UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ À
L'INRS-SANTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN
SCIENCES EXPÉRIMENTALES DE LA SANTÉ

par

FRANCE GAGNON

ISOLATION DES PROTÉINES DE TRANSPORT DES SOMATOMÉDINES

AOÛT 1992

REMERCIEMENTS

Je ne peux passer sous silence les personnes qui ont su apporter leur soutien afin que je puisse mener à terme mes études de maîtrise.

Je voudrais particulièrement remercier Dr Guy R. Brisson et Dr Raynald Gareau, qui sont respectivement mes directeur et co-directeur d'étude, pour leur collaboration et leurs dispositions à favoriser mon apprentissage académique.

Je voudrais également remercier Madame Marlène Fortier, pour son appui technique, tout comme Monsieur Louis Senécal pour son assistance en informatique, de même que tous les professeurs et le personnel de l'INRS-Santé et du laboratoire d'hématologie de l'UQTR, qui ont su, de près ou de loin, m'offrir les aides théoriques, techniques et matérielles requises. Je voudrais également remercier le CRSNG et l'INRS pour leur soutien financier.

Les appuis reçus tout au long de mes études furent perçus comme des encouragements vers l'atteinte de mes objectifs, et je suis très reconnaissante pour cette source importante de motivation que vous m'avez apportée.

France Gagnon

RÉSUMÉ

L'isolation des protéines de transport des somatomédines s'inscrit dans le cadre d'une étude sur l'évaluation des effets de l'exercice physique sur ces protéines. Un essai radioimmunologique est envisagé afin de posséder une méthode de grandes spécificité et sensibilité pour le dosage des protéines de transport. Ce projet est conduit dans la perspective d'une mise au point d'une technique de dépistage d'une consommation d'hormone de croissance chez les athlètes.

Le second messager de l'hormone de croissance, la somatomédine, circule principalement sous la forme de complexes avec des protéines de transport (IGFBP). L'hormone de croissance est directement impliquée dans la régulation de l'IGFBP-3, qui est la principale protéine de transport plasmatique. L'IGFBP-1, l'autre protéine de transport retrouvée dans le plasma, est plutôt contrôlée par l'insuline et elle démontre une variation circadienne importante. Les fonctions des protéines de transport sont, dans le cas de l'IGFBP-3, le transport et le maintien des somatomédines dans les vaisseaux sanguins et, dans le cas de l'IGFBP-1, le transport des somatomédines plasmatiques vers les cellules-cibles.

L'isolation de l'IGFBP-3 fut produite à partir du plasma humain. Plusieurs étapes d'isolation s'enchaînèrent; la plus spécifique fut une chromatographie d'affinité avec une colonne sur laquelle des molécules de somatomédines furent fixées. La même chromatographie d'affinité fut effectuée lors de l'isolation de l'IGFBP-1, dont la source de départ fut le liquide amniotique humain.

Différentes analyses quantitatives et qualitatives furent appliquées afin d'évaluer les rendements et facteurs de purification au fil des étapes d'isolation, et de déterminer la pureté des protéines isolées. Bien qu'elle ne soit pas spécifique, l'épreuve quantitative utilisée pour le dosage des protéines de transport démontra une sensibilité suffisante pour mettre au point les techniques d'isolation.

La pureté des protéines isolées fut excellente. Malgré quelques impuretés, elles seront aptes à être utilisées, suite à un marquage radioactif, pour des essais radioimmunologiques.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS ii

RÉSUMÉ iii

TABLE DES MATIÈRES iv

LISTE DES ABRÉVIATIONS vii

LISTE DES TABLEAUX viii

LISTE DES FIGURES x

1. INTRODUCTION 1
- 1.1 **MISE EN SITUATION** 2
- 1.2 **L'HORMONE DE CROISSANCE** 5
  - 1.2.1 STRUCTURE DE LA GH 5
  - 1.2.2 RÉGULATION DE LA GH 7
  - 1.2.3 SENTIERS MÉTABOLIQUES DE LA GH 8
    - 1.2.3.1 ACTION DIRECTE DE LA GH 9
    - 1.2.3.2 ACTION INDIRECTE DE LA GH 10
- 1.3 **LES SOMATOMÉDINES (IGFs)** 11
  - 1.3.1 STRUCTURE DES IGFs 12
  - 1.3.2 RÉGULATION DES IGFs 13
  - 1.3.3 RÔLES DES IGFs 15
    - 1.3.3.1 ACTION DE L'IGF-I 16
    - 1.3.3.2 ACTION DE L'IGF-II 17
- 1.4 **LES PROTÉINES DE TRANSPORT DES IGFs** 18
  - 1.4.1 STRUCTURE DES IGFBPs 18
  - 1.4.2 RÉGULATION DES IGFBPs 19
    - 1.4.2.1 RÉGULATION DE L'IGFBP-3 20
    - 1.4.2.2 RÉGULATION DE L'IGFBP-1 20
  - 1.4.3 RÔLES DES IGFBPs 21
    - 1.4.3.1 RÔLE DE L'IGFBP-3 22
    - 1.4.3.2 RÔLE DE L'IGFBP-1 23
- 1.5 **HYPOTHÈSES ET BUT DU TRAVAIL** 24

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES 26
2.1 **ISOLATION DE L'IGFBP-3** 27
2.1.1 FRACTIONNEMENT DE COHN 28
2.1.2 ACIDIFICATION ET ÉLIMINATION DES IGFS 29
2.1.3 CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITÉ 30
2.1.4 HPLC EN PHASE INVERSE ET PAR FILTRATION SUR GEL 31
2.2 **ISOLATION DE L'IGFBP-1** 32
2.2.1 ULTRAFILTRATION DU LIQUIDE AMNIOTIQUE 33
2.2.2 ACIDIFICATION DE L'IGFBP-1 ET ÉLIMINATION DES IGFS 34
2.2.3 CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITÉ 35
2.2.4 HPLC EN PHASE INVERSE ET PAR FILTRATION SUR GEL 36
2.3 **ANALYSES QUANTITATIVES** 37
2.3.1 TEST DE LIAISON 37
2.3.2 DOSAGE DES PROTÉINES 39
2.4 **ANALYSES QUALITATIVES** 39
2.4.1 ÉLECTROPHORÈSE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE 40
2.4.2 TRANSFERT WESTERN 41
2.4.3 FILTRATION SUR GEL 43
2.5 **DOSAGE DE L'IGF-I** 44

2.5.1 EXTRACTION DES IGF-I 44
2.5.2 RIA DE L'IGF-I 46

3. RÉSULTATS 48
3.1 **ISOLATION DE L'IGFBP-3** 49
3.1.1 FRACTIONNEMENT DE COHN 50
3.1.2 ACIDIFICATION ET ÉLIMINATION DES IGFS 52
3.1.3 CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITÉ 54
3.1.4 HPLC EN PHASE INVERSE ET PAR FILTRATION SUR GEL 55
3.2 **ISOLATION DE L'IGFBP-1** 58
3.2.1 ULTRAFILTRATION DU LIQUIDE AMNIOTIQUE 60
3.2.2 ACIDIFICATION DE L'IGFBP-1 ET ÉLIMINATION DES IGFS 61
3.2.3 CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITÉ 62
3.2.4 HPLC EN PHASE INVERSE ET PAR FILTRATION SUR GEL 62
3.3 **ANALYSE QUANTITATIVE** 66

3.4 **DOSAGE DE L'IGF-I** 68
3.4.1 VÉRIFICATION DE L'EFFICACITÉ DE L'EXTRACTION 68
3.4.2 RIA DE L'IGF-I 70

4. DISCUSSION 71
4.1 **ISOLATION DE L'IGFBP-3** 72
4.2 **ISOLATION DE L'IGFBP-1** 77
4.3 **ANALYSE QUANTITATIVE** 80
4.4 **ANALYSES QUALITATIVES** 82
4.5 **DOSAGE DE L'IGF-I** 83
4.6 **CONCLUSION GÉNÉRALE** 85

5. RÉFÉRENCES 87

LISTE DES ABRÉVIATIONS:

ADN: Acide désoxyribonucléique
ALS: Sous-unité acido-labile
ARNm: Acide ribonucléique messager
BSA: Albumine sérique bovine
Ci: Curie
CBA: Charbon de bois activé
CPM: Coup par minute
GH: Hormone de croissance
GHBP: Protéine de transport de la GH
Hépès: [N-2-Hydroxyéthylpiperazine-N'-2-acide éthanesulfonique]
HPLC: Chromatographie liquide à haute pression
HPLC-RP: HPLC en phase inverse
IGF: Insulin-like growth factor - somatomédine
IGFBP: Protéine de transport de la somatomédine
kDa: Kilodalton
MSA: Multiplication-stimulating activity
NSILA: Nonsuppressible insulin-like activity
PM: Poids moléculaire
PP12: Protéine placentaire 12
RIA: Titration radioimmunologique
SDS: Sodium dodécylsulfate
SDS-PAGE: Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes
SFA: Sulfation factor activity
TEMED: N,N,N',N',-Tétraméthyléthylène diamine
TRIS: Tris (hydroxyméthyl) aminométhane

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Rendements et facteurs de purification des étapes de l'isolation de l'IGFBP-3. Concentration en IGF-I pour les étapes impliquant l'élimination de l'IGF. 50

Tableau II: Rendements et facteurs de purification des étapes de l'isolation de l'IGFBP-1. 59

Tableau III: Dosage en IGF-I et concentrations en IGFBP (évaluant l'interférence lors du RIA), pour la comparaison des deux méthodes d'élimination des IGFs libres pour le liquide amniotique acidifié suite à l'extraction avec les cartouches Sep-Paks. Et rendement en IGFBP-1 (milieu non-extrait) pour évaluer la récupération en IGFBP-1. 61

Tableau IV: Effet d'une acidification préalable du liquide amniotique sur le rendement en IGFBP-1 suite à la chromatographie d'affinité 62

Tableau V: Pourcentage de récupération de l'IGF-I suite à une extraction à l'aide des cartouches Sep-Pak mesuré par incubation d'^{125}I-IGF-I dans le plasma et la solution tampon sodium-phosphate 0,1 M, 0,2% BSA pH 7,5. 68

Tableau VI: Présence des IGFBPs dans les solutions d'extraction des IGFs mesurée à l'aide du test de liaison à l'^{125}I-IGF-I. 69

LISTE DES FIGURES

Figure 2.1: Étapes de la purification de l'IGFBP-3. 28

Figure 2.2: Étapes de la purification de l'IGFBP-1. 33

Figure 3.1: Courbes de filtration sur gel pour un échantillon de plasma suite à une incubation avec de l'^{125}I-IGF-I (——). Courbe de l'^{125}I-IGF-I seul (·····). Les marqueurs de PM, en kDa, sont indiqués par les barres verticales aur l'axe supérieur. V_o et V_t sont respectivement le volume mort et le volume total de la colonne. 51

Figure 3.2: Courbe de filtration sur gel suite à une incubation avec l'^{125}I-IGF-I pour l'homogénat des précipités 2 et 3 du fractionnement de Cohn dans un tampon acide (——). Courbe pour l'^{125}I-IGF-I seul (·····). (Voir Figure 3.1 pour la calibration.) 53

Figure 3.3: Courbe de filtration sur gel pour un échantillon de plasma acidifié et reneutralisé suite à l'incubation avec l'^{125}I-IGF-I (——). Courbe pour l'^{125}I-IGF-I seul (·····). (Voir Figure 3.1 pour la calibration.) 54

Figure 3.4: Courbe de l'élution de l'IGFBP-3 lors de la chromatographie en phase inverse sur HPLC. Pourcentage de liaison à l'IGF-I des éluats. 56

Figure 3.5: Révélation du gel d'électrophorèse de l'échantillon d'IGFBP-3 suite à l'HPLC en phase renversée. 57

Figure 3.6: Révélation du transfert Western par l'^{125}I-IGF-I pour les échantillons des étapes d'isolation de l'IGFBP-3: a) plasma, b) précipités 2 et 3 post-Séphadex, c) pH 6,5, d) élution affinité, e) HPLC-RP. 58

Figure 3.7: Courbe de filtration sur gel d'un échantillon de liquide amniotique suite à une incubation avec de l'^{125}I-IGF-I (——). Courbe de l'^{125}I-IGF-I seul (·····). (Voir Figure 3.1 pour la calibration.) . . . 60

Figure 3.8: Courbe d'élution de l'IGFBP-1 suite à la chromatographie en phase inverse sur HPLC. Pourcentages de liaison à l'IGF-I des éluats. 63

Figure 3.9: Courbe de l'élution de l'IGFBP-1 suite à la chromatographie en phase inverse sur HPLC avec le gradient modifié (voir section 2.2.4). 63

Figure 3.10: Courbe de filtration sur gel de l'échantillon d'IGFBP-1 obtenu suite à l'étape de chromatographie en phase inverse. 64

Figure 3.11: Révélation du gel d'électrophorèse de l'échantillon d'IGFBP-1 suite à la filtration sur gel. 65

Figure 3.12: Révélation du transfert western par l'^{125}I-IGF-I pour les échantillons des étapes d'isolation de l'IGFBP-1: a) liquide amniotique, b) liq. amn. ultrafiltré, c) élution affinité, d) HPLC-RP, e) HPLC par filtration sur gel. 66

Figure 3.13: Pourcentage de liaison à l'IGF-I en fonction du volume de liquide amniotique en dilution (1:100) dans le tampon d'incubation. . 67

Figure 3.14: Courbe de filtration sur gel de la solution d'extraction des IGFs provenant d'un échantillon de plasma ayant incubé avec de l'^{125}I-IGF-I. (Voir figure 3.1 pour la calibration.) 70

PREMIER CHAPITRE

1. INTRODUCTION

1. INTRODUCTION

Le dosage des somatomédines (IGFs) permet de diagnostiquer plusieurs anomalies métaboliques reliées à la croissance. Leurs concentrations sanguines varient en fonction de la quantité d'hormone de croissance (GH). Toutefois, ce sont les protéines de transport des IGFs (IGFBPs), elles-mêmes contrôlées par la GH, qui en assurent le maintien. Le dosage des IGFBPs peut donc apporter une indication sur la concentration de GH dans l'organisme. Outre le diagnostic et le suivi des traitements des anomalies reliées à la GH, le dosage des IGFBPs devrait permettre le dépistage d'une prise exogène et abusive de GH, telle que pratiquée par certains athlètes.

1.1 MISE EN SITUATION

Visant sans cesse à améliorer leurs performances sportives, les athlètes et leurs entraîneurs ont appris à utiliser à leur avantage les principes de la science. Outre les progrès obtenus grâce à la recherche sur les formules d'entraînement, l'alimentation et la préparation mentale, les études scientifiques ont dévoilé les possibilités offertes par le rehaussement de l'activité de certaines hormones naturelles. De là s'est répandu l'usage des stéroïdes anabolisants chez les athlètes. Dans l'espoir d'enrayer cette pratique malsaine, et surtout malhonnête, des épreuves de dépistage furent instaurées et des lois sévères énoncées pour punir les fautifs.

Afin de contourner ces interdits, les athlètes se tournent vers d'autres substances anabolisantes non détectées par les méthodes courantes de contrôle, telle la GH. Pour accroître les concentrations sanguines de GH, les athlètes utilisent deux modes principaux: l'injection de GH exogène ou encore, l'activation de la sécrétion endogène de cette hormone[50].

Avant 1986, la GH, destinée à la médication d'enfants hypophyso-déficients, provenait de l'hypophyse de cadavres humains. Cette hormone était très rare et par conséquent, dispendieuse. En 1984, la maladie virale de Creutzfeldt-Jakob provoqua plusieurs décès chez les usagers de cette forme de GH[26], diminuant ainsi le nombre d'utilisateurs. Depuis 1986, la GH humaine est fabriquée par recombinaison moléculaire. Cette GH synthétique est disponible en quantité presqu'illimitée et à prix plus accessible. Bien que la contamination virale soit écartée, la formation d'anticorps fut observée[26].

Afin de stimuler la sécrétion endogène de GH, certains athlètes font usage de drogues telles le propranolol, la vasopressine et la clonidine, mais la méthode la plus populaire est la prise de suppléments d'acides aminés[50].

Outre les dangers associés à la source de GH et des effets secondaires produits par les drogues pour en augmenter la sécrétion endogène, il existe des problèmes de santé attribués directement à l'excès de GH. La GH stimule la croissance non pas spécifiquement des muscles squelettiques, mais de tous les

organes du corps. Les symptômes de l'acromégalie, maladie hypophysaire résultante d'une hypersécrétion de GH, peuvent alors être rencontrés. Toutefois, les complications les plus sérieuses qu'une consommation abusive et prolongée de GH peut apporter sont le diabète insulino-dépendant, des dysfonctionnements thyroïdiennes, l'arthrite, et plusieurs autres[50,82].

L'incertitude est de mise quant à l'efficacité de la GH à accroître les qualités physiques. Par cette hormone, les athlètes recherchent surtout à promouvoir leur force musculaire. Bien qu'il y ait une augmentation du volume musculaire, ce développement ne serait en fait que celui des tissus conjonctifs[50].

Malgré les contestations scientifiques, les athlètes qui croient en l'efficacité de la GH continueront à en faire usage. L'effet placebo, rencontré pour toutes les drogues anabolisantes, est double pour cette hormone: il y a d'abord l'effet direct relié à la prise du supplément, auquel s'ajoute l'effet provoqué par le grossissement des muscles, créant ainsi l'illusion d'être plus fort. L'acharnement des athlètes à l'entraînement s'en trouve stimulé, d'où une augmentation véritable de leur force musculaire. La supplémentation de GH est également pratiquée dans le but de renforcer les tissus conjonctifs: l'entraînement peut alors être intensifié sans qu'apparaissent aussi fréquemment les désagréments des blessures sportives.

Que la drogue favorise réellement la performance de l'athlète ou non, son emploi est interdit pour une compétition équitable. Connaissant les lacunes des

techniques actuelles de dépistage, le doute ne peut être levé pour certains athlètes chez qui les performances, voire les transformations musculaires rapides, peuvent sembler surnaturelles. Bien qu'ils répondent négativement à toutes les épreuves de dépistage, le doute persiste. Il est important d'améliorer les méthodes de contrôle afin que cesse le discrédit injuste de certains athlètes loyaux, que les vrais usagers soient identifiés et que le sport de haut niveau reprenne son image de compétition saine et honnête.

1.2 L'HORMONE DE CROISSANCE

La GH est une hormone peptidique provenant de la glande hypophyse antérieure. Bien que sa fonction principale soit de promouvoir la croissance, tel que son nom l'indique, sa sécrétion persiste à l'âge adulte, quoiqu'en moindre quantité. Elle y tient un rôle dans la régulation de plusieurs sentiers métaboliques. La concentration en GH varie en fonction de l'état métabolique et de l'état physiologique de l'organisme; la très courte demi-vie de cette hormone lui permet un ajustement rapide de sa concentration en fonction des besoins.

1.2.1 STRUCTURE DE LA GH

L'isolation de la GH humaine à partir de l'hypophyse antérieure fut réussie pour la première fois en 1956[49]. Elle est l'hormone la plus abondante de cette

glande, qui en contient de 5 à 10 mg et en secrète environ le dixième dans une journée[63]. D'un poids moléculaire (PM) de 22 kDa, la GH est une chaîne polypeptidique simple de 191 acides aminés, reliés par deux ponts disulfures. Il existe un variant de 20 kDa qui représente de 5 à 10% de la GH totale, mais plus de 15% de la GH sérique[2]. (Cette différence de proportion tient au fait que l'épuration métabolique est plus rapide pour la GH de 22 kDa[2]).

Dans le plasma, 45% de la GH circule sous forme de complexe avec une protéine de liaison, la GH-Binding Protein (GHBP) de haute affinité (PM de 60 kDa), alors qu'environ 5% circule avec la GHBP de faible affinité (PM de 100 kDa)[1]. Toutefois, avec des concentrations plasmatiques de GH supérieures à 10-20 ng/mL, une diminution de la proportion de GH complexée est observée[3]; il se produit alors une saturation de la GHBP de 60 kDa.

La dégradation et l'élimination de la GH s'effectuent aux niveaux hépatique et rénal[5]. Le temps de demi-vie de la GH plasmatique est autour de 25 minutes lorsqu'elle est sous sa forme libre[58]. En complexe avec les GHBPs, cette demi-vie est augmentée par un facteur de dix[5]. Les GHBPs entrent en compétition avec les récepteurs hépatiques pour se lier à la GH et ainsi la maintenir dans la circulation, alors qu'au niveau rénal, la GH complexée est de trop grande dimension pour subir la filtration glomérulaire[5].

