON W.F., BEER D.M., JACOBSON B.S.. Endothelial cell response to pulsed electromagnetic fields : stimulation of growth rate and angiogenesis in vitro. J. Cell Physiol. (1988) 137, 37-46.
- ZANETTA J.P., BRECKENBRIDGE W.C., VINCENDON G.. An analysis of monosaccharides by gas liquid chromatography of the O-méthyl glycosides as trifluoroacetate derivatives. Application to glycoproteins and glycolipids. J. Chromatogr. (1972) 69, 291-304.
- ZICHE M., JONES J., GULLINO P.. Role of prostaglandin E1 and copper in angiogenesis. J. Natl. Cancer Inst. (1982) 69, 475.
- ZIMMERMAN S.B., SANDEEN G.. A sensitive assay for pancreatic ribonuclease. Anal. Biochem. (1965) 10, 444-449.