1.2.2 RÉGULATION DE LA GH

De nombreux facteurs affectent la concentration de GH dans l'organisme: l'âge, le sexe, la glycémie, l'exercice physique, l'obésité... En ce qui concerne l'âge, la sécrétion de GH est faible durant l'enfance, atteint son maximum à la puberté, diminue à la fin de l'adolescence et se maintient à un niveau stable jusqu'à l'âge d'environ 30 ans, après quoi elle subit une baisse progressive[32,69]. Par ailleurs, la sécrétion de GH reflète grandement, quoiqu'en sens inverse, la concentration plasmatique de glucose: suite à une prise alimentaire, la sécrétion est inhibée, alors qu'en état de jeûne, lors d'exercices physiques ou lors du sommeil profond, elle est stimulée[72]. Toutefois, plusieurs facteurs interviennent en plus de la glycémie. D'ailleurs, chez les diabétiques insulino-dépendants non-contrôlés, la concentration de GH demeure élevée[56]. Plusieurs autres situations pour lesquelles une forte concentration de glucose ne supprime pas la sécrétion de GH furent également étudiées[63]. L'estradiol influence aussi grandement la sécrétion de GH: une plus forte concentration de GH est observée chez la femme que chez l'homme, et elle fluctue au cours du cycle menstruel[75]. Par ailleurs, une étude a démontré qu'en supprimant les effets de l'estradiol, la concentration de GH n'est plus influencée par l'âge ou le sexe[40]. L'obésité, quant à elle, apporte une réduction générale de la GH, tant à son niveau basal que lors des sécrétions; la perte de poids ramène la concentration de GH à son niveau normal[86].

La sécrétion de GH est contrôlée principalement par l'action concertée de deux hormones hypothalamiques: la somatocrinine, qui stimule, et la somatostatine, qui inhibe[79]. La concentration de cette dernière, qui varie en sens inverse à celle de la somatocrinine, est à son tour régulée par la GH et par l'IGF-I. Il y a donc deux boucles de rétro-régulation: par la GH elle-même, et par l'IGF-I, dont la synthèse est stimulée par la GH[9,59]. L'IGF-I est aussi en mesure d'agir directement sur l'hypophyse pour inhiber la sécrétion de GH[9]. L'insuline agit également de la sorte afin de contrôler la sécrétion de GH en fonction de la glycémie[53]. Chez les diabétiques non-contrôlés, l'absence d'insuline serait la cause de la concentration élevée en GH malgré l'hyperglycémie, alors que chez les obèses, le niveau élevé d'insuline expliquerait la faible concentration de GH[63].

1.2.3 SENTIERS MÉTABOLIQUES DE LA GH

Afin d'exercer son rôle, soit de stimuler la croissance, la GH contrôle positivement plusieurs sentiers anaboliques. Elle agit soit d'une manière directe au niveau cellulaire, ou encore d'une manière indirecte en stimulant la synthèse d'un facteur de croissance, l'IGF-I.

Quel que soit le mode d'action de la GH, les récepteurs impliqués semblent être les mêmes. Ils sont distribués dans plusieurs tissus, dont les muscles, mais ils sont surtout retrouvés au niveau du foie[68]. Ce récepteur est une protéine glycosylée

de 130 kDa qui comporte trois composantes: extracellulaire, transmembranaire et cytoplasmique[48]. La partie extracellulaire est celle qui reconnait et lie la GH et elle possède les mêmes caractéristiques que la GHBP de 60 kDa. Cette dernière est en fait un dérivé du récepteur[1]. Conséquemment, l'absence de récepteur de GH, caractérisant le syndrome du nanisme, est accompagnée d'une absence de la GHBP de 60 kDa[4].

1.2.3.1 ACTION DIRECTE DE LA GH

Suite à des études avec des injections de GH *in vivo*, il fut démontré que l'élévation de GH induit un état de résistance à l'insuline au stade post-récepteur, sans toutefois affecter la sécrétion d'insuline en réponse à l'hyperglycémie[14]. La GH apporte une diminution de l'oxydation du glucose et des protéines en stimulant la mobilisation des lipides à partir des tissus adipeux et leur oxydation[50]. Une concentration élevée en GH, telle que retrouvée en état de jeûne, favoriserait l'utilisation de la graisse corporelle, réduisant ainsi le catabolisme musculaire. Une administration de GH chez des individus obèses soumis à une diète rationnée a apporté une réduction de la perte de tissus adipeux, comparativement à la même diète sans GH[19]. Une situation similaire se produit lors d'activités physiques, apportant ainsi des changements dans les pourcentages de graisse et de masse musculaire chez les athlètes[72]. Les hypophyso-déficients obtiennent des résultats analogues lors de traitements à la GH[80].

La synthèse protéique est grandement stimulée par la GH. Les mécanismes impliqués dans l'expension des tissus musculaires diffèrent selon que la stimulation soit apportée par l'exercice physique, qui active la sécrétion de GH endogène, ou par une source externe de GH[50]. Un traitement à la GH augmente la production protéique en stimulant la traduction des ARNm existants, alors que l'exercice induit la synthèse de nouveaux ARNms[50].

1.2.3.2 ACTION INDIRECTE DE LA GH

Salmon et Daughaday furent les premiers à émettre l'hypothèse que les effets de la GH seraient communiqués aux cellules par un facteur de sulfatation[71]. C'est en étudiant l'incorporation du sulfate ($^{35}SO_4$) au niveau des cartilages, par des expériences ***in vitro***, qu'ils ont observé plusieurs éléments du mécanisme: l'incorporation de sulfate est réduite chez des rats hypophysectomisés, mais une administration ***in vivo*** de GH la restaure; l'incorporation est stimulée par un facteur de sulfatation présent dans le sérum de rats normaux; et l'administration de GH induit ce facteur de sulfatation chez les rats hypophysectomisés[71].

La synthèse de l'IGF-I se situe surtout au niveau du foie. En plus d'être un second messager, l'IGF-I prolonge l'effet de la GH puisque son temps de demi-vie est beaucoup plus grand que celui de la GH, 20 heures comparativement à 25 minutes[11]. Bien que l'IGF-I soit le second messager de la GH, il doit être

accompagné par la GH pour stimuler la croissance[63]. La stimulation de la croissance osseuse par la GH est beaucoup plus forte qu'avec une injection d'IGF-I, mais l'effet de la GH est bloqué par un antisérum contre l'IGF-I[63]. Les signes du vieillissement seraient dus à une réduction de l'IGF-I en réponse à la concentration de GH qui diminue avec l'âge[29]. Des signes de vieillissement sont d'ailleurs observés chez les enfants hypophyso-déficients[50].

1.3 LES SOMATOMÉDINES (IGFs)

Les somatomédines, dont le nom officiel est "Insulin-like Growth Factor" (IGF), font partie d'une classe de protéines plurifonctionnelles. Cette diversité dans leurs fonctions s'illustre par les nombreux noms qui leurs furent attribués: Salmon et Daughaday (1957) les ont baptisés "Sulfation Factor Activity" (SFA) suite à leurs études sur l'incorporation du sulfate dans les cartilages[71]; Froesch et al (1963), lors de la découverte d'un facteur sérique dont l'activité insulinique n'était pas inhibée par des anticorps contre l'insuline, les ont appelés "Nonsuppressible Insulin-like Activity" (NSILA)[30]; et quelques années plus tard, Pierson et Temin (1972) découvrirent un facteur sérique induisant la multiplication cellulaire et le nommèrent "Multiplication-Stimulating Activity" (MSA)[60]. En 1972, le terme "somatomédine" a remplacé SFA[23]. Et ce n'est qu'en 1987, suite à de nombreuses études structurales et génétiques ayant révélé le caractère commun de ces protéines, que le nom "IGF"

fut choisi pour les désigner[22].

Plusieurs types d'IGFs furent identifiés, principalement l'IGF-I et l'IGF-II, mais il existe des variantes pour chacun, avec des fonctions différentes dans l'organisme. La GH est un important facteur dans la régulation des IGFs, mais l'état physiologique influence grandement. Les IGFs agissent soit de manière auto/paracrine, ou encore endocrine. Leurs rôles et structures diffèrent selon leur mode d'action. Puisque ce sont les IGFs endocriniens qui sont présents dans la circulation, ce sont surtout d'eux dont il sera question dans ce texte. Outre le plasma, les IGFs sont retrouvés dans la lymphe, le liquide céphalo-rachidien, le liquide amniotique, le lait, le sperme, l'urine et la salive[17].

1.3.1 STRUCTURE DES IGFs

La structure des IGFs se rapproche de celle de la proinsuline, tant au point de vue de la séquence en acides aminés que par la structure tridimensionnelle. Les IGF-I et IGF-II démontrent 62% d'homologie entre eux, alors que 43 et 41% d'homologie sont respectivement observés entre les boucles A et B de chaques IGFs et celles de la proinsuline[65,66]. L'IGF-I a son gène sur le chromosome 12, alors que l'IGF-II a le sien sur le chromosome 11, contigu à celui de la proinsuline[8]. Un même gène ancestral serait à l'origine des IGFs et de l'insuline[65].

Constituée d'une seule chaîne polypeptidique de 70 acides aminés, avec trois ponts disulfures, l'IGF-I a un PM de 7 649 Da[65]. Sa concentration sérique chez l'adulte est de 150 ng/mL[28]. La synthèse de l'IGF-I se fait principalement au niveau du foie, mais aussi dans d'autres tissus[24]. Ce sont surtout les IGF-I provenant du foie qui tiennent le rôle endocrinien et se lient aux protéines vectrices du plasma[24]. Quant à ceux provenant des autres tissus, qui agissent surtout de manière auto/paracrine, leur structure est tronquée comparativement aux IGF-I hépatiques, de sorte qu'ils ont une très faible affinité pour les IGFBPs[73].

L'IGF-II est une chaîne polypeptidique simple de 67 acides aminés, comportant elle aussi trois ponts disulfures, avec un PM de 7 471 Da[66]. Sa concentration sérique chez l'adulte est de 590 ng/mL[28]. Tout comme les IGF-I, ils sont synthétisés au niveau du foie et dans d'autres tissus[68].

1.3.2 RÉGULATION DES IGFs

Les IGF-I et IGF-II sont régulés de manières différentes. L'IGF-I dépend surtout du taux sérique de GH, alors que l'IGF-II n'en dépend que très peu mais est surtout influencé par l'état nutritionnel. Toutefois, celui-ci influence la concentration sérique de GH, d'où une régulation indirecte de l'IGF-I par l'état nutritionnel. La liaison des IGFs aux protéines de transport en augmente grandement le temps de demi-vie[11]. Des études ont montré que ces protéines de transport ont également un

rôle dans la régulation de l'action des IGFs sur les cellules[18]. De ce fait, la concentration sérique d'IGFs ne peut être révélatrice par elle-même de l'activité physiologique qu'elle module. La dégradation des IGFs est produite par deux systèmes enzymatiques rénaux, dont un serait spécifique aux IGFs alors que l'autre éliminerait également l'insuline[25].

En étant directement dépendante de la GH, la concentration plasmatique de l'IGF-I est faible à la naissance, augmente pendant l'enfance avec un pic à la puberté pour ensuite diminuer avec l'âge[31]. Toutefois, une alimentation adéquate, autant dans la quantité d'énergie que dans l'apport protéique, est essentielle pour que l'IGF-I réflète la concentration de GH[54]. Bien que la GH soit élevée en état de jeûne et que cette hormone régule positivement la synthèse de l'IGF-I, le niveau d'IGF-I circulant est faible en état de jeûne ou de malnutrition[81]. Une injection de GH chez des sujets à jeûn n'augmente point la quantité d'IGF-I circulant[54].

Dans les pathologies reliées à la GH, la concentration d'IGF-I suit celle de la GH, soit une forte concentration chez l'acromégale (deux à quatre fois la normale), et une très faible chez l'hypophyso-déficient (environ 30% de la valeur usuelle)[28]. Mais, encore ici, la concentration en IGF-I dépend de l'état physiologique. Dans le cas du syndrome de Laron, pathologie impliquant une absence ou un dysfonctionnement des récepteurs de GH, la concentration de GH est élevée mais celle de l'IGF-I est faible[91]. Les individus souffrant de cirrhose

hépatique ont également de très faibles concentrations d'IGF-I, la production de ceux-ci s'effectuant au niveau du foie[91].

La synthèse de l'IGF-II n'est pas aussi finement contrôlée par la GH que celle de l'IGF-I. La concentration d'IGF-II est faible avant la naissance, et elle augmente par la suite[36]. Par ailleurs, elle dépend beaucoup de la nutrition, et elle est faible en état de jeûne ou de malnutrition[34].

1.3.3 RÔLES DES IGFs

Les IGFs interviennent dans la régulation de la croissance et de la régénération cellulaire afin de les adapter en fonction de l'état physiologique. Leurs actions auto/paracrines sont nécessaires pour la régénération cellulaire, principalement dans les processus de guérison pour lesquels elle est spécifique au tissus blessé[73], alors que leurs actions endocrines sont davantage reliées à la croissance. Toutefois, un chevauchement existe entre les fonctions des deux types: tous les IGFs sont en mesure de se lier aux mêmes récepteurs cellulaires[73]. L'action ***in vivo*** des IGFs diffère selon le mode d'injection: une injection intraveineuse entraîne des effets insuliniques, alors qu'une administration sous-cutanée à long terme induit la croissance[90].

1.3.3.1 ACTION DE L'IGF-I

L'IGF-I exerce son action sur les cellules pourvues des récepteurs d'IGFs de type 1. Ce récepteur est très homologue à celui de l'insuline[34]. D'ailleurs, l'IGF-I se lie également à ce dernier, mais avec une affinité moindre sur une base molaire[34]. De manière réciproque, l'insuline est en mesure de s'attacher aux récepteurs d'IGFs de type 1, mais avec le centième de l'affinité de l'IGF-I[17].

Le récepteur d'IGFs de type 1 possède quatre sous-unités, formées de deux paires de glycoprotéines, β-α-α-β, reliées entre elles par des ponts disulfures. La partie extracellulaire (les sous-unités α et une partie des β), possède le site de liaison, alors que la réponse est transmise par une activité tyrosine-kinase de la partie intracellulaire (β), qui induit ainsi une autophosphorylation[57].

Comme il est en mesure de se lier aux récepteurs d'insuline, une infusion massive d'IGF-I cause une hypoglycémie[89]. Dans les tissus adipeux et musculaires, l'IGF-I stimule le transport du glucose et son métabolisme[73]. L'IGF-I induit également l'influx du Ca^{2+}, tel qu'observé dans des fibroblastes[46]. Mais la véritable fonction de l'IGF-I est de stimuler la synthèse d'ADN, d'ARN et de protéines et la réplication cellulaire[63]. Il est un facteur de progression agissant dans la phase de la synthèse d'ADN du cycle cellulaire, pour les cellules rendues compétentes par d'autres facteurs de croissance[63].

1.3.3.2 ACTION DE L'IGF-II

L'IGF-II a un récepteur cellulaire différent de celui de l'IGF-I, soit le récepteur d'IGFs de type 2, qui a une structure homologue à celle du récepteur du mannose-6-phosphate cation-indépendant bovin, quoiqu'aucune fonction similaire ne fut observée entre les deux ligands; ils ont des sites de liaison différents sur le récepteur[13]. Un effet synergique est probable entre les deux ligands[73]. L'IGF-II est également en mesure de se lier au récepteur de type 1 (avec trois fois moins d'affinité que l'IGF-I), tout comme au récepteur de l'insuline. L'inverse est réputé être vrai pour l'IGF-I (avec une affinité moindre), mais pas pour l'insuline. En ce qui concerne l'IGF-I, il fut observé qu'une augmentation du nombre de récepteurs de type 2 avec un IGF fixé à son site de liaison se produit en présence d'un excès d'IGF-I. Toutefois, cette augmentation peut être due au fait que les IGF-I, en excès, provoquent un déplacement des IGF-II des récepteurs de type 1. Ces derniers iraient alors se lier aux récepteurs de type 2. La démonstration de la spécificité du récepteur d'IGF de type 2 fut produite par Tally et collaborateurs, qui ont saturé les récepteurs de type 1 par l'insuline et n'ont observé que très peu de réactions croisées[78]. D'ailleurs, la même équipe a rapporté qu'aucune réaction croisée de l'IGF-I sur les récepteurs de type 2 ne se produit chez les cellules dépourvues de récepteurs de type 1[78].

De par son affinité pour les récepteurs d'IGFs de type 1 et d'insuline, l'IGF-II partage plusieurs rôles avec l'IGF-I: en plus d'une hypoglycémie suite à une infusion aiguë, il stimule la synthèse de l'ADN et la prolifération cellulaire, et est lui aussi un facteur de progression pour les cellules compétentes[63]. A la différence de l'IGF-I, l'IGF-II aurait également un rôle au niveau du système nerveux central, soit en tant que neuropeptide ou de régulateur de la croissance neurale[76].

1.4 LES PROTÉINES DE TRANSPORT DES IGFs

Les IGFs plasmatiques se retrouvent presqu'exclusivement en complexe avec des IGFBPs. La majorité des IGFs circulent en complexe avec l'IGFBP-3, dont le rôle principal est l'emmagasinage des IGFs, alors qu'environ 1% des IGFs sont liés à l'IGFBP-1[34], qui est en mesure de transporter les IGFs vers les cellules. La GH et l'état métabolique sont fortement impliqués dans la régulation des IGFBPs. Les IGFBPs sont présentes dans le plasma, le foie, le liquide céphalo-rachidien, le liquide amniotique, le lait et le sperme[17].

1.4.1 STRUCTURE DES IGFBPs

Plusieurs types d'IGFBPs furent identifiés: les deux formes principales sont l'IGFBP-1, de 28-35 kDa, et l'IGFBP-3, de 53 kDa. L'IGFBP-1, composé de 234 acides aminés, se retrouve surtout en forme insaturée dans le plasma[62]. Elle est

identique à la protéine placentaire 12 (PP12) et est reconnue par les anticorps agissant contre cette dernière[62]. L'IGFBP-1 contient la séquence d'acides aminés Arg-Gly-Asp qui lui permet d'interagir sur les surfaces cellulaires[21]. Elle présente 33% d'homologie avec l'IGFBP-3[21], qui comporte 264 acides aminés et est glycosylée[87]. L'IGFBP-3 circule dans le plasma sous la forme d'un complexe avec d'autres composantes. Elle est accompagnée d'une sous-unité acido-labile (ALS) et d'une molécule d'IGF. Le complexe a un PM total de 150 kDa. La molécule d'IGF semble être nécessaire pour l'union des sous-unités du complexe. Celui-ci se dissocie en condition acide, ou encore en condition neutre par les enzymes protéolytiques ou par l'héparine[19]. L'isolation du complexe de 150 kDa n'a jamais été réussie. Toutefois, les anticorps qui sont en mesure de reconnaître la sous-unité de 53 kDa, soit l'IGFBP-3, sont également en mesure de reconnaître le complexe en entier[52]. Il est d'usage d'utiliser cette sous-unité pour bâtir un essai radioimmunologique pour le dosage du complexe de 150 kDa.

1.4.2 RÉGULATION DES IGFBPs

Les IGFBPs sont synthétisés au niveau du foie, et dans d'autres tissus[38]. L'IGFBP-3 est strictement GH-dépendante alors que l'IGFBP-1 est GH-indépendante, mais elle est dépendante de l'insuline. Des variations avec l'âge sont observées pour les deux types d'IGFBPs[7,35]. Comme les IGFBPs tiennent un grand rôle dans la régulation de l'activité des IGFs, leur régulation est très importante.

1.4.2.1 RÉGULATION DE L'IGFBP-3

Bien qu'elle y soit dépendante, la concentration de l'IGFBP-3 n'est pas modulée aussi finement que celle de la GH. Elle varie en fonction de l'âge, avec un pic à la puberté[7], tout comme la GH, mais son niveau demeure plutôt stable au cours de la journée[88], contrairement à la GH. La concentration journalière moyenne de GH serait le régulateur de la concentration d'IGFBP-3.

Les hypophyso-déficients ont des concentrations d'IGFBP-3 diminuées de 50 à 80% comparativement à la normale, alors que chez les acromégales, cette concentration est plus du double de la normalité[7,37]. La proportion d'IGFBP-3 auquelle un IGF est lié varie en fonction de la concentration d'IGFs. Ainsi, entre 70 et 90% des IGFBP-3 sont en complexe lorsque la concentration en IGF-I est au-dessus de 80 ng/mL et celle de l'IGF-II au-dessus de 450 ng/mL[37]. Avec des concentrations moindres, la proportion d'IGFBP-3 lié à un IGF tombe sous les 50%. Une mince marge de transition entre l'IGFBP-3 majoritairement en complexe et celle en forme libre suggère une coopération positive dans l'assemblage des sous-unités[37].

1.4.2.2 RÉGULATION DE L'IGFBP-1

L'IGFBP-1 est principalement régulée par l'insuline. L'état métabolique et la diète inflige à cette protéine de transport une variation circadienne. Chez l'adulte, la concentration atteint un pic nocturne (10-20 fois plus important) entre minuit et

6 heures. Ce pic n'est pas relié à la GH, mais plutôt inversement lié au niveau d'insuline[6]. Une collation de fin de soirée empêche l'apparition de ce pic nocturne[73], alors qu'en état de jeûne, la concentration d'IGFBP-1 demeure à un niveau élevé[88]. Par ailleurs, une augmentation de cette concentration est observée lors d'activités physiques prolongées[77].

Le pic nocturne est plus prononcé chez l'enfant; le niveau d'IGFBP-1 matinal est plus élevé à la naissance et il diminue avec l'âge. Dans les états pathologiques, l'IGFBP-1 est à un niveau plus élevé chez les hypophyso-déficients, chez les anorexiques ainsi que chez les diabétiques insulino-dépendants non-traités[35,42]. Dans ce dernier cas, une infusion d'insuline entraîne une baisse du niveau d'IGFBP-1, et cette diminution se fait avec un temps de demi-vie de 60-90 minutes, indiquant qu'il n'est pas en rapport direct avec la glycémie[15]. Dans les cas d'acromégalie, d'hyperinsulinisme et d'obésité extrême, l'IGFBP-1 demeure à un faible niveau[37,84].

1.4.3 RÔLES DES IGFBPs

Le système des protéines de transport des IGFs permet de maintenir une concentration adéquate d'IGFs dans le plasma, et également de contrôler leur sortie du lit capillaire. Les deux IGFBPs étudiées ont des rôles différents et complémentaires afin de réguler l'action des IGFs.

1.4.3.1 RÔLE DE L'IGFBP-3

Le rôle de l'IGFBP-3 ne se limite pas qu'au transport des IGFs, mais également à l'augmentation de leurs temps de demi-vie. Les IGFs ont un temps de demi-vie équivalant à celui de l'insuline quand ils sont sous forme libre dans le plasma, soit d'environ 20 minutes, alors qu'en complexe avec l'IGFBP-3, leur temps de demi-vie augmente jusqu'à 13-20 heures[11]. Aucune glande de l'organisme ne stoke les IGFs, pas plus que les hépatocytes n'ont démontré cette capacité[17], d'où l'évolution de l'IGFBP-3 avec la nécessité d'un approvisionnement constant et suffisant en IGFs. D'ailleurs, la quantité d'IGFs (IGF-I et IGF-II) dans l'organisme est beaucoup plus grande que ses besoins le nécessitent, et elle est approximativement équimolaire à la quantité d'IGFBP-3, autant lors de conditions métaboliques normales qu'en situations de déficience[12]. Comme la régulation de l'IGFBP-3 se fait par la GH, à qui est également attribuée la régulation de l'IGF-I, cette dernière ne serait en fait que la conséquence de la première, puisque l'IGFBP-3 augmente considérablement le temps de demi-vie de l'IGF-I[41].

Lorsque les IGFs sont liés à l'IGFBP-3, leur activité est inhibée. Toutefois, le site de fixation aux IGFBP-3 n'est pas le même que celui aux récepteurs, et aucune structure primaire similaire n'apparaît entre les deux. Le mode de libération biologique de la sous-unité d'IGF n'est pas connu. Le fait qu'elle soit libérée en présence de substances analogues à l'héparine ou en condition acide permettrait un

approvisionnement rapide en IGFs lors de dommages cellulaires locaux, pour ainsi supplémenter la production auto/paracrine d'IGFs[18].

1.4.3.2 RÔLE DE L'IGFBP-1

L'IGFBP-1 a un rôle plus complexe que l'IGFBP-3, d'où une régulation plus sensible. Étant en mesure de quitter les vaisseaux sanguins, elle agit comme transporteur des IGFs du sérum vers les cellules-cibles. Cette protéine est également très répandue dans les tissus, et elle est largement insaturée[62]. En plus de son rôle de transporteur, elle agirait également en tant que modulateur de l'action des IGFs sur les tissus[18]. Toutefois, il y a des contradictions à savoir si l'IGFBP-1 agit comme activateur ou comme inhibiteur. Des études ***in vitro*** ont démontré que l'IGFBP-1 stimule la synthèse de l'ADN de fibroblastes en modulant la liaison de l'IGF-I aux cellules-cibles, ce qui apporte une augmentation du nombre de cellules[27]. Par ailleurs, deux IGFBP-1 isolées à partir du liquide amniotique et ayant le même PM et la même séquence N-terminale pour 28 résidus, ont démontré, dans un cas, une stimulation de la synthèse d'ADN, et dans l'autre, une atténuation[16]. D'autres études ont démontré une inhibition de la liaison et de l'action des IGF-I par l'IGFBP-1[67,70].

Une forte concentration plasmatique d'IGFBP-1 est observée dans les conditions métaboliques où la croissance est inhibée, telles qu'en état de jeûne, de

diabète ou de déficience en GH. Une forte concentration sérique implique un faible transport, et conséquemment, très peu d'IGFs aux récepteurs des cellules-cibles[34]. En situation favorable à la croissance, une faible concentration plasmatique d'IGFBP-1 suggère qu'une grande quantité d'IGF est à la disposition des cellules, et la protéine de transport pourrait ou non être un facteur régulateur. L'insuline aurait un rôle important dans la régulation de la sortie vasculaire du complexe IGFBP-1 - IGF[34].

1.5 HYPOTHÈSES ET BUT DU TRAVAIL

Dans l'éventualité d'utiliser le dosage des IGFBPs pour le dépistage d'une consommation de GH par les athlètes, il importe de vérifier les principaux facteurs affectant leurs concentrations. Les effets d'une consommation élevée de GH doivent être étudiés: en principe, la concentration d'IGFBP-3 devrait être augmentée proportionnellement à celle de la GH. Toutefois, dans le cas de l'IGFBP-1, les variations circadiennes seraient maintenues et la GH ne devrait pas l'affecter.

Les effets qu'apportent l'activité physique sur les IGFBPs doivent être considérés sur deux plans: les effets à long terme de l'entraînement régulier, et les effets aigus d'un effort physique intense. L'entraînement régulier devrait être accompagné d'une concentration en IGFBP-3 plus élevée que chez une personne sédentaire puisque l'activité physique stimule la sécrétion de la GH[75] et que la

concentration d'IGFBP-3 varie en fonction de la concentration journalière moyenne de GH. Toutefois, cette augmentation devrait être plus considérable en début de programme d'entraînement, puisque l'augmentation de la concentration de GH suite à un exercice physique est plus élevée chez une personne non-entraînée que chez celles entraînées, et ce, pour une même intensité d'effort[75]. Quant aux effets aigus de l'activité physique, la concentration d'IGFBP-3, qui ne subit que très peu de fluctuations journalières[88], ne devrait pas être affectée. Dans les mêmes conditions, la concentration sérique d'IGFBP-1, qui est contrôlée par l'insuline dont la concentration chute en situation d'effort[55], devrait au contraire être augmentée. Cette hypothèse fut d'ailleurs vérifiée par Suikkari[77]. Les effets combinés de l'exercice physique et d'une consommation de GH doivent également être étudiés.

Pour suivre judicieusement les concentrations d'IGFBPs dans les différentes situations énumérées ci-haut, leurs dosages doivent être effectués par une méthode spécifique et sensible. La radioimmunologie (RIA) s'est avérée la méthode de choix. Le but du présent travail est de mettre au point les techniques d'isolation des IGFBP-1 et IGFBP-3, pour qu'elles soient éventuellement utilisées comme antigènes radioactifs de leur RIA respectif.

DEUXIÈME CHAPITRE

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les isolations des IGFBP-1 et IGFBP-3 ont nécessité de nombreuses étapes. En vue de contrôler l'efficacité de chacune d'entre elles, des analyses quantitatives furent effectuées pour calculer les rendements et facteurs de purification. La pureté des protéines isolées fut évaluée par des analyses qualitatives. Le dosage de l'IGF-I a également apporté une évaluation de l'efficacité de certaines étapes.

2.1 ISOLATION DE L'IGFBP-3

La source de départ pour l'isolation de l'IGFBP-3 fut le plasma humain dans lequel cette protéine circule sous la forme du complexe de 150 kDa. Les étapes de cette purification, effectuée selon la méthode de Martin et Baxter[51], sont présentées à la Figure 2.1. Il y eut d'abord un fractionnement de Cohn du plasma. Les fractions contenant l'IGFBP-3 furent regroupées puis acidifiées. Cette acidification permettait une dissociation du complexe, afin de libérer les IGFBP-3, tout comme les IGFs. Ces derniers furent éliminés et le milieu reneutralisé. L'IGFBP-3 demeure ainsi libre et peut alors se lier à l'IGF-I fixé au gel d'agarose formant la colonne d'affinité. Suite à cette chromatographie d'affinité, l'IGFBP-3 fut purifiée davantage par une chromatographie en phase inverse sur HPLC.

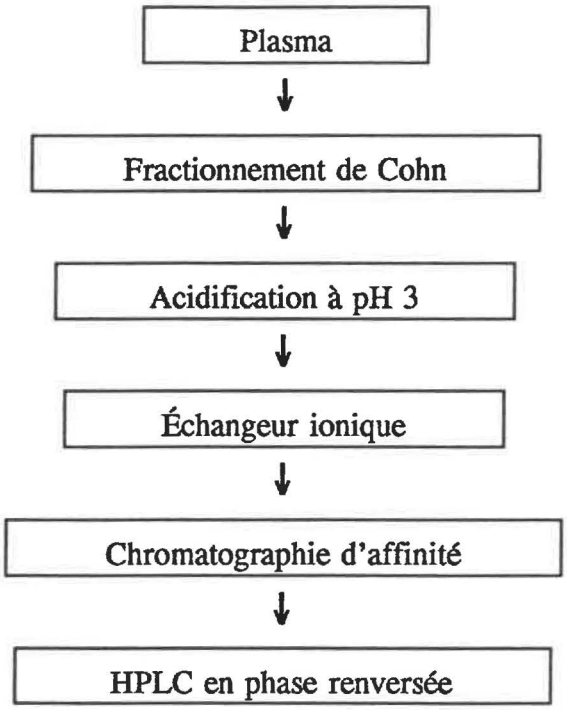

Figure 2.1: Étapes de la purification de l'IGFBP-3.

2.1.1 FRACTIONNEMENT DE COHN

Le fractionnement de Cohn permet de séparer les différentes protéines du plasma en tenant compte de leur solubilité en fonction de la concentration en éthanol et du pH du milieu[85]. L'IGFBP-3 se retrouve surtout dans les précipités IV-1 et IV-4[51]. Ce fractionnement de Cohn fut adapté pour l'isolation de l'IGFBP-3; certaines étapes furent regroupées pour n'en obtenir que trois. Les étapes s'enchaînèrent en utilisant le surnageant de l'étape précédente. À la première étape, la concentration en éthanol (Accusolv) fut amenée graduellement à 25% tout en maintemant le pH à

7. Dans la seconde étape, seul le pH varia en étant abaissé à 5,2. Et enfin dans la troisième, la concentration en éthanol fut graduellement augmentée jusqu'à 40%, et le pH ajusté à 5,8. Lors de chaque étape, il y eut incubation de la solution à -5°C pendant 1h30 pour les deux premières étapes et pendant 4 heures pour la troisième. Ces incubations furent terminées par une centrifugation à 2000 g pendant 15 minutes.

2.1.2 ACIDIFICATION ET ÉLIMINATION DES IGFS

Les précipités des deuxième et troisième étapes du fractionnement de Cohn furent regroupés puis homogénéisés dans une solution d'acide acétique (Fisher Sci.) 2 M, NaCl (Mallinckrodt) 75 mM, pH 3. La sous-unité de 53 kDa, qui est celle permettant la liaison à l'IGF, se retrouve alors libre dans le milieu. Pour faire en sorte qu'elle le demeure, les IGFs sont éliminés. Ceux-ci pourraient, lors de la reneutralisation, se lier de nouveau à l'IGFBP-3, empêchant ainsi une bonne affinité de cette protéine à l'IGF-I de la colonne d'affinité. Pour éliminer les IGFs, le milieu fut incubé pendant 72 heures à 22°C en présence d'un échangeur ionique, le Sulfopropyl-Séphadex C-25 (Sigma). Une incubation avec de l'^{125}I-IGF-I (Amersham) ajouté au plasma a permis d'évaluer l'efficacité d'élimination des IGFs. Elle fut également évaluée par le dosage de l'IGF-I avant et après l'incubation.

2.1.3 CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITÉ

Avant de circuler dans la colonne d'affinité, la solution d'IGFBP-3 subit un accroissement du pH. Suite à une première augmentation jusqu'à pH 4, une centrifugation à 3000 g pendant 30 minutes apporta la précipitation d'une grande quantité de protéines, rendant la solution limpide. Le pH fut ensuite ajusté à 6,5 afin d'optimiser l'affinité de l'IGFBP-3 pour l'IGF-I de la colonne d'affinité.

La colonne utilisée pour la chromatographie d'affinité était formée d'un gel d'agarose auquel de l'IGF-I avait été fixé. Trois grammes d'Affigel-10 (Bio-Rad), préalablement rincé tel que recommandé par le fabriquant, et 1,5 mg d'IGF-I (Bachem) furent incubés sous agitation pendant 4 heures à 4°C dans un tampon Na-Hépès (Sigma) 0,1 M pH 7,7. Les sites du gel demeurés libres furent bloqués avec de l'éthanolamine-HCl (Aldrich) 1 M pH 8,0. Le gel fut transféré dans une colonne de 1 cm de diamètre par 19 cm de hauteur, pour ensuite être rincé successivement avec des solutions de Na-Hépès 0,1 M (1 L), Na_2HPO_4 (Sigma) 50 mM - NaCl 0,5 M pH 6,5 (100 mL), et acide acétique 0,5 M pH 3 (100 mL), qui sont respectivement les solutions de rééquilibrage de la colonne, de lavage, et d'élution. La colonne fut ensuite rééquilibrée. L'efficacité de la liaison de l'IGF-I au gel d'agarose fut évaluée par dosage radioimmunologique de l'IGF-I dans les différents solutions recueillies suite à l'incubation et aux lavages du gel.

La solution d'élution fut remplacée par le formate (Fisher Sci.) 0,2 M en raison d'un mauvais rendement d'élution avec la solution utilisée par Martin et Baxter[51]. La chromatographie d'affinité se déroulait toujours dans le même ordre: solution contenant l'IGFBP à isoler, lavage (environ 100 mL), élution (environ 50 mL) et rééquilibrage (au moins 200 mL). La vitesse d'élution de la colonne était d'environ 50 mL/h, et cette chromatographie se faisait à 4°C. Comme le volume d'élution était très grand, il dut être concentré avant de passer à l'étape suivante. Cette concentration se faisait par ultrafiltration sur une membrane PM10 (Amicon), qui laisse passer les molécules de poids moléculaires plus petits que 10 kDa. Les autres molécules, dont l'IGFBP-3, demeuraient théoriquement dans le liquide au-dessus de la membrane, qui était recueilli. Une évaporation à l'azote permettait ensuite une réduction supplémentaire du volume.

2.1.4 HPLC EN PHASE INVERSE ET PAR FILTRATION SUR GEL

La purification de l'IGFBP-3 fut complétée par une chromatographie en phase inverse sur HPLC de la solution obtenue suite à l'élution de la chromatographie d'affinité, dont l'acide formique fut évaporé ainsi qu'un grande quantité d'eau. La colonne utilisée fut la Hi-Pore 318 (BioRad), dont les chaînes hydrophobes contiennent 18 carbones. Un gradient d'acétonitrile (Caledon) de 15 à 60% en 30 minutes, contenant 0,1% d'acide trifluoroacétique (TFA) (Baker), à une vitesse de 1,5 mL/min permit l'élution des protéines. Des analyses quantitatives furent

effectués sur les fractions recueillies à la sortie de la colonne afin de déterminer le temps d'élution de l'IGFBP-3.

En vue d'améliorer la pureté de l'IGFBP-3, une filtration sur gel fut mise à l'essai. L'échantillon recueilli suite à l'HPLC fut évaporé sous jet d'azoote, et resolubilisé dans la solution d'élution de la filtration sur gel. La colonne Protein Pak sw300 (Waters) fut utilisée sur HPLC, avec la solution tampon phosphate de sodium 0,1 M - phosphate de potassium (Fisher Sci.) 0,1 M pH 7,0, à une vitesse de 0,5 mL/min. La colonne fut calibrée avec les protéines suivantes: thyroglobuline (670 kDa), γ-globuline (158 kDa), ovalbumine (44 kDa), myoglobine (17 kDa) et cyanocobalamine (1,35 kDa) (Bio-Rad).

2.2 ISOLATION DE L'IGFBP-1

L'IGFBP-1, la petite protéine de transport des IGFs, fut isolée à partir du liquide amniotique humain en se basant sur la méthode de Baxter et al[7]. Le liquide amniotique fut obtenu grâce à la collaboration du docteur Gilles Brisson de l'hôpital Ste-Justine de Montréal. Les étapes successives de l'isolation sont présentées à la figure 2.2. Le liquide amniotique fut d'abord ultrafiltré, puis dilué dans une solution tampon phosphate, laquelle avait préalablement servi au rinçage de la membrane ultrafiltrante. Cette solution traversa la colonne d'affinité. Lorsqu'élués, les

IGFBP-1 furent purifiés davantage par une chromatographie en phase inverse sur HPLC et une filtration sur gel.

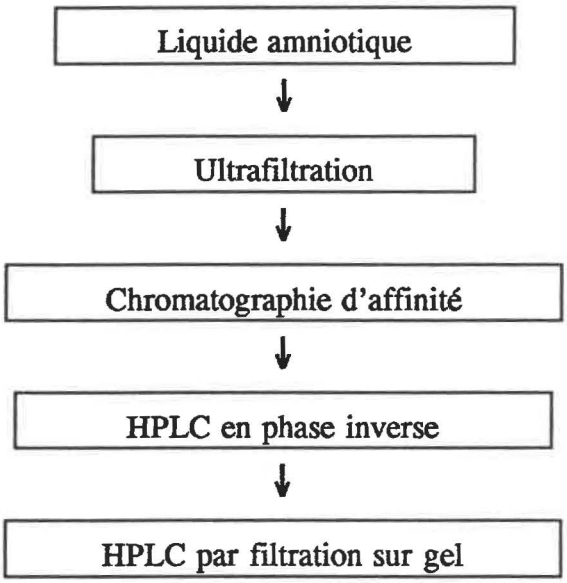

Figure 2.2: Étapes de la purification de l'IGFBP-1.

2.2.1 ULTRAFILTRATION DU LIQUIDE AMNIOTIQUE

Une étape d'ultrafiltration fut ajoutée à la méthode de Baxter dans le but d'éviter un engorgement de la colonne d'affinité par la trop forte densité du liquide amniotique. Même en diluant plusieurs fois (jusqu'à 12 fois) le liquide amniotique avec la solution tampon phosphate 0,05 M pH 6,5, la densité demeurait trop élevée.

Une filtration sur papier filtre n'a guère amélioré la situation. L'ultrafiltration fut d'abord effectuée en utilisant des membranes XM50 et YM100 (Amicon), laissant théoriquement passer les molécules de poids moléculaires plus petits que 50 et 100 kDa respectivement, mais la membrane XM300 (PM plus petits que 300 kDa) fut finalement retenue. Suite au passage du liquide amniotique dilué 1:4 dans la solution tampon phosphate 0,05 M pH 6,5, la membrane fut rincée à plusieurs reprises à l'aide de la solution tampon.

2.2.2 ACIDIFICATION DE L'IGFBP-1 ET ÉLIMINATION DES IGFS

Un essai fut effectué en diluant le liquide amniotique et en rinçant la membrane avec la solution d'acide acétique 2 M, NaCl 75 mM pH 3. L'utilisation de cette solution acide, celle-là même utilisée pour l'homogénéisation des précipités 2 et 3 du fractionnement de Cohn lors de l'isolation de l'IGFBP-3, avait comme but de séparer les IGFBP-1 des IGFs présents dans le milieu, ce qui devait en principe améliorer l'affinité de l'IGFBP-1 pour les IGF-I fixés à la colonne d'affinité.

Suite à cette acidification du liquide amniotique, les IGFs libres du milieu furent éliminés selon deux techniques différentes: ultrafiltration et échangeur ionique. Une membrane PM10 fut utilisée pour l'ultrafiltration. Les IGFs de PM de 7,5 kDa devaient franchir la membrane et les IGFBP-1 demeurer en surface. Le milieu fut rincé à deux reprises avec la solution acide (2 X 100 mL) en prenant soin de

toujours conserver au moins 25 mL de la solution au-dessus de la membrane ultrafiltrante. Trois lavages (100 mL chacun) furent ensuite effectués avec la solution tampon phosphate pH 6,5, avec les mêmes précautions, afin de rendre le milieu compatible pour la liaison de l'IGFBP-1 à la colonne d'affinité. Cette méthode a également l'avantage de réduire le volume de la solution contenant la protéine à isoler.

L'autre technique utilisée pour libérer les IGFs du milieu consistait en une incubation en présence du SP-Séphadex C-25, l'échangeur ionique utilisé lors de l'isolation de l'IGFBP-3. Le milieu fut mis en contact avec le Séphadex pendant 72 heures à 22°C sous agitation. Une centrifugation (30 minutes à 2000 g) suivie d'une neutralisation à pH 6,5 permettait la préparation du milieu pour la chromatographie d'affinité.

2.2.3 CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITÉ

La colonne utilisée fut la même que pour l'isolation de l'IGFBP-3, soit un gel d'agarose auquel de l'IGF-I avait été fixé. La seule différence pour cette chromatographie résidait dans le lavage, suite au passage de la solution d'IGFBP-1, qui se faisait avec du NaCl 0,25 M. L'élution se faisait ici aussi avec environ 50 mL d'acide formique 0,2 M, pH 3,0, ce qui nécessitait une étape de concentration avant d'effectuer l'HPLC.

2.2.4 HPLC EN PHASE INVERSE ET PAR FILTRATION SUR GEL

L'étape de la chromatographie en phase inverse pour l'IGFBP-1 fut identique à celle pour l'IGFBP-3, soit avec un gradient d'acétonitrile de 15 à 60% en 30 minutes, contenant 0,1% de TFA, à une vitesse de 1,5 mL/min. La colonne utilisée fut la même. Des analyses quantitatives furent effectuées sur les éluats de cette chromatographie.

Un essai fut également réalisé en modifiant le gradient: la pente de celui-ci fut adoucie dans l'intervalle de pourcentages d'acétonitrile pour lesquels l'IGFBP-1 était attendue, soit entre 30 et 45%, dans le but d'améliorer la pureté de cette protéine. De manière plus détaillée, le gradient d'acétonitrile est passé de 15 à 30% dans les 10 premières minutes, de 30 à 45% pendant les 45 minutes suivantes, et finalement, de 45 à 60% pour les 5 dernières minutes. La concentration de TFA est demeurée à 0,1% et la vitesse du solvant fut maintenue à 1,5 mL/min.

Pour améliorer la pureté de l'IGFBP-1, une filtration sur gel fut nécessaire. Cette filtration fut réalisée sur HPLC avec la colonne utilisée précédemment, soit la Protein Pak sw300. Les conditions d'élution furent également maintenues.

2.3 ANALYSES QUANTITATIVES

Le rendement des différentes étapes d'isolation des IGFBPs fut évalué grâce au test de liaison à l'IGF-I. Celui-ci permettait de quantifier les IGFBPs afin de comparer les différents cheminements possibles conduisant à leurs isolations. En plus de la mesure quantitative des IGFBPs, un dosage protéique fut nécessaire pour évaluer les facteurs de purification de chacune des étapes d'isolation, qui était calculés en fonction des volumes de chacune des solutions.

2.3.1 TEST DE LIAISON

Le dosage des IGFBPs s'est fait en plaçant l'échantillon à doser en présence d'IGF-I marqué à l'iode 125 (^{125}I). Ces derniers étant en excès par rapport aux IGFs présents dans le milieu (tel que le suggérait la saturation observée en augmentant davantage la concentration d'IGF marqués), les IGFBPs devraient en principe se lier majoritairement aux ^{125}I-IGF-I suite à une période d'incubation permettant à l'équilibre de s'établir. La séparation des ^{125}I-IGF-I libres et des ^{125}I-IGF-I liés, et le décompte de la radioactivité de la fraction "^{125}I-IGF-I liés" ont permis de quantifier les IGFBPs.

L'incubation des échantillons en présence de 20 000 cpm d'^{125}I-IGF-I (2000 Ci/mmol) fut effectuée dans une solution tampon sodium phosphate 0,1 M pH 7,5 contenant 0,2% d'albumine sérique bovine (BSA) (Sigma), dans un volume total de

400 μL[10]. En présence d'un échantillon acide, une neutralisation était effectuée afin de permettre une liaison optimale avec l'^{125}I-IGF-I. Elle était obtenue par évaporation du solvant sous un jet d'azote et resolubilisation du culot dans la solution d'incubation. La durée et la température d'incubation furent de 6 heure à 22°C[45], avec une légère agitation.

La séparation des ^{125}I-IGF-I libres et des ^{125}I-IGF-I liés fut effectuée par sédimentation des IGF-I libres au charbon de bois activé (CBA). Suite à l'incubation en présence d'^{125}I-IGF-I, à chaque milieu était ajoutée 1,0 mL d'une solution de 0,5% de CBA (Fisher) dans la solution d'incubation contenant également 200 mg/mL de sulfate de protamine (Biopharm)[74]. Cette solution était fraîchement préparée et agitée à 0°C pendant la durée de l'incubation. Suite à l'ajout de cette solution de CBA, les échantillons étaient placés à 0°C pendant 15 minutes pour ensuite être centrifugés à 2000 g pendant 40 minutes[10]. La radioactivité de 1000 μL du surnageant (^{125}I-IGF-I liés aux IGFBPs) était ensuite mesurée, pour finalement permettre le calcul du pourcentage de liaison selon la radioactivité totale.

Une épreuve de linéarité fut exécutée avec une dilution appropriée de liquide amniotique (1:100), pour lequel des volumes croissants furent incubés avec l'^{125}I-IGF-I afin de vérifier si l'augmentation du pourcentage de liaison était proportionnelle à la quantité d'IGFBP présente dans le milieu. Les essais furent effectués avec 20 000 et 35 000 cpm d'^{125}I-IGF-I.

2.3.2 DOSAGE DES PROTÉINES

Le dosage des protéines fut effectué par colorimétrie en utilisant le réactif BCA (Pierce, No 23225). Deux mL du réactif BCA furent mélangés à 1 mL des échantillons. Une incubation à 37°C, d'une durée de 2 heures pour les échantillons dont la concentration protéique variait entre 0 et 15 μg/mL, et de 30 minutes pour ceux variant entre 15 et 120 μg/mL, devait permettre à la coloration de s'établir. Deux courbes d'étalonnage étaient nécessaires afin d'obtenir un large intervalle de concentrations protéiques, tel que le nécessitaient les très faibles concentrations de certaines solutions. La lecture de la densité optique à 562 nm permettait de tracer ces courbes et de doser la concentration en protéines des échantillons.

2.4 ANALYSES QUALITATIVES

L'évaluation qualitative des protéines fut effectuée par plusieurs techniques. D'abord, une électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) en condition réductrice, dont la révélation s'est faite d'une manière non-spécifique au bleu de Coomassie. Pour augmenter la spécificité, un transfert Western fut effectué en utilisant l'IGF-I comme marqueur. Seules les protéines se liant à l'IGF-I étaient donc révélées, et leur PM permettait de les reconnaître. Enfin, une troisième méthode de vérification fut la filtration sur gel suite à une incubation avec de l'^{125}I-

IGF-I, qui évaluait les IGFBPs, ici encore, en fonction de leur PM. Les épreuves qualitatives furent effectuées afin de vérifier la présence ou l'absence des IGFBPs à certaines étapes des isolations, de même qu'évaluer leur PM, et également pour vérifier leur pureté aux étapes finales des techniques d'isolation.

2.4.1 ÉLECTROPHORÈSE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE

Les échantillons furent préparés par chauffage à 100°C pendant 5 minutes dans un tampon TRIS-HCl (Bio-Rad) 62,5 mM pH 6,8 contenant 10% de glycérol (ICN Biochemicals), 2% de SDS (Bio-Rad) et 5% de 2-mercaptoéthanol (Bio-Rad). Du bleu de bromophénol (0,1%) fut ensuite ajouté aux échantillons.

Le gel de séparation (11,5 X 20 X 0,13 cm) fut composé de 9,7% d'acrylamide (Bio-Rad) et 0,3% de bis-acrylamide (Bio-Rad) dans un tampon TRIS-HCl 0,37 M pH 8,8 contenant 0,1% de SDS, 0,15% de TEMED (Bio-Rad) et ,075% d'ammonium persulfate (Bio-Rad). Pour le gel de compression (2 X 20 X 0,13 cm), 2,9% d'acrylamide et 0,1% de bis-acrylamide furent incorporés dans un tampon TRIS-HCl 125 mM pH 6,8, contenant les mêmes proportions de SDS, de TEMED et d'ammonium persulfate que le gel de séparation. Une solution de TRIS 25 mM, glycine (Bio-Rad) 192 mM et SDS 1% servit de tampon de cuve[47]. Des protéines colorées de PM connus (Bio-Rad) furent utilisées en tant que marqueurs. La migration des protéines fut effectuée avec un voltage de 80 V pour traverser le

gel de compression, et de 160 V pour la séparation.

La fixation et la coloration des protéines furent effectuées au bleu de Coomassie. Le gel fut d'abord incubé pendant une nuit dans une solution de 25% d'isopropanol (Fisher), 10% d'acide acétique et 0,025% de bleu de Coomassie (Bio-Rad). Une décoloration par la même solution, excepté le bleu de Coomassie, fut ensuite effectuée jusqu'à l'obtention d'un bon contraste entre les bandes et le gel. Ce dernier fut finalement placé dans une solution de 10% d'isopropanol et 10% d'acide acétique.

2.4.2 TRANSFERT WESTERN

Le transfert western fut effectué dans le but de s'assurer que les protéines observées lors du SDS-PAGE étaient vraiment les IGFBPs désirées. La séparation des protéines en fonction de leur PM fut effectuée par SDS-PAGE, telle qu'expliquée précédemment, à la différence qu'il n'y avait pas d'agent réducteur (2-mercaptoéthanol) dans le tampon réagissant avec les échantillons. La dimension des gels était de 4,5 X 8,5 X 0,05 cm pour le gel de séparation, et de 1 X 8,5 X 0,05 cm pour celui de compression. Lorsque la migration des protéines fut complétée, le gel fut mis à tremper pendant 30 minutes dans le tampon TRIS 25 mM, glycine 192 mM et méthanol (Accusolv) 20% pH 8,3. Les feuilles de nitrocellulose, de même que les papiers filtres et les membranes éponges furent saturés avec ce même

tampon. Le gel fut déposé sur une double feuille de nitrocellulose, pour être ensuite placé en sandwich entre les papiers filtres, et finalement, entre les membranes éponges. Le tout fut déposé dans la cuve à électro-transfert avec un courant constant de 0,3 A pour deux heures.

La détection des IGFBPs fut effectuée selon la méthode de Hossenlopp[43]. En premier lieu, la vérification de la présence des protéines sur la membrane de nitrocellulose ainsi que la mesure des distances de migration des marqueurs de PM furent effectuées par un trempage dans le Ponceau S (Gelman Sciences). Après l'assurance d'un bon transfert des protéines, les membranes de nitrocellulose furent trempées pendant 30 minutes à 4°C dans la saline (NaCl 0,15 M, TRIS-HCl 0,01 M, pH 7,4 et 0,5 mg/mL azidure sodique) additionnée de 3% de Nonidet P40 (BDH). Un trempage de 60 minutes à 37°C dans la saline contenant 1% de BSA suivit, après quoi trois lavages de 5 minutes chacun furent effectués avec de la saline contenant 0,1% de Tween 20 (Bio-Rad) à 4°C. Les membranes de nitrocellulose furent ensuite incubées dans un sac scellé avec 3 mL de saline, 1% BSA, 0,1% Tween 20 contenant 400 000 cpm d'^{125}I-IGF-I. Après une nuit d'incubation, les membranes furent lavées à deux reprises (15 min) dans la saline 0,1% Tween 20, et à trois reprises avec uniquement de la saline. Elles furent séchées et finalement exposées à un film X-OMAT AR (Kodak) dans une cassette d'amplification pendant 3 jours à -70°C.

2.4.3 FILTRATION SUR GEL

Ce test qualitatif se base sur les mêmes principes que le test de liaison à l'^{125}I-IGF-I, à l'exception que la séparation des IGF-I libres et liés se fait par filtration sur gel. L'incubation de l'échantillon avec 20 000 cpm d'^{125}I-IGF-I fut exécutée comme pour le test de liaison, à la seule différence que la durée de l'incubation varia entre 2 et 6 heures. L'échantillon fut injecté dans la colonne Protein Pak sw300 dans les conditions décrites précédemment. Lors des injections, des fractions de 0,25 mL furent recueillies à la sortie de la colonne et comptées au compteur gamma. Les maxima de la courbe de la quantité de radioactivité en fonction du volume d'élution permettait d'évaluer le PM des protéines de transport de l'IGF-I.

Avec les échantillons provenant du plasma, des essais furent effectués en acidifiant le milieu dans le but de séparer le complexe de 150 kDa. L'échantillon plasmatique fut acidifié à pH 3 avec une solution d'acide acétique 0,5 M, suivi d'une incubation de 30 minutes à 22°C sous agitation (100 rpm). Le milieu fut reneutralisé par évaporation du solvant et resolubilisation du culot dans le tampon d'incubation. L'^{125}I-IGF-I fut ensuite ajouté. L'incubation de 6 heures et la séparation par tamisage moléculaire furent effectuées comme précédemment. Des essais furent également effectués en ajoutant le marqueur radioactif avant la reneutralisation.

2.5 DOSAGE DE L'IGF-I

Le dosage de l'IGF-I fut réalisé par titration radioimmunologique (RIA). Une extraction de cette protéine devait être exécutée préalablement au dosage, puisque son anticorps ne la reconnaît pas en forme liée. L'évaluation quantitative de l'IGF-I fut effectuée afin d'obtenir un meilleur contrôle de certaines étapes des isolations d'IGFBPs.

2.5.1 EXTRACTION DES IGF-I

L'extraction des IGFs est une étape nécessaire pour tous les échantillons provenant de milieux physiologiques, dans le but de contrer l'interaction causée par la présence des IGFBPs. Ces dernières entrent en compétition avec l'anticorps pour se lier aux IGF-I (à doser) et aux ^{125}I-IGF-I (ajoutés au milieu, voir section 2.5.2). Il se produit donc une double compétition, résultant en quatre états d'équilibre. La séparation des IGFs de leurs protéines de transport fut effectuée à l'aide de cartouches Sep-Pak C18 (Waters). Celles-ci permettent la séparation des molécules en fonction de leur polarité. La dissociation des IGFs de leurs protéines vectrices fut obtenue par acidification d'un volume précis de l'échantillon, soit 250 μL, auquel 1 mL de HCl 0,5 N fut ajouté, ce qui apportait un pH autour de 3. Le milieu fut incubé pendant 30 minutes à 22°C sous agitation (100 rpm). Pendant cette incubation, les cartouches furent préparées par des lavages successifs avec 5 mL

d'isopropanol, 5 mL de méthanol et deux fois 5 mL d'acide acétique 4%[44].

L'injection de l'échantillon dans la cartouche fut effectuée à un débit d'environ 0,5 mL/min. La cartouche fut ensuite lavée à deux reprises avec 10 mL d'acide acétique 4%. L'IGF-I fut élué avec 4 mL de méthanol, à un débit d'environ 1 mL/min. Le méthanol fut évaporé, et le culot resolubilisé dans 250 μL du tampon du RIA avec une incubation de 30 minutes à 37°C avec agitations multiples.

L'extraction des IGFs poursuivait deux objectifs: récupérer l'IGF-I et rendre les milieux exempts d'IGFBPs. L'efficacité de cette extraction fut vérifiée en mesurant le rendement en IGF-I ainsi que la présence d'IGFBPs. Le rendement fut évalué en procédant à l'incubation préalable d'un échantillon de plasma avec de l'^{125}I-IGF-I, et en comptant la radioactivité avant et après l'extraction. Les techniques d'extraction furent également appliquées à un échantillon contenant une quantité équivalente d'^{125}I-IGF-I dans le tampon sodium phosphate 0,1 M, 0,2% BSA, pH 7,5.

Suite à l'extraction, l'absence d'IGFBPs fut évaluée de trois manières: par le test de liaison (quantitatif), par le transfert Western et par le tamisage moléculaire (qualitatifs). En ce qui concerne le tamisage moléculaire, l'échantillon utilisé fut celui obtenu suite à l'extraction des IGFs du plasma ayant été incubé avec de l'^{125}I-IGF-I, soit celui ayant servi au test du rendement. Le décompte de la radioactivité dans les fractions de 0,25 mL récoltées à la sortie de la colonne Protein Pak sw300

(sur HPLC) a permis d'évaluer si l'IGF-I radioactif était libre ou lié.

2.5.2 RIA DE L'IGF-I

L'analyse radioimmunologique fut effectuée à l'aide d'une trousse commerciale mise en marché par Nichols Institute (Calif.). Le protocole analytique préconisé par le fabriquant fut respecté[44], soit:

1. la mise en présence de l'IGF-I à doser et de l'anticorps dans le tampon de réaction, avec une incubation de 60 minutes à la température de la pièce;
2. l'ajout de l'^{125}I-IGF-I et incubation du milieu pour la nuit (16 à 18 h) à 4°C;
3. la précipitation de l'anticorps par l'ajout d'un deuxième anticorps avec incubation du milieu pendant 60 minute à 4°C;
4. l'ajout d'une protéine de liaison à l'anticorps et incubation équivalente à la précédente, centrifugation du milieu à 2000 g pendant 30 min à 4°C;
5. le rejet des surnageants par inversion rapide des tubes;
6. le décompte de la radioactivité des précipités.

Le dosage fut effectué en *duplicata* pour la série d'échantillons suivants:

- un échantillon pour le calcul de la radioactivité totale mise dans chaque tube;

- un échantillon pour la mesure de la liaison non-spécifique, ne contenant que le deuxième anticorps et sa protéine de liaison dans le tampon de réaction;
- un échantillon pour la mesure de la liaison maximale de l'^{125}I-IGF-I à l'anticorps, soit le zéro de la courbe-étalon;
- cinq solutions d'étalonnage d'IGF-I de concentrations connues et croissantes;
- trois témoins fournis par le fabriquant, avec leur valeur attendue;
- un témoin Lyphochek (Bio-Rad) avec une valeur connue en IGF-I, mesurée à l'aide de la trousse de Nichols;
- et, finalement, les échantillons inconnus à doser.

TROISIÈME CHAPITRE

3. RÉSULTATS

3. RÉSULTATS

Les méthodes utilisées pour mesurer l'efficacité des techniques d'isolation des IGFBP-1 et IGFBP-3 doivent être en mesure d'apporter des résultats reflétant bien la réalité. Elle furent donc examinées sous plusieurs angles. En premier lieu, le test de liaison à l'^{125}I-IGF-I devrait permettre une quantification adéquate des IGFBPs. Également, le dosage de l'IGF-I par RIA devrait comporter, en plus d'une extraction efficace des IGFs, des résultats satisfaisants pour les valeurs-étalons et les échantillons-témoins. Les résultats obtenus par ces deux méthodes de dosage, de même que ceux découlant des analyses qualitatives, ont permis de suivre de façon détaillée l'évolution des étapes d'isolation des IGFBPs.

3.1 ISOLATION DE L'IGFBP-3

Le suivi de chacune des étapes de l'isolation de l'IGFBP-3 est présenté au Tableau I. Les rendements et les facteurs de purification sont inscrits à titre indicatif, de même que la concentration en IGF-I pour certaines étapes. Les rendements sont calculés en comparant la liaison totale de chaque échantillon avec celle de la source de départ, qui est de 100%. Les facteurs de purification sont aussi une comparaison avec l'échantillon initial, qui se rapporte ici à l'activité spécifique.

La valeur de 1 est attribuée à la source de départ. La pureté de la protéine obtenue à l'étape finale fut évaluée par SDS-PAGE et transfert Western.

Tableau I: Rendements et facteurs de purification des étapes de l'isolation de l'IGFBP-3. Concentration en IGF-I pour les étapes impliquant l'élimination de l'IGF.

Étapes	Volume (mL)	Protéine (mg/mL)	Protéine totale (mg)	Liaisons totales ($x10^6$ U)	Activité spécifique (U/mg)	Rendement (%)	Facteur de purification	IGF-I (U/mL)
Plasma	2750	65	178 750	5,28	29,54	100	1	3,20
Culots 2+3	1180	8,6	10 148	7,79	767,6	147,5	26,0	0,66
Post-Séphadex	1230	3,6	4428	3,15	711,4	59,6	24,1	0,052
pH à 6,5	1350	1,1	1485	7,13	4801	135,0	106,7	-
Post-affinité	1240	1,0	1240	0,526	424	9,97	14,4	-
Élution affinité	50	40×10^{-6}	0,002	0,228	114×10^6	4,32	$32,5 \times 10^6$	-
Élution concentrée	25	-	-	0,148	-	2,81	-	-
HPLC-RP	-	-	-	0,722	-	13,68	-	-

3.1.1 FRACTIONNEMENT DE COHN

Dans le plasma, la protéine de transport de l'IGF démontrait un PM autour de 160 kDa sur la courbe de filtration sur gel post-incubation à l'^{125}I-IGF-I (figure

3.1). Toutefois, un pic de PM d'environ 40 kDa, qui pourrait correspondre au complexe IGFBP-1/IGF, était également présent, en plus du pic de l'IGF-I libre.

Lors du fractionnement de Cohn, plus de 75% des protéines indésirables du plasma furent éliminés en ne conservant que les culots 2 et 3. Cependant, les tests de liaison n'ont pu apporter de résultats valables quant à la présence des IGFBPs dans les précipités et les surnageants du fractionnement.

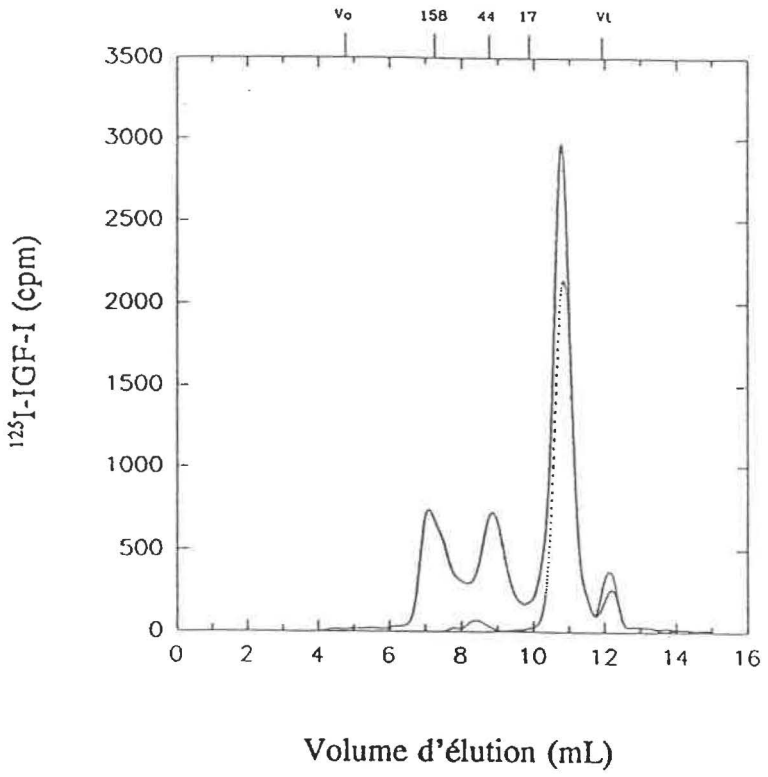

Figure 3.1: Courbes de filtration sur gel pour un échantillon de plasma suite à une incubation avec de l'^{125}I-IGF-I (——). Courbe de l'^{125}I-IGF-I seul (·····). Les marqueurs de PM, en kDa, sont indiqués par les barres verticales aur l'axe supérieur. V_o et V_t sont respectivement le volume mort et le volume total de la colonne.

3.1.2 ACIDIFICATION ET ÉLIMINATION DES IGFS

L'élimination des IGFs libres du milieu à l'aide de l'échangeur ionique s'est avérée efficace à 95% lorsque la quantité d'^{125}I-IGF-I ajouté au milieu avant l'incubation au Séphadex fut comparée à celle retrouvée après. Lorsque dosé par RIA, le pourcentage de récupération fut de 92% (Tableau I, concentrations d'IGF-I). Cependant, dans le cas des résultats obtenus par RIA, les IGFBPs libres, présentes dans l'échantillon post-incubation, ont pu causer de l'interférence. Bien qu'il y ait eu une extraction des IGFs avec les cartouches Sep-Pak pour tous les échantillons avant le dosage par RIA, un fort pourcentage de liaison à l'^{125}I-IGF-I (test quantitatif des IGFBPs) fut mesuré dans le cas de cet échantillon (tableau VI).

Le rendement en IGFBP-3 dans le surnageant obtenu suite à la centrifugation des précipités 2 et 3 homogénéisés dans le tampon acide semble avoir grandement augmenté (Tableau I) lorsque mesuré par le test de liaison à l'^{125}I-IGF-I. Aussi, une grande quantité des protéines de cette solution furent éliminées par précipitation lors de la centrifugation. Ceci se traduit par une nette augmentation du facteur de purification.

Suite à l'incubation d'un échantillon du surnageant post-SP-Séphadex avec l'^{125}I-IGF-I, la séparation des IGFs libres par tamisage moléculaire se traduit par un pic correspondant à la protéine de 53 kDa (figure 3.2). Le complexe de 150 kDa est donc dissocié à cette étape. En ce qui concerne l'échantillon de plasma acidifié

et reneutralisé préalablement au test de liaison à l'IGF-I (voir section 2.4.3), le profil de la filtration sur gel n'a pas démontré de similarité avec celui des précipités 2 et 3 en tampon acide (figure 3.3). Pour le plasma acidifié, les bandes obtenues sont mal définies sauf celle correspondant à un PM d'environ 40 kDa et celle de l'^{125}I-IGF-I libre. Que la reneutralisation soit faite avant ou après l'ajout de l'IGF-I marqué, les profils des courbes sont équivalents.

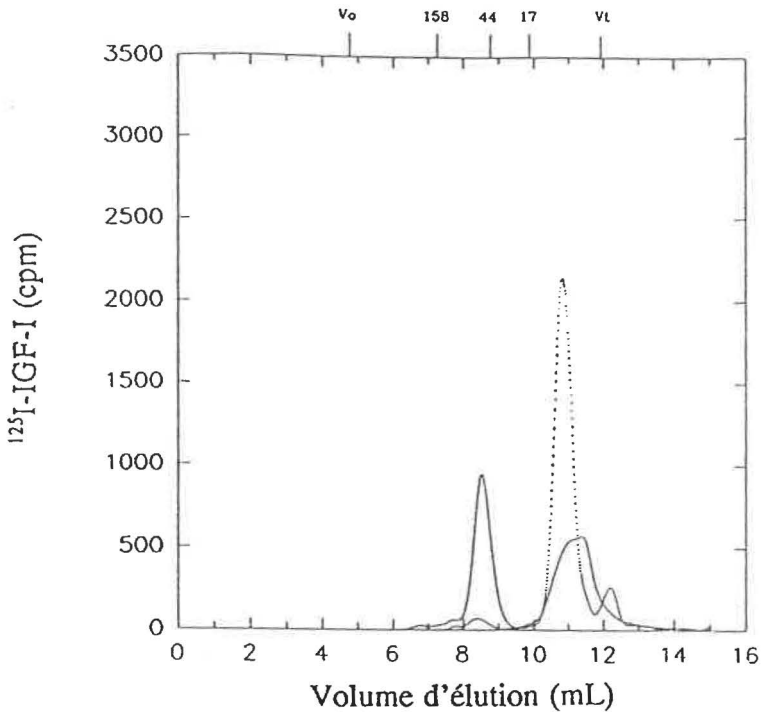

Figure 3.2: Courbe de filtration sur gel suite à une incubation avec l'^{125}I-IGF-I pour l'homogénat des précipités 2 et 3 du fractionnement de Cohn dans un tampon acide (——). Courbe pour l'^{125}I-IGF-I seul (·····). (Voir Figure 3.1 pour la calibration.)

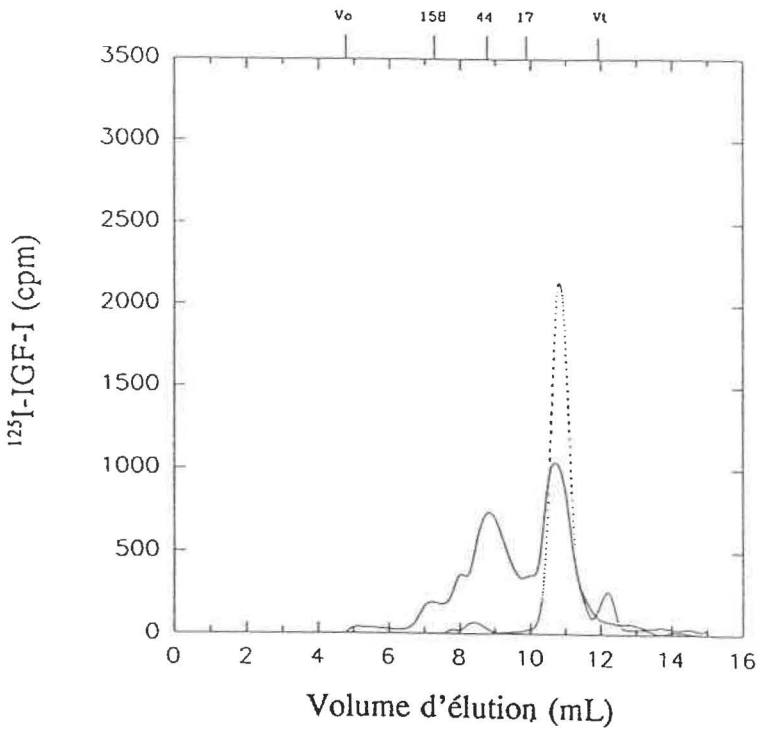

Figure 3.3: Courbe de filtration sur gel pour un échantillon de plasma acidifié et reneutralisé suite à l'incubation avec l'^{125}I-IGF-I (——). Courbe pour l'^{125}I-IGF-I seul (·····). (Voir Figure 3.1 pour la calibration.)

3.1.3 CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITÉ

La préparation de la solution d'IGFBP-3 pour la chromatographie d'affinité fut une étape importante dans la purification de cette protéine. La précipitation des protéines indésirables par augmentations successives du pH a permis de réduire grandement la concentration protéique de la solution (Tableau I). En augmentant le pH à 4, environ 70% des protéines ont précipité. Lorsqu'amené à un pH de 6,5, la mesure quantitative de l'IGFBP-3 dans la solution a indiqué une grande augmentation. Le facteur de purification en est d'autant amélioré.

d'IGF-I furent élués lorsque le gel d'agarose fut versé dans la colonne, tout comme lors des lavages qui suivirent; les nombreux rinçages du récipient dans lequel s'est tenue l'incubation de l'IGF-I avec le gel ont permis de réduire les pertes au minimum. Cependant, l'efficacité de la colonne au moment où les rendements en IGFBPs furent calculés peut avoir été atténuée par le vieillissement de celle-ci. Bien qu'elle ait toujours été maintenue à 4°C, les différentes solutions qui l'ont traversée ont pu en avoir affecté la qualité.

L'élution des IGFBPs était très lente avec l'utilisation d'une solution d'acide acétique 0,5 M pH 3[51]. Le volume requis pour une élution complète était trop considérable, d'où le changement de la solution d'élution. Avec le formate 0,2 M, l'élution des IGFBPs était complète avec environ 50 mL. Toutefois, cet éluat devait être concentré pour l'étape suivante de l'isolation; les manipulations exécutées pour en augmenter la concentration ont produit une perte de 35% de la quantité totale d'IGFBP-3.

3.1.4 HPLC EN PHASE INVERSE ET PAR FILTRATION SUR GEL

Lors de la chromatographie en phase inverse sur HPLC, l'IGFBP-3 fut éluée à un temps de 10,8 minutes avec un gradient d'acétonitrile de 15 à 60% en 30 minutes, ce qui équivaut à un pourcentage d'acétonitrile de 31% (figure 3.4). La fraction contenant l'IGFBP-3 fut récoltée et évaluée qualitativement par SDS-PAGE.

minutes, ce qui équivaut à un pourcentage d'acétonitrile de 31% (figure 3.4). La fraction contenant l'IGFBP-3 fut récoltée et évaluée qualitativement par SDS-PAGE. Les PMs correspondants aux trois bandes majeures étaient de 24,5, 42,5 et 47 kDa (figure 3.5). La pureté de l'IGFBP-3 n'a pu être améliorée par filtration sur gel: aucun pic de densité optique n'est apparu. L'activité spécifique, et par surcroît, le facteur de purification, n'ont pu être calculés à cette étape, puisque la concentration en protéines apparaissait nulle.

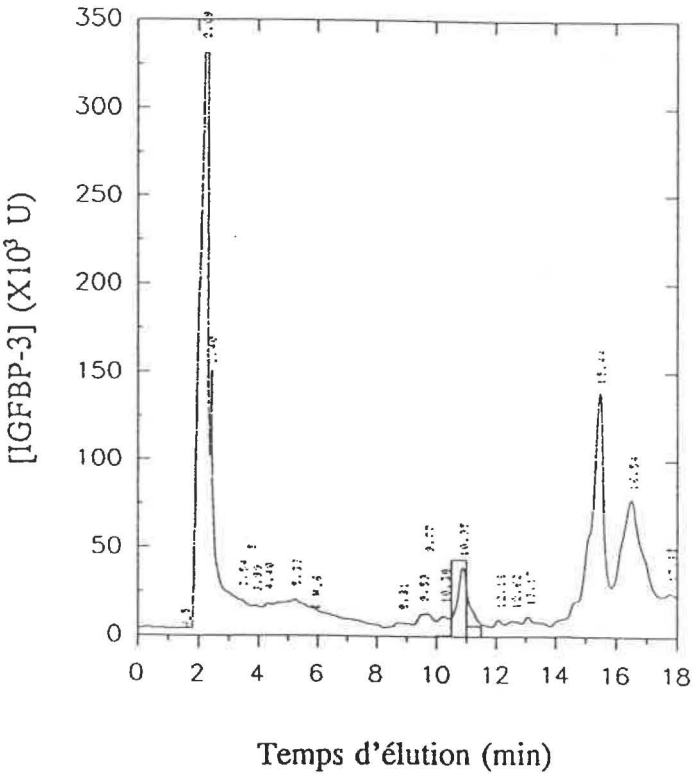

Figure 3.4: Courbe de l'élution de l'IGFBP-3 lors de la chromatographie en phase inverse sur HPLC. Pourcentage de liaison à l'IGF-I des éluats. (1 U d'IGFBP = 1% de liaison à l'IGF-I.)

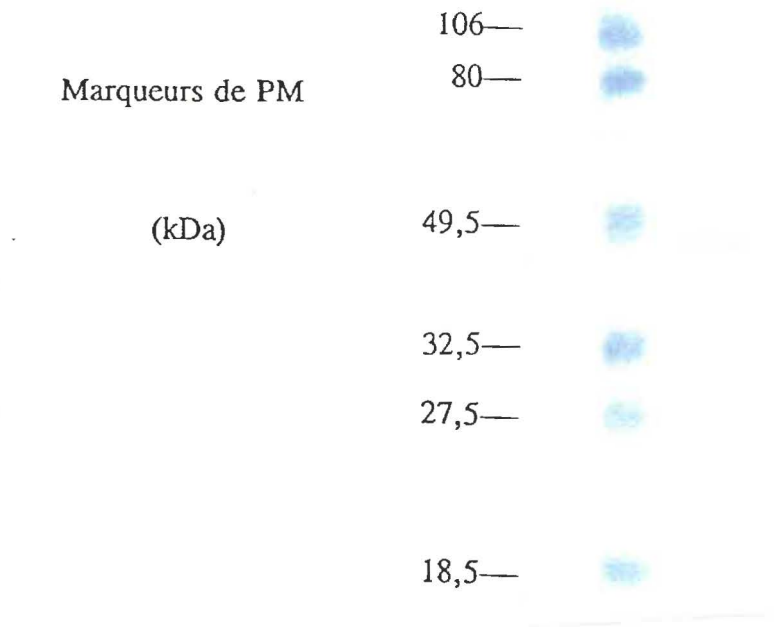

Figure 3.5: Révélation du gel d'électrophorèse de l'échantillon d'IGFBP-3 suite à l'HPLC en phase renversée.

Lors du transfert western, la révélation par l'^{125}I-IGF-I a donné une bande principale de PM correspondant à 46 kDa (figure 3.6), accompagnée d'une bande moins intense à 44 kDa. Ces bandes sont visibles pour tous les échantillons des étapes post-Séphadex de l'isolation de l'IGFBP-3. Toutefois, il y a présence de quelques autres bandes de faible intensité, entre autres pour les échantillons pour lesquels la pureté de l'IGFBP-3 devait être la meilleure, soient ceux des deux dernières étapes de l'isolation. Les PMs correspondants à ces bandes sont plus élevés que celui de la protéine recherchée.

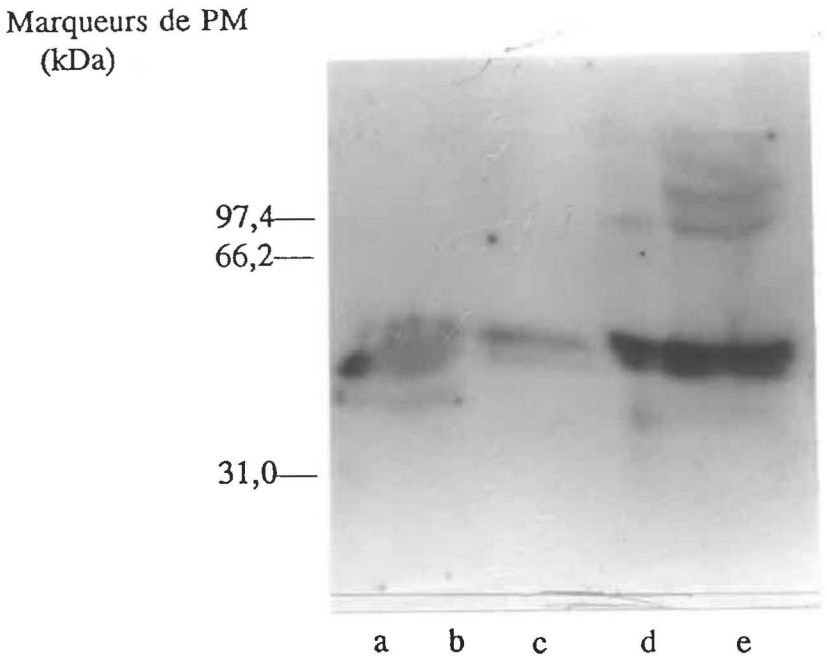

Figure 3.6: Révélation du transfert Western par l'^{125}I-IGF-I pour les échantillons des étapes d'isolation de l'IGFBP-3: a) plasma, b) précipités 2 et 3 post-Séphadex, c) pH 6,5, d) élution affinité, e) HPLC-RP.

3.2 ISOLATION DE L'IGFBP-1

Les étapes successives de l'isolation de l'IGFBP-1 à partir du liquide amniotique sont présentées au Tableau II avec leur rendement respectif, de même que le facteur de purification de l'IGFBP-1. Les protéines isolées ont démontré les caractéristiques de l'IGFBP-1 aux épreuves qualitatives effectuées. L'IGFBP-1 s'est révélée être la seule protéine du liquide amniotique à se lier à l'IGF-I: lors de la

filtration sur gel d'un échantillon de liquide amniotique ayant incubé en présence d'^{125}I-IGF-I, la courbe de la radioactivité en fonction du volume d'élution fut dominée par un pic de PM autour de 44 kDa (35 kDa + 7,5 kDa [IGF-I])(figure 3.7).

Tableau II: Rendements et facteurs de purification des étapes de l'isolation de l'IGFBP-1.

Étapes	volume (mL)	Protéine (mg/mL)	Protéine totale (mg)	Liaisons totales ($x10^6$ U)	Activité spécifique (U/mg)	Rendement (%)	Facteur de purification
Liquide amniotique	200	1,5	300	10,96	36 533	100	1
Ultrafiltré XM300	3200	0,096	307	9,444	30 762	86,2	1,94
Post-affinité	2950	0,04	118	4,174	35 374	38,1	0,97
Élution affinité	350	0,002	0,700	4,39	$6x10^6$	40,1	170,2
Élution concentrée	3	-	-	2,11	-	19,3	-
HPLC-RP	11,6	0,011	0,128	1,2	$9x10^6$	10,9	257,0
Filtration sur gel	3	-	-	0,72	-	6,6	-

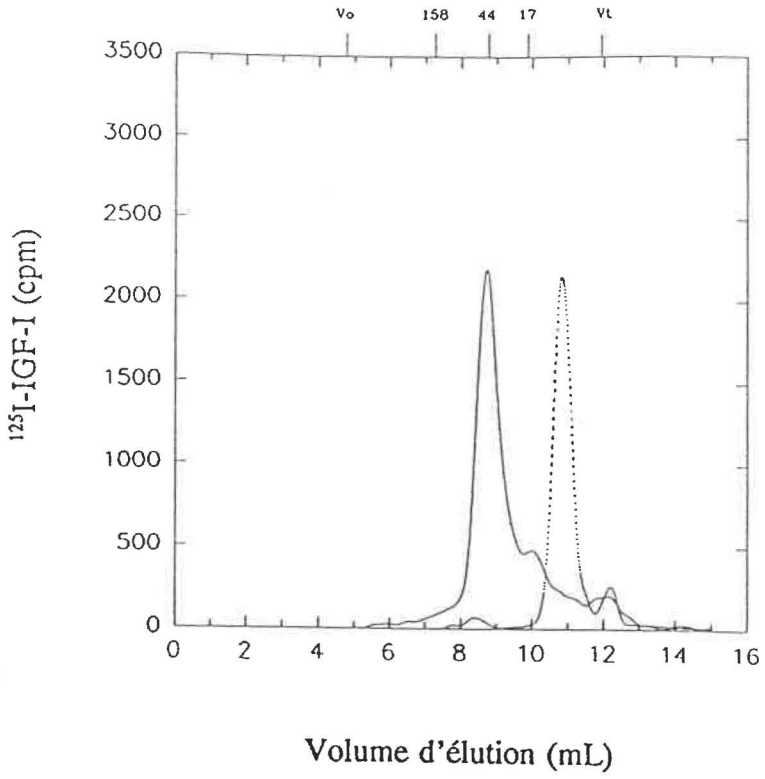

Figure 3.7: Courbe de filtration sur gel d'un échantillon de liquide amniotique suite à une incubation avec de l'^{125}I-IGF-I (——). Courbe de l'^{125}I-IGF-I seul (·····). (Voir Figure 3.1 pour la calibration.)

3.2.1 ULTRAFILTRATION DU LIQUIDE AMNIOTIQUE

L'ultrafiltration fut nécessaire pour éviter un engorgement de la colonne d'affinité. Bien que l'IGFBP-1 ait un PM de 35 kDa, le rendement obtenu était très faible (plus petit que 1%) suite à l'ultrafiltration sur des membranes XM50 ou YM100. En utilisant une membrane XM300, le rendement s'est beaucoup amélioré (environ 11%). En rinçant la membrane ultrafiltrante avec le tampon de dilution, il y a eu jusqu'à 86% de récupération de l'IGFBP-1. Le liquide amniotique ultrafiltré était très clair et, tel que souhaité, circulait facilement à travers la colonne d'affinité.

3.2.2 ACIDIFICATION DE L'IGFBP-1 ET ÉLIMINATION DES IGFS

Le rinçage de la membrane ultrafiltrante avec le tampon acide a permis d'obtenir une récupération de l'IGFBP-1 équivalente à celle obtenue avec le tampon phosphate. Ce tampon n'affectait pas l'activité de l'IGFBP-1 tel que l'ont démontré les tests de liaison effectués avant et après l'acidification.

L'élimination des IGFs libres par l'échangeur ionique s'est avérée inefficace puisque le rendement en IGFBP-1 était presque nul (Tableau III). Par contre, suite à l'ultrafiltration sur PM10, près de 50% des IGFBP-1 furent récupérées. La comparaison de l'élimination directe des IGF-I, mesurée par RIA, n'apporte pas de résultats concluants puisqu'il y a eu de l'interférence des IGFBPs libres (Tableau III). L'extraction avec les Sep-Paks devait en principe rendre le milieu contenant les IGF-Is exempts d'IGFBP (voir tableau VI).

Tableau III: Dosage en IGF-I et concentrations en IGFBP (évaluant l'interférence lors du RIA), pour la comparaison des deux méthodes d'élimination des IGFs libres pour le liquide amniotique acidifié suite à l'extraction avec les cartouches Sep-Paks. Et rendement en IGFBP-1 (milieu non-extrait) pour évaluer la récupération en IGFBP-1.

Échantillon de liquide amniotique acidifié	Milieu suite à l'extraction		Rendement en IGFBP-1 (%)
	IGFBP (%)	IGF-I_{totale} (U)	
Pré-élimination	38,6	9,16	100
Ultrafiltré PM10	44,7	3,98	47,8
Séphadex	2,3	2,85	2,7

3.2.3 CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITÉ

L'affinité de l'IGFBP-1 pour l'IGF-I de la colonne s'est très peu améliorée dans le cas d'une acidification préalable du milieu et d'une libération des IGFs libres. Le rendement en IGFBP-1 suite à l'élution était pratiquement équivalent (Tableau IV). Toutefois, la quantité d'IGFBP-1 n'ayant pas accrochée à la colonne était supérieure dans le cas du milieu non-acidifié.

Tableau IV: Effet d'une acidification préalable du liquide amniotique sur le rendement en IGFBP-1 suite à la chromatographie d'affinité.

Échantillon	Étape	Rendement (%)
Liquide amniotique direct	Pré-affinité	100
	Post-affinité	44,2
	Élution affinité	46,5
Liquide amniotique acidifié ultrafiltré sur PM10	Pré-affinité	100
	Post-affinité	0,8
	Élution affinité	50,2

3.2.4 HPLC EN PHASE INVERSE ET PAR FILTRATION SUR GEL

L'IGFBP-1 s'est retrouvée dans le pic principal de densité optique élué au temps de 14,3 minutes, soit un pourcentage d'acétonitrile de 36% (Figure 3.8). Lors de la chromatographie en phase inverse avec le gradient modifié, le pic maximum de densité optique fut élué avec une minute de retard (Figure 3.9). Le profil du chromatogramme n'en fut que très peu modifié.

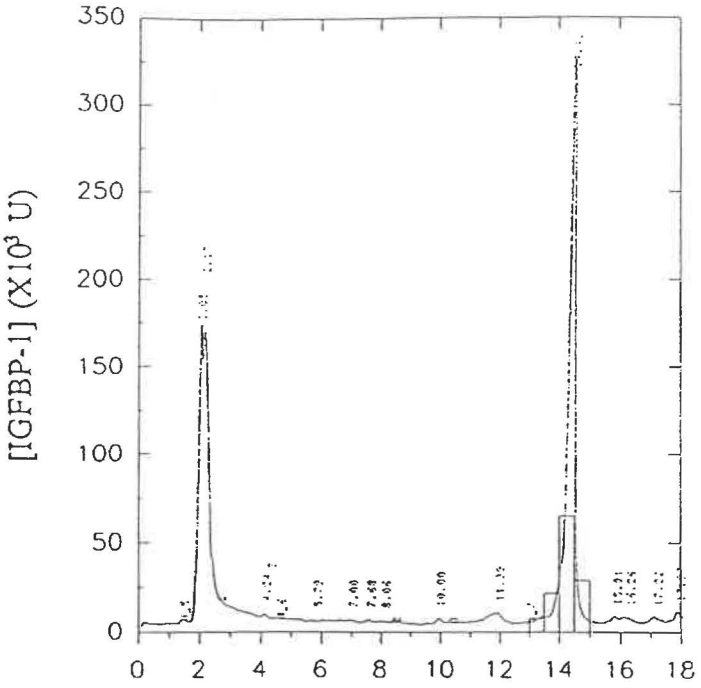

Figure 3.8: Courbe d'élution de l'IGFBP-1 suite à la chromatographie en phase inverse sur HPLC. Pourcentages de liaison à l'IGF-I des éluats. (1 U d'IGFBP = 1% de liaison à lIGF-I.)

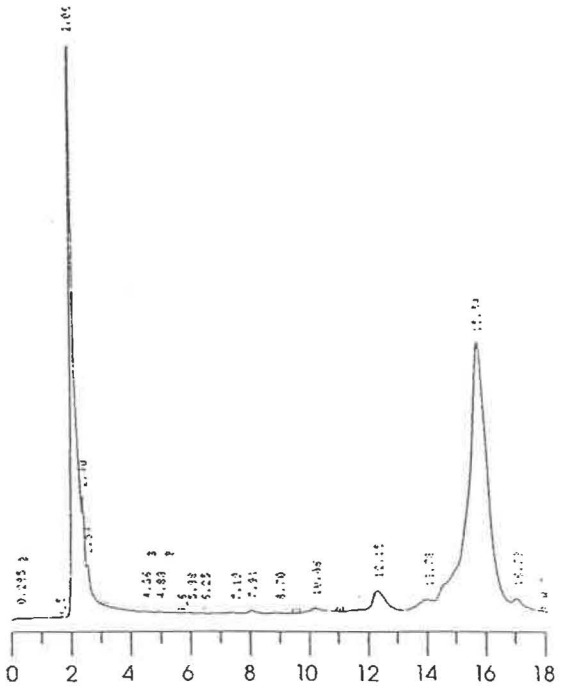

Figure 3.9: Courbe de l'élution de l'IGFBP-1 suite à la chromatographie en phase inverse sur HPLC avec le gradient modifié (voir section 2.2.4).

Le pic principal obtenu lors de la filtration sur gel élua à un temps de 18,5 minutes, soit un PM autour de 40 kDa (Figure 3.10). Telle que démontrée par SDS-PAGE, la pureté de la protéine isolée était excellente (Figure 3.11). La bande de l'IGFBP-1, à 34 kDa, s'est présentée pratiquement seule. Deux légères bandes avec des PM de 60 et 18,5 kDa apparaissaient également sur le gel.

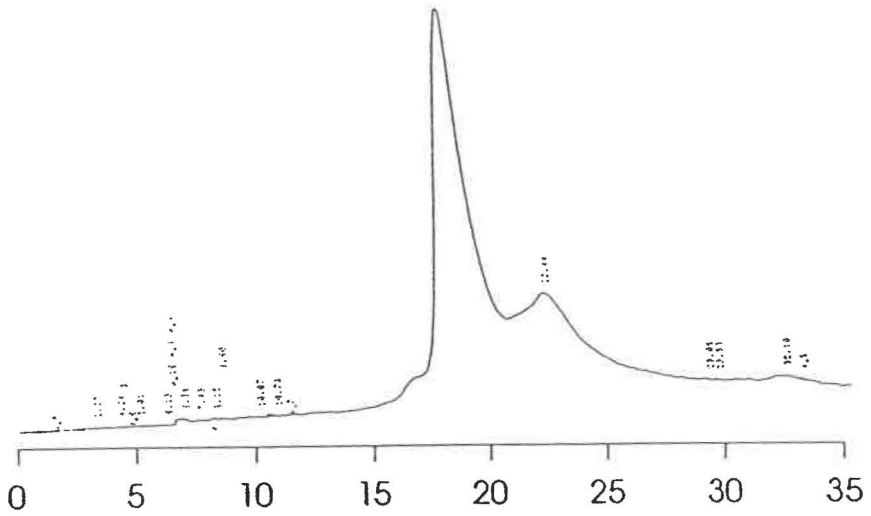

Figure 3.10: Courbe de filtration sur gel de l'échantillon d'IGFBP-1 obtenu suite à l'étape de chromatographie en phase inverse.

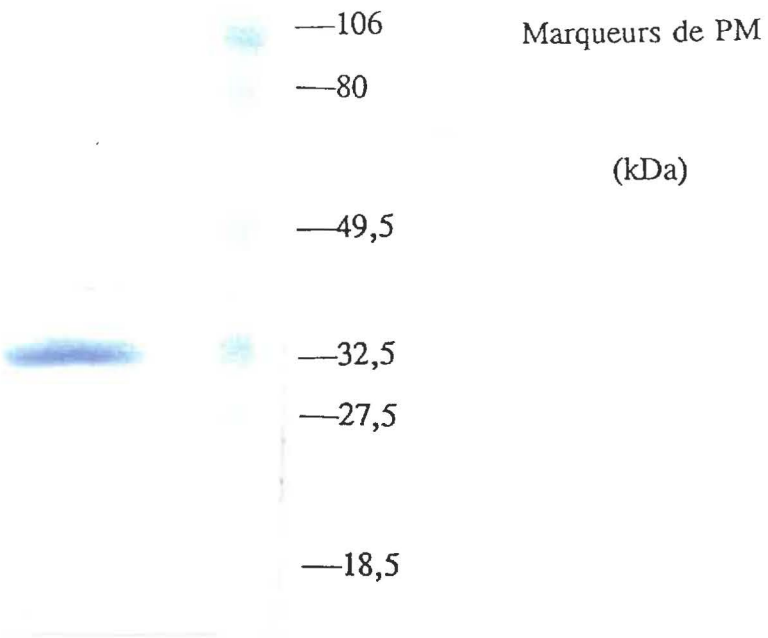

Figure 3.11: Révélation du gel d'électrophorèse de l'échantillon d'IGFBP-1 suite à la filtration sur gel.

Lors du transfert Western, pour lequel la révélation est bien plus sensible, une bande principale représente l'IGFBP-1 (Figure 3.12). Cette fois, son PM correspond à 28 kDa. Toutefois, il y a des bandes avec un PM plus élevé, dont une bande intense à 54 kDa dans l'échantillon de l'étape finale de l'isolation.

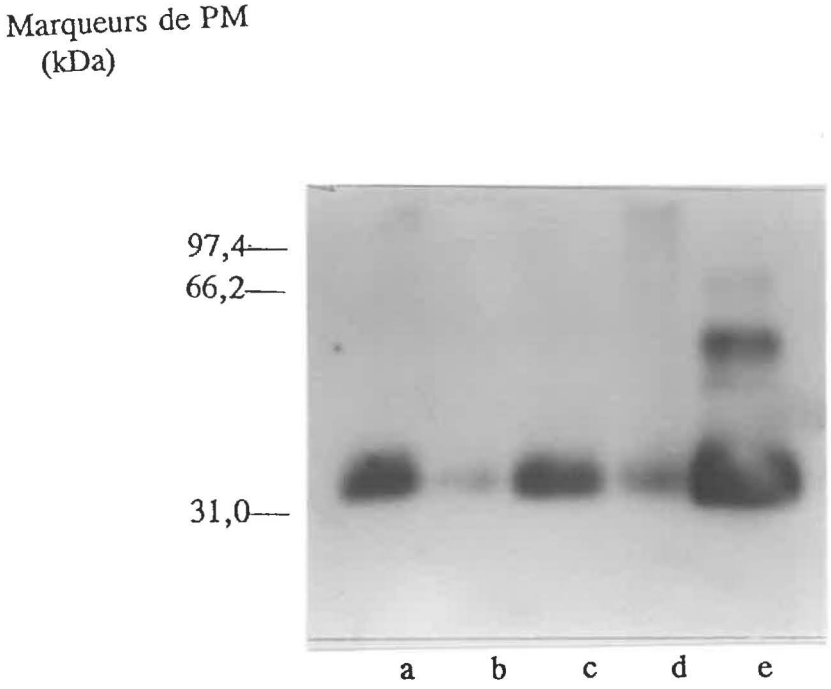

Figure 3.12: Révélation du transfert western par l'^{125}I-IGF-I pour les échantillons des étapes d'isolation de l'IGFBP-1: a) liquide amniotique, b) liq. amn. ultrafiltré, c) élution affinité, d) HPLC-RP, e) HPLC par filtration sur gel.

3.3 ANALYSE QUANTITATIVE

Les différentes techniques mises à l'essai ont permis de déterminer les conditions optimales requises pour effectuer la mesure quantitative des IGFBPs. Une épreuve de linéarité illustre le potentiel de ce test de liaison à l'^{125}I-IGF-I pour mesurer quantitativement les IGFBPs.

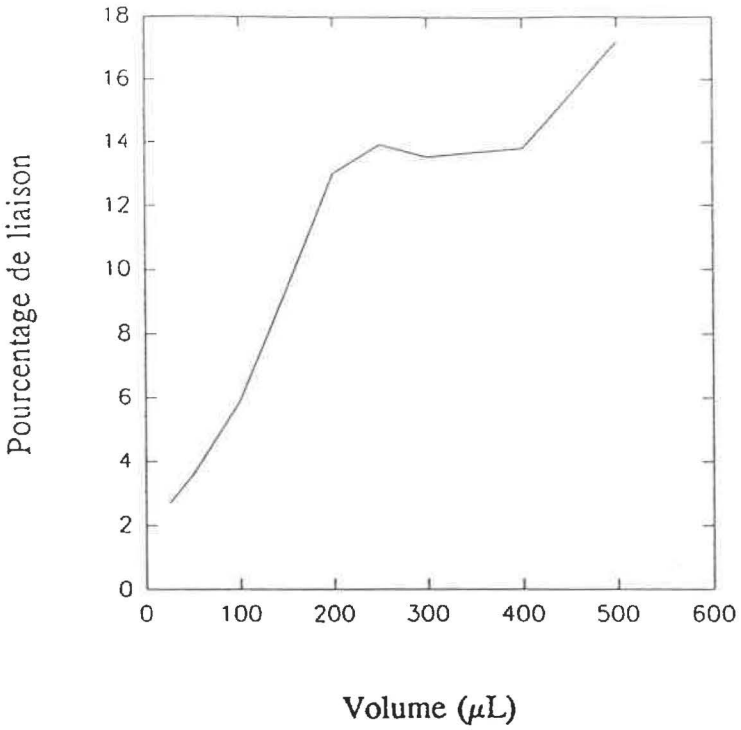

Figure 3.13: Pourcentage de liaison à l'IGF-I en fonction du volume de liquide amniotique en dilution (1:100) dans le tampon d'incubation.

L'incubation de volumes croissants de liquide amniotique avec de l'^{125}I-IGF-I et leur séparation au charbon de bois activé ont permis de vérifier la linéarité de ce test de liaison, et ainsi déterminer les dilutions appropriées pour éviter une saturation des IGFBPs. La courbe obtenue, présentée à la figure 3.13, démontre une linéarité pour des pourcentages de liaison entre 3 et 13%, après quoi, on observe plutôt une saturation, qui, au fait, n'en est pas vraiment une car une remontée lui fait suite. Le comportement de la courbe fut le même pour les quatre essais effectués. Les pourcentages de liaison obtenus étaient les mêmes que l'incubation soit faite avec 20 000 ou 35 000 cpm d'^{125}I-IGF-I.

3.4 DOSAGE DE L'IGF-I

Le dosage de l'IGF-I par RIA a nécessité, pour les milieux biologiques, une extraction préalable de cette protéine afin d'éliminer l'interférence des IGFBPs avec l'anticorps. Les IGFs et leurs protéines de transport furent séparés en fonction de leur différence de polarité. L'efficacité de l'extraction fut vérifiée en mesurant le rendement en IGF-I et la présence des IGFBPs.

3.4.1 VÉRIFICATION DE L'EFFICACITÉ DE L'EXTRACTION

Une différence dans le rendement en IGF-I suite à l'extraction fut observée entre l'^{125}I-IGF-I incubé dans le plasma et cette protéine dans le tampon phosphate (Tableau V). Les deux échantillons de plasma étudiés ont démontré de la constance dans leurs résultats.

Tableau V: Pourcentage de récupération de l'IGF-I suite à une extraction à l'aide des cartouches Sep-Pak mesuré par incubation d'^{125}I-IGF-I dans le plasma et la solution tampon sodium-phosphate 0,1 M, 0,2% BSA pH 7,5.

Milieu d'incubation	Récupération (%)
Plasma	65 64
Tampon phosphate-BSA	32 23

La présence des IGFBPs dans les solutions obtenues suite à l'extraction, mesurée à l'aide du test de liaison, diffère également selon le milieu. Les résultats sont indiqués au Tableau VI pour des échantillons de liquide amniotique et de plasma à différentes étapes de l'isolation des IGFBPs (voir chapitre sur l'isolation de l'IGFBP-3).

Tableau VI: Présence des IGFBPs dans les solutions d'extraction des IGFs mesurée à l'aide du test de liaison à l'^{125}I-IGF-I. (Lors du test de liaison, certains échantillons furent dilués dix fois, et leurs résultats multipliés par dix, dans un but comparatif.)

Échantillon	Liaison (%)
Liquide amniotique ultrafiltré	38,6
Plasma	2,5
Culots 2 et 3 (Cohn)	1,4
Post-Séphadex	60,4

Suite au transfert Western de l'extraction d'IGFs à partir du plasma, aucune trace d'IGFBPs ne fut décelée. L'absence des protéines de transport est également illustrée à l'aide de la courbe de filtration sur gel de l'extraction provenant de l'échantillon de plasma ayant incubé avec l'^{125}I-IGF-I (figure 3.14). Peu de radioactivité fut éluée dans les temps de sortie correspondants aux PMs des IGFBPs.

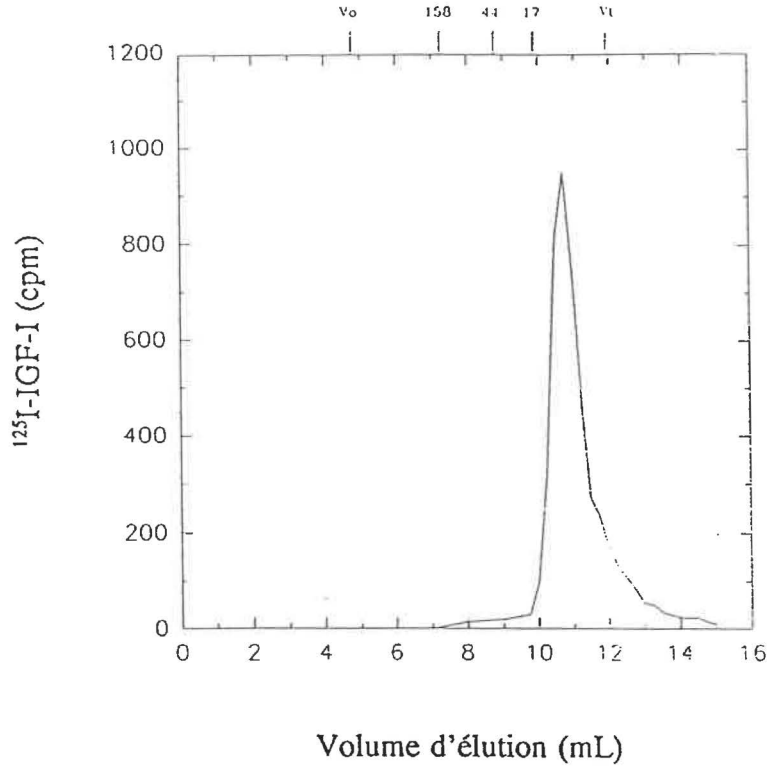

Figure 3.14: Courbe de filtration sur gel de la solution d'extraction des IGFs provenant d'un échantillon de plasma ayant incubé avec de l'^{125}I-IGF-I. (Voir figure 3.1 pour la calibration.)

3.4.2 RIA DE L'IGF-I

Les dosages radioimmunologiques de l'IGF-I furent très satisfaisants. De façon générale, les mesures effectuées ont permis d'obtenir des courbes-étalons respectant la relation attendue entre la concentration d'antigène et la quantité de radioactivité précipitée par les anticorps. La justesse quantitative de ces courbes-étalons s'avère excellente puisque les résultats obtenus pour tous les échantillons-témoins se situent dans les valeurs attendues.

QUATRIÈME CHAPITRE

4. DISCUSSION

4. DISCUSSION

L'élaboration des cheminements d'isolation des IGFBP-1 et IGFBP-3 fut rendue possible grâce aux résultats des analyses quantitatives et qualitatives. Ainsi, plusieurs problèmes survenus au cours des étapes d'isolation des IGFBPs ont pu être surmontés. Ces analyses ont apporté des justifications sur l'utilité de chacune des étapes, en plus de permettre l'identification des protéines isolées et la vérification de leur pureté.

4.1 ISOLATION DE L'IGFBP-3

Les rendements et facteurs de purification calculés pour l'isolation de l'IGFBP-3 à partir du plasma humain laissent croire à une excellente purification de cette protéine. Cependant, les analyses qualitatives effectuées apportent des arguments contradictoires. Il est important de considérer les conséquences apportées par les conditions physico-chimiques des échantillons lors du test de liaison à l'^{125}I-IGF-I puisque celui-ci est à la base de toutes les analyses quantitatives.

L'augmentation du rendement pour les échantillons de certaines étapes de l'isolation de l'IGFBP-3 ne peut être réel. Ce phénomène pourrait s'expliquer par la trop grande stabilité du complexe de 150 kDa dans certaines conditions, entre autre dans son état naturel; ainsi, même en excès, l'^{125}I-IGF-I serait incapable de déplacer l'IGF déjà lié à la protéine de transport[52]. Des résultats analogues furent d'ailleurs publiés par Martin et Baxter[51], accompagnés des résultats obtenus par RIA. Ces derniers traduisent plus judicieusement les rendements de l'IGFBP-3 aux différentes étapes: l'anticorps est en mesure de reconnaître l'IGFBP-3 autant dans sa forme complexée que dans sa forme libre[52]. Cependant, on ne disposait par de l'anticorps spécifique à l'IGFBP-3.

Les résultats obtenus en acidifiant le milieu et le reneutralisant préalablement à l'incubation avec l'^{125}I-IGF-I n'ont pas été satisfaisants, pas plus que ceux obtenus en reneutralisant le milieu après l'ajout du marqueur. Le complexe de 150 kDa est pratiquement disparu, tel que prédit en condition acide, mais le pic principal de radioactivité correspond à un PM autour de 40 kDa. Une protéine de liaison à l'IGF-I d'un PM de 40-45 kDa fut observée ultérieurement dans le plasma[39], mais elle s'est révélée immunologiquement différente de l'IGFBP-3[52]. Aucun pic important ne représente l'IGFBP-3 (53 kDa). Cependant, la résolution de la colonne de filtration sur gel ne permet pas de conclure en l'absence totale de cette protéine. L'acidification du plasma n'apporte donc pas une quantification adéquate de l'IGFBP-3.

La deuxième étape de l'isolation de l'IGFBP-3, soit l'élimination des IGFs libres par le Séphadex C-25, s'est avérée très efficace. Cependant, le rendement en IGFBP-3 n'a pu être déterminé d'une manière sûre à cause des lacunes du test de liaison. Les changements de milieux et la longue incubation à 22°C peuvent avoir causé des effets néfastes sur la protéine. D'ailleurs, l'échantillon post-Séphadex a subi une baisse du rendement depuis l'étape précédente, bien que l'interaction des IGFs libres sur le test de liaison devrait être atténuée suite à leur élimination. Les conditions acides du milieu furent maintenues et n'expliquent pas cette diminution du rendement. La durée et la température de l'incubation en seraient plutôt la cause; ces conditions furent exécutées telles que publiées par Martin et Baxter[51].

Les augmentations successives du pH, dans le but de préparer la solution pour la chromatographie d'affinité, ont permis d'améliorer grandement le facteur de purification de l'IGFBP-3. Une nette augmentation du rendement est également observée. Elle serait expliquée par une plus forte affinité de l'IGFBP-3 pour l'IGF-I du test de liaison, en raison du pH de la solution. D'ailleurs, Martin et Baxter[51] observaient également une augmentation du rendement à cette étape.

Suite à la chromatographie d'affinité, la quantité d'IGFBP-3 perdue dans la solution post-affinité est plus importante que celle recueillie lors de l'élution. L'accrochage des IGFBP-3 aux IGF-I de la colonne d'affinité n'est donc pas très efficace. Martin et Baxter[51] utilisaient de l'IGF-II pour leur colonne d'affinité lors

de l'isolation de l'IGFBP-3 puisque l'affinité de cette dernière pour l'IGF-II est plus forte que pour l'IGF-I[64]. Toutefois, l'affinité pour l'IGF-I n'est pas tellement plus faible[51], et par commodité, la colonne d'affinité à l'IGF-I fut utilisée pour l'isolation des deux IGFBPs. D'ailleurs, avec la colonne d'affinité à l'IGF-II, près de 40% des IGFBP-3 étaient tout de même perdus[51]. La faible fixation des IGFBP-3 à la colonne peut être la conséquence de l'association de celles-ci aux éléments du complexe de 150 kDa, bien que les étapes antérieures devaient les avoir dissociés et avoir éliminé les IGFs libres. Le facteur de purification obtenu suite à l'élution de la chromatographie d'affinité est excellent. La très faible concentration en protéines de la solution d'élution en est la cause. La perte importante d'IGFBP-3 lors de la concentration de l'échantillon d'élution reste inexpliquée. Elle peut être causée par une dénaturation de la protéine, ou par la perte.

Lors du traitement sur HPLC en phase inverse, l'élution de l'IGFBP-3 s'est produite à un temps de 11 minutes, alors que Martin et Baxter obtenaient un temps de sortie de 16 minutes avec les mêmes conditions chromatographiques[51]. Cette différence dans le temps d'élution est causée par une baisse dans la résolution de la colonne, telle qu'observée en vérifiant les temps de sortie de différents produits, l'uracile, le toluène et le biphényl qui étaient élués beaucoup plus rapidement au fur et à mesure que la colonne vieillissait. La pureté de la protéine en est affectée, mais la baisse de résolution ne peut être considérer comme l'unique cause de cette diminution de pureté. L'hydrophobicité des impuretés est très rapprochée de celle

de l'IGFBP-3, d'où un temps d'élution équivalent.

L'IGFBP-3 isolée ne s'avère pas d'une pureté idéale lorsqu'évaluée par SDS-PAGE et transfert Western. La bande majeure à 47 kDa et celle de plus faible intensité à 43 kDa se rapprochent des résultats obtenus par Martin et Baxter, soit une bande majeure à 43 kDa et une mineure à 40 kDa[51]. Toutefois, une bande autour de 25 kDa est également présente et pourrait correspondre à des fragments de l'IGFBP-3 suite à une dénaturation. La présence de bandes à 26 et 22 kDa fut d'ailleurs observés lors d'un SDS-PAGE en condition non-réductrice de l'IGFBP-3 suite à un long remisage[51]. Toujours en condition non-réductrice, l'IGFBP-3 a révélé deux bandes de PM de 53 kDa (intense) et de 47 kDa (plus faible)[51]. Le transfert Western, pour lequel l'électrophorèse fut produite en condition non-réductrice, dévoilait deux bandes, dont une bande principale de 46 kDa, et une autre moins intense de 44 kDa, ce qui se rapproche des résultats publiés[51]. Dans les mêmes conditions électrophorétiques, Hardoin et collaborateurs[37] ont obtenu des bandes de PM 41,5 et 38,5 kDa pour l'IGFBP-3. Donc les PMs sont très variables d'un expérimentateur à l'autre. Cependant, dans les résultats obtenus ici, ces bandes ne furent pas les seules à être révélées par l'IGF-I, mais les autres, de plus faibles intensités, démontraient des PMs plus élevés. Aucune identification ne s'est avérée juste. Ces résultats se sont reproduits à deux reprises; la probabilité que les gels furent inversés ne peut être complètement écartée, mais une attention particulière fut apportée lors du 2e essai.

Le rendement en IGFBP-3 semble excellent suite à la chromatographie en phase inverse. Toutefois, les résultats des analyses qualitatives ne viennent pas étayer ceux de l'analyse quantitative. Pour l'obtention de bandes visibles lors du SDS-PAGE révélé au bleu de Coomassie, tout l'échantillon devait être déposé, ce qui laisse croire en une très faible concentration en IGFBP-3. D'ailleurs, par filtration sur gel, aucun pic de densité optique ne fut observé. Il faut souligner que lors de la chromatographie en phase inverse, la densité optique était très faible au temps d'élution de l'IGFBP-3, ce qui peut s'interpréter comme étant un très faible rendement.

4.2 ISOLATION DE L'IGFBP-1

L'isolation de l'IGFBP-1 à partir du liquide amniotique humain fut plus directe que celle de l'IGFBP-3. L'évaluation des rendements et facteurs de purification des étapes d'isolation est facilitée, contrairement à l'IGFBP-3, par une bonne réponse de l'IGFBP-1 aux analyses quantitatives. Les résultats sont plus réalistes et apportent des renseignements utiles pour justifier les modifications apportées à la méthode de Baxter[7].

Le très faible rendement obtenu (plus petit que 1 %) suite à l'ultrafiltration sur des membranes XM50 ou YM100 laisse supposé que l'IGFBP-1 n'est pas totalement

libre dans le liquide amniotique, mais complexée avec d'autres protéines, ou en aggrégation. Même avec la membrane XM300, le rendement obtenu, sans que ne soit effectué aucun rinçage, est relativement faible pour une protéine de 35 kDa. Un engorgement aurait pu se produire au niveau de la membrane filtrante, avec un blocage des pores par certaines grosses protéines, en dépit d'une agitation rapide et constante.

Suite à l'acidification préalable et à l'élimination des IGFs, les résultats n'ont démontré aucune amélioration du rendement en IGFBP-1 lors de la chromatographie d'affinité. L'affinité de cette protéine pour l'IGF-I de la colonne s'est avérée meilleure puisque la solution post-affinité n'avait qu'un très faible pourcentage de liaison à l'^{125}I-IGF-I, mais une perte de 50% des protéines fut observée. Cette perte peut être causée par un mauvais décrochage des IGFBPs, ceux-ci étant restées fixées à la colonne d'affinité, et/ou par une dénaturation des protéines. Quoiqu'il en soit, l'ultrafiltration sur PM10 a provoqué une perte importante d'IGFBP-1, d'où le rejet de cette modification.

La chromatographie d'affinité est l'étape permettant la plus forte amélioration dans la purification de l'IGFBP-1 tout en réduisant considérablement le volume de la solution. La perte en IGFBP-1 est tout de même importante; le rendement de l'élution de la chromatographie d'affinité est équivalent à la quantité d'IGFBPs n'ayant pas accroché à la colonne. En plus, l'étape de concentration de la solution

d'élution a amené une perte de plus de 50%, qui demeure inexpliquée ici aussi.

Lors de la chromatographie en phase inverse, la sortie de l'IGFBP-1 fut encore ici très hâtive (gradient à 36% d'acétonitrile) comparativement à ce qu'obtenait Baxter (43%)[7]. Le rendement en IGFBP-1 est excellent suite à cette étape, avec une densité optique élevée pour le pic d'élution, mais le facteur de purification semble un peu faible. Le manque de spécificité du test de liaison peut en être la cause. La perte de la résolution de la colonne ne peut à elle seule être responsable du manque de pureté de l'IGFBP-1. L'allongement du gradient d'élution pour des pourcentages d'acétonitrile couvrant celui attendu pour la sortie de l'IGFBP-1 n'a point été profitable. Le profil chromatographique ne fut que très peu modifié.

L'étape de filtration sur gel de l'IGFBP-1 a permis d'obtenir une protéine beaucoup plus pure. On n'a pu, cependant, calculer le facteur de purification à cause de la concentration protéique qui s'avérait nulle. Bien que deux légères bandes accompagnent celle de l'IGFBP-1, de 34 kDa, celle-ci est très dominante. Les PMs retrouvés pour l'IGFBP-1 dans la littérature sont de 32 kDa lors d'un SDS-PAGE en condition réductrice[61], et de 28 kDa[7] et 34 kDa[83] en conditions non-réductrices. C'est justement à un PM de 28 kDa qu'est apparue la bande de l'IGFBP-1 lors du transfert Western effectué ici, qui était en conditions non-réductrices. Par contre, des bandes d'impuretés de plus hauts PMs étaient également

présentes, dont une à 54 kDa. Wang et collaborateurs[83], lors d'un transfert Western en conditions non-réductrices, ont également observé la présence d'une bande d'un PM correspondant au double de celui de la bande d'IGFBP-1, i.e. une bande à 68 kDa, alors que leur IGFBP-1, isolée par une méthode différente, démontrait un PM de 34 kDa.

4.3 ANALYSE QUANTITATIVE

L'analyse quantitative des IGFBPs se veut un outil permettant de suivre les rendements et les facteurs de purification des étapes d'isolation des deux protéines recherchées. La liaison à l'^{125}I-IGF-I n'étant pas spécifique pour chaque espèce d'IGFBP, ce test ne peut apporter une mesure aussi précise qu'un RIA. Un test immunologique aurait nécessité des anticorps spécifiques, ce qu'on ne disposait pas.

Plusieurs contraintes occasionnées par les caractéristiques physico-chimiques des échantillons sont à considérer. Même si les pH des échantillons analysés furent ajustés à 6,5, la salinité des milieux a pu influencer l'affinité entre les IGFBPs et l'IGF-I. Egalement, il aurait été préférable de séparer les IGFBPs des IGFs présents dans le milieu, ces derniers interférant avec l'IGF-^{125}I. Cependant, aucune méthode ne fut efficace, avec un rendement optimal en IGFBP, pour éliminer les IGFs ou encore pour extraire les IGFBPs.

La mesure quantitative des IGFBPs est linéaire pour des pourcentages de liaison relativement faibles. Il y aurait saturation des IGFBPs lorsque plus de 13% des ^{125}I-IGF-I y sont liés. Des situations similaires furent obtenus par Binoux et collaborateurs avec des échantillons d'IGFBPs provenant de différentes espèces[10]. Cette saturation pourrait être occasionnée par la présence des IGFs provenant du milieu. Bien qu'avec 20 000 cpm d'^{125}I-IGF-I (2000 Ci/mmol), l'équilibre devrait favoriser la liaison avec l'IGF marqué, la stabilité des complexes déjà formés avant l'incubation empêcherait les liaisons de s'établir. Même en augmentant la quantité de marqueur, les pourcentages de liaison n'ont guère augmenté. On n'explique pas très bien, cependant, la remontée observée sur la courbe de linéarité, remontée qui s'est reproduite lors des 4 essais de linéarité effectués.

Des dilutions appropriées furent donc produites afin que les pourcentages de liaison obtenus tombent dans la partie linéaire de la courbe. Malgré le manque de spécificité et de précision du test de liaison, il a l'avantage d'être accessible en début de purification des IGFBPs, celles-ci étant nécessaires pour des tests plus spécifiques à chaque espèce d'IGFBPs.

4.4 ANALYSES QUALITATIVES

Les analyses qualitatives effectuées pour vérifier la pureté des protéines isolées et évaluer leur PM ont généré des renseignements très utiles sur les IGFBPs. Les techniques d'isolation des IGFBPs furent modifiés pour atteindre le maximum de pureté lors du SDS-PAGE des échantillons des étapes finales. Toutefois, un suivi de toutes les étapes de purification par SDS-PAGE ne donnait pas de résultats visibles, les concentrations d'IGFBPs étant trop faibles comparées aux autres protéines. Le transfert Western, quant à lui, ne permet pas d'évaluer la pureté des IGFBPs, mais plutôt d'en vérifier la présence et de mesurer leur PM. L'intensité des bandes ne peut apporter d'évaluation quantitative puisqu'aucune mesure volumique des échantillons ne fut exécutée, le but étant d'identifier les IGFBPs et leur capacité de liaison à l'IGF-I. La trop forte stabilité des complexes de 150 kDa est à considérer puisqu'aucune IGFBP ne fut détectée dans le plasma. Tout comme le transfert Western, la filtration sur gel permettait de vérifier le PM des protéines capables de lier l'IGF-I, à la différence que l'incubation avec le marqueur radioactif était effectuée avant la séparation.

L'évaluation de la pureté des protéines par les techniques électrophorétiques et de révélation avec l'^{125}I-IGF-I ont apporté une indication importante sur la reconnaissance des IGFBPs par leur PM. Considérant l'existence de nombreuses IGFBPs de PMs différents, il ne peut être certifié que les protéines isolées soient

bien celles recherchées. Cette certitude aurait pu être apportée par la reconnaissance avec un anticorps spécifique pour chaque espèce d'IGFBPs. Le PM, par lui-même, est un indicateur quelque peu incertain puisque différents PMs sont retrouvés pour chaque espèce d'IGFBPs dans la littérature[7,37,51,61], comme ce fut le cas pour les différentes techniques effectuées ici.

4.5 DOSAGE DE L'IGF-I

L'efficacité du dosage de l'IGF-I par RIA est directement liée à la qualité de l'extraction de cette protéine. Le pourcentage de récupération des IGFs diffère selon que l'^{125}I-IGF-I soit dans un échantillon de plasma ou dans le tampon phosphate. La présence des IGFBPs ou autres molécules du plasma peut avoir un impact sur la récupération. Le rendement de 65% pour la récupération de l'IGF-I de l'échantillon plasmatique est très acceptable, et surtout, il démontre de la constance.

Lors de l'évaluation du rendement, la présence de complexes stables entre les IGFs et leurs protéines de transport doit être considérée. La perte réelle des ^{125}I-IGF-I a pu avoir été atténuée par les IGFs déjà présents dans le milieu et liés aux IGFBPs, empêchant ainsi les IGF-I marqués de s'y lier lors de la première incubation (plasma + ^{125}I-IGF-I). L'incubation en milieu acide qui suivit devait entraîner une séparation des complexes; toutefois, aucun résultat ne peut confirmer que tous les complexes furent bien dissociés. L'obtention d'un rendement de 65%

ne pourrait être que le rendement des IGFs libres, soit les marqueurs ayant été incapables de se lier aux IGFBPs.

La vérification de la présence d'IGFBPs a pu elle aussi avoir été faussée par la présence de complexes stables. Que ce soit par une incubation avec de l'^{125}I-IGF-I post-extraction ou pré-extraction, les molécules naturelles d'IGF-I, fortement liées aux IGFBPs, empêcheraient le marqueur de s'y lier.

La perte des IGF-I lors de l'extraction ne peut être comparée aux diminutions qu'apporteraient la présence des IGFBPs lors du dosage par RIA. Le dosage de l'IGF-I total nécessiterait un anticorps qui reconnaisse cette protéine tant sous sa forme libre que sous sa forme liée; l'extraction des IGF-I ne serait plus nécessaire. Les doutes soulevés et concernant la présence des IGFBPs suite à l'extraction, c'est-à-dire une mauvaise extraction ou encore un test de liaison faussé par la présence de complexes stables, persistent pour le RIA. La présence de complexes stables empêcheraient les IGF-I d'être dosés en totalité[33].

Quoiqu'il en soit, l'interaction des IGFBPs en compétition avec l'anticorps s'est avérée atténuée suite à l'extraction. La concentration en IGF-I pour l'échantillon de plasma est élevée en comparaison des valeurs attendues[44]. L'élimination des IGFBPs pourrait en être la cause.

4.6 CONCLUSION GÉNÉRALE

Les étapes d'isolation de l'IGFBP-3 n'ont pu être suivies de manière détaillée à cause des irrégularités des analyses quantitatives. Celles-ci ont tout de même permis de contourner certains problèmes survenus au cours de la mise au point du cheminement de cette isolation, et ainsi permettre l'obtention d'IGFBP-3 presque pure. Bien que plusieurs cheminements différents furent mis à l'essai, peu de modifications furent apportées à la méthode de Martin et Baxter, outre le changement de solution d'élution lors de la chromatographie d'affinité. Malgré le fait que la pureté de l'IGFBP-1 ne soit pas idéale, cette protéine fut isolée avec d'excellents rendements et facteurs de purification.

L'important, avant d'utiliser ces protéines pour des dosages immunologiques, est de vérifier leur capacité à être reconnues par leur anticorps, et l'influence qu'auraient les impuretés présentes. Il faut souligner que le marquage radioactif des protéines, en vue d'une utilisation comme antigènes radioactifs pour les RIA des IGFBPs, va apporter une étape supplémentaire de purification, lors de la séparation par filtration sur gel des portéines marquées et non-marquées, ce qui peut résulter en une pureté idéale pour chacune des protéines isolées.

En ce qui concerne le dépistage d'une consommation de GH par les athlètes,

l'IGFBP-3 pourrait être une bonne indicatrice puisque sa concentration fluctue essentiellement en fonction de celle de la GH. L'IGFBP-1, pour sa part, n'est pas contrôlée de la sorte. Le dépistage pourrait également être produit en mesurant la concentration totale d'IGFs. Comme la synthèse de ceux-ci est influencée par la GH, et que leur niveau sanguin est maintenu par l'IGFBP-3, donc indirectement par la GH, ces protéines reflètent bien la concentration de GH. Leur concentration plasmatique est équimolaire à celle de l'IGFBP-3 et leur sortie des vaisseaux ne la soumet pas à des fluctuations importantes. Leur dosage pourrait donc être effectué sans avoir à tenir compte de nombreux facteurs physiologiques, sachant de plus que les méthodes de dosages des IGFs sont plus avancées à ce jour que celles des IGFBPs. Des études sur les effets de l'activité physique, combinée ou non à une consommation de GH, permettraient de confirmer si le dosage des IGFs est un bon indicateur d'un dopage à la GH. Leur dosage est d'ailleurs effectué en milieu clinique pour suivre les traitements de patients au prise avec des problèmes relatifs à la GH.

CINQUIÈME CHAPITRE

5. RÉFÉRENCES

5. RÉFÉRENCES

1. Baumann, G. (1990) Growth hormone-binding proteins. Trends in Endocrinol. Metab., **1**, 342-347.

2. Baumann, G. (1989) Molecular variants of human growth hormone in serum and circulating growth hormone binding proteins. dans **Hormonal regulation of growth**, ed. Frish et Thorner, Raven Press, New York, pp 175-184.

3. Baumann, G., K. Amburn et M.A. Shaw (1988) The circulating growth hormone (GH)-binding protein complex: A major constituant of plasma GH in man. Endocrinology, **122**, 976-984.

4. Baumann, G., M.A. Shaw et R.J. Winter (1987) Absence of the plasma growth hormone-binding protein in laron-type dwarfism. J. Clin. Endocrinol. Metab., **65**, 814-816.

5. Baumann, G., K.D. Amburn et T.A. Buchanan (1987) The effect of circulating growth hormone-binding protein on metabolic clearance, distribution, and degradation of human growth hormone. J. Clin. Endocrinol. Metab., **64**, 657-660.

6. Baxter, R.C. et C.T. Cowell (1987) Diurnal rythm of growth hormone-independent binding protein for insulin-like growth factors in human plasma. J.Clin. Endocrinol. Metab., **65**, 432-440

7. Baxter, R.C., J.L. Martin, M.I. Tyler et M.E.H. Howden (1986) Growth hormone-dependent insulin-like growth factor (IGF) binding protein from human plasma differs from other human IGF binding proteins. Bcm and Boiphys. Res. Com., **139**, 1256-1261.

8. Bell, G.I., D.S. Gerhard, N.M. Fong, R. Sanchez-Pescador et L.B. Rall (1985) Isolation of the human insulin-like growth factor genes: insulin-like growth factor II and insulin genes are contiguous. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **82**, 6450-6454.

9. Berelowitz, M., M. Szabo, L.A. Frohman, S. Firestone, L. Chu et R.L. Hintz (1981) Somatomedin-C mediates growth hormone negative feedback by effects on both the hypothalamus and the pituitary. Science, **212**, 1279-1281.

10. Binoux M., D. Seurin, C. Lassarre et M. Gourmelen (1984) Preferential measurement of insulin-like growth factor (IGF) I-related peptides in serum with aid of IGF-binding proteins (IGF BPs) produced by rat liver in culture. Estimation of serum IGF BP levels. Jour. Clin. Endo. and Metabo., **53**, 453-462.

11. Blethen, D.L.S, W.H. Daughaday et V.V. Weldon (1982) Kinetics of the somatomedin C/insulin-like growth factor I: response to exogenous growth hormone (GH) in GH-deficient children. J. Clin. Endocrinol. Metab., **54**, 986-990.

12. Blum W.F., M.B. Ranke, K.Kietzmann et J.R. Bierich (1988) Somatomedin binding protein (SmBP) in normals and in growth hormone deficiency (GHD). Pediatr. Res. **24**, 522 no 31

13. Braulke, T., C. Causin, A. Waheed, U. Junghans, A. Hasilik, P. Malay, R.E. Humbel et K. von Figura (1988) Mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor: distinct binding sites for mannose 6-phosphate and insulin-like growth factor II. Biochem. Biophys. Res. Comm., **150**, 1287-1293.

14. Bratusch-Marrain, P.R., D. Smith et R.A. De Fronzo (1982) The effect of growth hormone on glucose metabolism and insulin secretion in man. J. Clin. Endocrinol. Metab., **55**, 973-982.

15. Brismar, K., M. Gutniak, G. Povoa, S. Werner et K. Hall (1988) Insulin regulate the 35 kDa IGF binding protein in patients with diabetes mellitus. J. Endocrinol. Invest., **11**, 591-594.

16. Busby Jr, W.H., D.G. Klapper et D.R. Clemmons (1988) Purification of a 31 000 - Dalton insulin-like growth factor binding protein from human amniotic fluid. J. Biol. Chem., **263**, 14203-14210.

17. Chevenne, D. (1991) Les somatomédines. Ann. Biol. Clin., **49**, 69-91.

18. Cianfarani, S. et J.P.M. Holly (1989) Somatomedin-binding proteins: What role do they play in the growth process? Eur. J. Pediatr., **149**, 76-79.

19. Clemmons, D.R., D.K. Snyder, R. Williams et L.E. Underwood (1987) Growth hormone administration conserves lean body mass during dietary restriction in obese subjects. J. Clin. Endocrinol. Metab., **64**, 878-883.

20. Clemmons D.R., L.E. Underwood, P.G. Chatelais et J.J. Van Wyk (1983) Liberation of immunoreactive somatomedin-C from its binding proteins by proteolytic enzymes and heparin. J. Clin. Endocrinol. Metab., **56**, 384-389.

21. Czech, M.P. (1989) Signal transmission by the insulin-like growth factors. Cell, **59**, 235-238.

22. Daughaday, W.H., K. Hall, W.D. Salmon Jr, J.L. van den Brande et J.J. van Wyk (1987) On the nomenclature of the somatomedins and insulin-like growth factors. J. Clin. Endocrinol. Metab., **65**, 1075-1076.

23. Daughaday, W.H., K. Hall, M.S. Raben, W.D. Salmon Jr, J.L. van den Brande et J.J. van Wyk (1972) Somatomedin: Proposed designation for sulphation factor. Nature Lond., **235**, 107.

24. D'Ercole, A.J., A.D. Stiles et L.E. Underwood (1984) Tissue concentrations of somatomedin-C: Further evidence for multiple sites of synthesis and paracrine or autocrine mechanisms of action. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **81**, 935-939.

25. D'Ercole, A.J., C.D. Decedue, R.W. Furlanetto, L.E. Underwood et J.J. Van Wyk (1977) Evidence that somatomedin-C is degraded by the kidney and inhibits insulin degradation. Endocrinology, **101**, 577-586.

26. Di Pasquale, M.G. (1986) Drug use and detection in amateur sport: Update number one. M.G.D. Press, Warkworth, Ontario, p.7.

27. Elgin, R.G., W.H. Busby Jr et D.R. Clemmons (1987) An insulin-like growth factor (IGF) binding protein enhances the biologic response to IGF-I. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **84**, 3254-3258.

28. Enberg, G. et K. Hall (1984) Immunoreactive IGF-II in serum of healthy subject and patients with growth hormone disturbances and uraemia. Acta Endocrinol., **107**, 164-170.

29. Florini, J.R., P.N. Prinz, M.V. Vitiello et R.L. Hintz (1985) Somatomedin-C level in healthy young and old man: Relationship to peak and 24-hours integrated level of growth hormone. J. of Gerontology, **40**, 2-7.

30. Froesch, E.R., H. Biirgi, E.B. Ramseier, P. Bally et A. Labhart (1963) Antibody-suppressible and non-suppressible insulin-like activities in human serum and their physiologic significance. An insulin assay with adipose tissue of increased precision and specificity. J. Clin. Invest., **42**, 1816-1834.

31. Furlanetto, R.W. et J.M. Marino (1987) Radioimmunoassay of somatomedin C / insulin-like growth factor I. Methods in Enzym., **146**, 216-226.

32. Glick, S.M., J. Roth, R.S. Yalow et S.A. Berson (1965) The regulation of growth hormone secretion. Rec. Prog. Horm. Res., **21**, 241-283

33. Giannella-Neto, D., A.M. Vavaleiro, R. Sadoyama, B.L. Wajchenberg et E.M. Spencer (1990) Evaluation of a radioimmunoassay for somatomedin-C / insulin-like growth factor I (Sm-C/IGF-I) in human plasma. Clinica Chimica Acta, **188**, 253-260.

34. Hall, K., K. Brismar et M. Thorén (1988) Update on somatomedin. Acta Pediatr Scand., **347**, 87-92.

35. Hall, K., G.Lundin et G. Povoa (1988) Serum level of the low molecular weight form of insulin-like growth factor binding protein in healthy subjects and patients with growth hormone deficiency, acromegaly and anorexia nervosa. Acta Endocrinol., **118**, 321-326.

36. HAll, K. et V.R. Sara (1984) Somatomedin levels in childhood, adolescence and in adult life. J. Clin. Endocrinol. Metab., **13**, 91-112.

37. Hardoin, S., M. Gourmelen, P. Noguiez, D. Seurin, M. Goghani, Y. Lebouc, G. Povoa, T.J. Merimee, P. Hossenlopp et M. Binoux (1989) Molecular forms of serum insulin-like growth factor (IGF)-binding protein in man: Relationships with growth hormone and IGFs and physiological significance. J. Clin. Endocrinol. Metab., **69**, 1291-1301.

38. Hintz, R.L. (1990) Role of growth-hormone and insulin-like growth-factor-binding proteins, Horm. Res. **33**, 105-110.

39. Hintz, R.L., F. Liu, R.G. Rosenfeld et S.F. Kemp (1981) Plasma somatomedin-binding proteins in hypopituitarism: Changes during growth hormone therapy. J. Clin. Endocrinol. Metab., **53**, 100-104.

40. Ho, K.Y., W.S. Evans, R.M. Blizzard, J.D. Veldhuis, G.R. Merriam, E.Samojlik, R. Furlanetto, A.D. Rogol, D.L. Kaiser et M.O. Thorner (1987) Effects of sex and age on the 24-hour profile of growth hormone secretion in man: Importance of endogenous estradiol concentrations. J. Clin. Endocrinol. Metab., **64**, 51-58.

41. Holly, J.P.M. et J.A.H. Wass (1989) Insulin-like growth factors; autocrine, paracrine or endocrine? New perspectives of the somatomedin hypothesis in the light of recent developments. J. of Endocrinol., **122**, 611-618.

42. Holly, J.P.M., R.A. Biddlecombe, D.B. Dunger, J.A. Edge, S.A. Amiel, R. Howell, T. Chard, L.H. Rees et J.A.H. Wass (1988) Circadian variation of GH-independent IGF-binding protein in diabetes mellitus and its relationship to insulin. A new role for insulin. Clin. Endocrinol., **29**, 667-675.

43. Hossenlopp, P., D. Seurin, B. Segovia-Quinson, S. Hardouin et M. Binoux. (1986) Analysis of serum insulin-like growth factor binding proteins using Western blotting: Use of the method for titration of the binding proteins and competitive binding studies. Analytical Biochemistry, **154**, 138-143

44. Immuno Nuclear Corporation (1984) Somatomedin C by radioimmunoassay, methods and reagents. Cat no 53065.

45. Koistinen, R., N. Kalkkinen, M.-L. Huhtala, M. Seppala, H. Bohn et E.-M. Rutanen (1986) Placental protein 12 is a decidual protein that binds somatomedin and has an identical N-terminal amino acid sequence with somatomedin-binding protein from human amniotic fluid. Endocrinol., **118**, 1375-1378.

46. Kojima, I., H. Matsunaga, K. Kurokawa, E. Ogata et I. Nishimoto (1988) Calcium influx: An intracellular message of the mitogenic action of insulin-like growth factor I. J. Biol. Chem., **263**, 16561-16567.

47. Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of stuctural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, **227**, 680-685.

48. Leung, D.W., S.A. Spencer, G. Cachianes, R.G. Hammonds, C. Collins, W.J. Henzel, R. Barnard, M.J. Waters et W.I. Wood (1987) Growth hormone receptor and serum binding protein: Purification, cloning and expression. Nature Lond., **330**, 537-543.

49. Li, C.H. et H. Papkoff (1956) Preparation and properties of growth hormone from human and monkey pituitary glands. Science, **124**, 1293-1294.

50. Macintyre, J.G. (1987) Growth hormone and athletes, Sports Medecine, **4**, 129-142.

51. Martin, J.L. et R.C. Baxter (1986) Insulin-like growth factor-binding protein from human plasma. Jour. Biol. Chem., **261**, 8754-8760.

52. Martin J.L. et R.C. Baxter (1985) Antibody against acid-stable insulin-like growth factor binding protein detects 150 000 mol wt growth hormone-dependent complex in human plasma. J. Clin. Endocrin. Metab., **61**, 799-801

53. Melmed, S. (1984) Insulin supresses growth hormone secretion by rat pituitary cells. J. Clin. Invest., **73**, 1425-1433.

54. Merimee, T.J., J. Zapf et E.R. Froesh (1982) Insulin-like growth factors in the fed and fasted states. J. Clin. Endocrinol. Metab., **55**, 999-1002.

55. Michel, G., W. Schwarz et W.P. Bieger (1985) Exercise-induced regulation of insulin receptor affinity: Role of circulating metabolites. Int. J. Sports Med., **6**, 100-106.

56. Molitch, M.E. (1986) Growth hormone hypersecretory states. dans **Human growth hormone**, ed. Raiti et Tolman. Plenum Medical Book Company, New York, pp 29-50.

57. Morgan, D.O., K. Jarnagin et R.A. Roth (1986) Purification and caracterization of the receptor for insulin-like growth factor I. Biochemistry, **25**, 5560-5564.

58. Parker, M.L., R.D. Utiger et W.H. Daugheday (1962). Studies on human growth hormone. II. The physiological dispositon and metabolic fate of human growth hormone in man. J. Clin. Invest., **41**, 262-268.

59. Parks, J.S. (1988) Neuroendocrine regulation of growth hormone secretion. dans **Basic and clinical aspects of growth hormone**, ed. Bercu, Plenum Press, New York, pp 105-106.

60. Pierson R.W. et H.M. Temin (1972) The partial purification from calf serum of a fraction with multiplication-stimulation activity for chicken fibroblasts in cell culture and with non-suppressible insulin-like activity. J. Cell. Physiol., **79**, 319-330.

61. Povoa, G., G. Enberg, H. Jörnvall et K. Hall (1984) Isolation and characterization of somatomedin-binding protein from mid-term human amniotic fluid. Eur. J. Biochem., **144**, 199-204.

62. Povoa, G., A. Roovete et K. Hall (1984) Cross-reaction of serum somatomedin-binding protein in a radioimmunoassay developed for somatomedin-binding protein isolated from human amniotic fluid. Acta Endocrinol., **107**, 563-570.

63. Press, M. (1988). Growth hormone and metabolism. Diabetes/Metabolism Reviews, **4**, 391-414.

64. Rechler, M.M., J. Zapf, S.P. Nissley, E.R. Froesh, A.C. Moses, J.M. Podskalny, E.E. Shilling et R.E. Humbel (1980) Interactions of insulin-like growth factors I and II and multiplication-stimulating activity with receptors and serum carrier proteins. Endocrinology, **107**, 1451-1459.

65. Rinderknecht,E. et R.E. Humbel (1978) The amino acid sequences of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. J. Biol. Chem., **253**, 2769-2776.

66. Rinderknecht, E. et R.E. Humbel (1978) Primary structure of human insulin-like growth factor II. FEBS Letters, **89**, 283-286.

67. Ritvos, O., T. Ranta, J. Jalkanen, A.-M. Suikkari, R. Voutilainen, H. Bohn et E.M. Rutanen (1988) Insulin-like growth factor (IGF) binding protein from human decidua inhibits the binding and biological action of IGF-I in cultured choriocarcinoma cells. Endocrinol., **122**, 2150-2157.

68. Rudd, B.T. (1991) Growth, growth hormone and the somatomedins: A historical perspective and current concepts. Ann. Clin. Biochem., **28**, 542-555.

69. Rudman, D., M.H. Kutner, M. Rogers, M.F. Lubin, G.A. Fleming et R.P. Baine (1981). Impaired growth hormone secretion in the adult population. J. Clin. Invest., **67**, 1361-1369.

70. Rutanen, E.M., F. Pekonen et T. Makinen (1988) Soluble 34K binding protein inhibits the binding of insulin-like growth factor I to its cell receptors in human secretory phase endometrium: Evidence for autocrine/paracrine regulation of growth factor action. J. Clin. Endocrinol. Metab., **66**, 173-180.

71. Salmon, W.D. et W.H. Daughaday (1957) A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage ***in vitro***. J. Lab. Clin. Med., **49**, 825-836.

72. Salomon, F. et P.H. Sönksen (1987). Physiological role of growth hormone in adult life. Acta Poediatr. Scand., **337**, 158-163.

73. Sara, V.S. et K. Hall (1990) Insulin-like growth factors and their binding proteins. Amer. Phys. Society. **70**, 591-614.

74. Scott, D.C., J.L. Martin et R.C. Baxter (1985) Production of insulin-like growth factor I and its binding protein by adult rat hepatocytes in primary culture. Endocrinol., **116**, 1094-1101.

75. Shephard, R.J. et K.H. Sidney (1975) Effects of physical exercise on plasma growth hormone and cortisol levels in human subjects. dans **Exercise and sport sciences reviews**, ed. Wilmore et Keough. Academic Press, New York, pp 1-30.

76. Strauss, D.S. et C.D. Takemoto (1990) Effect of dietary protein deprivation on insulin-like growth factor (IGF)-I and -II, IGF binding protein-2, and serum albumin gene expression in rat, Endocrinology, **127**, 1849-1859.

77. Suikkari, A.-M., T. Sane, M. Seppala, H. Yki-Jarvinen, S.-L. Karonen et V.A. Koivisto (1989) Prolonged exercice increases serum insulin-like growth factor-binding protein concentrations. J. Clin. Endocrinol. Metab., **68**, 141-144.

78. Tally, M., G. Enberg, C.H. Li et K. Hall (1987) The specificity of the human IGF-2 receptor. Biochem. Biophys. Res. Commun., **147**, 1206-1212.

79. Tannenbaum, G.S. et N. Ling (1984). The interrelationship of growth hormone(GH)-releasing factor and somatostatin in generation of the ultradian rhythm of GH secretion. Endocrinology, **115**, 1952-1957.

80. Tanner, J.M., P.C.R. Hughes et R.H. Whitehouse (1977) Comparative rapidity of response of height, limb muscle and limb fat to treatment with human growth hormone in patients with and without growth hormone deficiency. Acta Endocrinol., **84**, 681-696.

81. Underwood, L.E., D.R. Clemmons, M. Maes, A.J. D'Ercole et J.-M. Ketelslegers (1986) Regulation of somatomedin-C/insulin-like growth factor I by nutrients. Horm. Res., **24**, 166-176.

82. Voy, R. et K.D. Deeter (1991), Vogue: Growth hormone, blood doping and erythropoietin. dans **Drugs, sport, and politics**, Ed. Leisure Press, Illinois, pp 57-66.

83. Wang, H.S., L.A. Perry, J. Kanisius, R.K. Iles, J.P.M. Holly et T. Chard (1991) Purification and assay of insulin-like growth factor-binding protein-1: measurement of circulating levels throughout pregnancy. J. Endocrinol., **128**, 161-168.

84. Weaver, J.V., J.P.M. Holly, P.G. Kopelman, K. Noonan, C.G. Giadom, N. White, S. Virdee et J.A.H. Wass (1990) Decreased sex hormone binding globulin (SHBG) and insulin-like growth factor binding protein (IGFBP-1) in extreme obesity. Clin. Endocrinol., **33**, 415-422.

85. West, E.S., W.R. Todd, H.S. Mason et J.T. Van Bruggen (1986) **Textbook of Biochemistry**, 4e édition, Ed. The Macmillan Company, New York, pp 570-572.

86. Williams, T., M. Berelowitz, S.N. Joffe, M.O. Thorner, J. Rivier, W. Vale et L.A. Frohman (1984) Impaired growth hormone response to growth hormone-releasing factor in obesity. N. Engl. J. Med., **311**, 1403-1407.

87. Wood, W.I., G. Cachianes, W.J. Henzel, G.A. Winslow, S.A. Spencer, R. Hellmiss, J. L. Martin et R.C. Baxter (1988) Cloning and expression of the growth hormone-dependent insulin-like growth factor-binding protein. Mol. Endocrinol., **2**, 1176-1185.

88. Yeoh, S.I. et R.C. Baxter (1988) Metabolic regulation of the growth hormone independent insulin-like growth factor binding protein in human plasma. Acta Endocrin. **119**, 465-473.

89. Zapf, J., C. Hauri, M. Waldvogel et E.R. Froesch (1986) Acute metabolic effects and half-lives of intravenously administered insulin-like growth factors I and II in normal and hypophysectomized rats. J. Clin. Invest., **77**, 1768-1775.

90. Zapf, J., C. Schimd et E.R. Froesch (1984) Biological and immunological properties of insulin-like growth factors (IGF) I and II. J. Clin. Endocrinol. Metab., **13**, 3-30.

91. Zapf, J., B. Morell, H. Walter, Z. Laron et E.R. Froesch (1980) Serum level of insulin-like growth factor (IGF) and its carrier protein in various metabolic disorders. Acta Endocrinol., **95**, 505-517.