



**INTRODUCTION GENERALE ..... 1**

**CHAPITRE 1: EXPOSE BIBLIOGRAPHIQUE**

**I - INTRODUCTION ..... 8**

- I.1 Somatostatine..... 8
- I.2 Sécrétion et maturation des protéines..... 12
- I.3 Prosomatostatines ..... 13

**II - PRODUCTION DE PEPTIDES PAR DES LIGNEES CELLULAIRES..... 20**  
**TUMORALES**

- II.1 Lignées cellulaires productrices de somatos-  
tatine ..... 21
- II.2 Lignée cellulaire productrice d'insuline :..... 26  
La lignée RINm5F
- II.3 Autres lignées cellulaires productrices de  
peptides ..... 30

**CHAPITRE 2 : MATERIELS ET METHODES**

**I - MATERIELS ..... 38**

**II- METHODES ..... 39**

**II.A Dosages radioimmunologiques N et C terminaux  
de la somatostatine ..... 39**

- 1. Principe ..... 39
- 2. Dosage C terminal ou dosage S<sub>15-28</sub> ..... 40
- 3. Dosage N terminal ou dosage F<sub>1-14</sub> ..... 42

**II.B Techniques chromatographiques et électrophorétiques ..... 45**

- 1. Chromatographie de perméation sur gel Séphadex..... 45
- 2. Chromatographie liquide haute performance ..... 47
- 3. Techniques d'immuno-transfert des protéines ..... 51

### **CHAPITRE 3 : ANALYSE PAR IMMUNOTRANSFERT DES COMPOSES "SOMATOSTATINE"**

I - MISE AU POINT DE LA TECHNIQUE D'IMMUNO-TRANSFERT POUR LA DETECTION DES COMPOSES "SOMATOSTATINE" .....	60
II - ANALYSE PAR IMMUNO-TRANSFERT DES COMPOSES "SOMATOSTATINE" PRESENTS DANS DIFFERENTS EXTRAITS CELLULAIRES .....	69
III- ANALYSE PAR IMMUNO-TRANSFERT DES COMPOSES "SOMATOSTATINE" SECRETES DANS LE MILIEU DE CULTURE DES CELLULES RINT <sub>3</sub> .....	76
IV- DISCUSSION .....	85

### **CHAPITRE 4 : ETAPES DE PURIFICATION DE LA PROSOMATOSTATINE**

I - INTRODUCTION .....	95
II- DOSAGE C-TERMINAL OU DOSAGE S <sub>15-28</sub> .....	96
III- PREMIERE ETAPE DE PURIFICATION DE PROFORMES A PARTIR DU MILIEU DE CULTURE DES CELLULES RINT <sub>3</sub> : CHROMATOGRAPHIE DE TAMIS MOLECULAIRE .....	98
IV- DEUXIEME ETAPE DE PURIFICATION A PARTIR DU MILIEU DE CULTURE DES CELLULES RINT <sub>3</sub> : CLHP D'ECHANGE D'IONS .....	101
V - TROISIEME ETAPE DE PURIFICATION DU MILIEU DE CULTURE : CLHP DE PHASE INVERSE .....	109
VI- ESSAIS DE STIMULATION DE LA LIBERATION DE SOMATOSTATINE PAR LES CELLULES RINT <sub>3</sub> .....	117
VII- DISCUSSION .....	120

**DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSIONS** ..... 123

**ARTICLES**..... 129

**BIBLIOGRAPHIES**..... 131



ANALYSE DES FORMES MOLECULAIRES DE SOMATOSTATINE  
SECRETEES PAR UNE LIGNEE DE CELLULES TUMORALES ENDOCRINES  
DE PANCREAS DE RAT (RINT<sub>3</sub>) : IMMUNO-DETECTION ET  
PURIFICATION D'UN PRECURSEUR

Résumé :

Les peptides "somatostatine" jouent un rôle fondamental dans la régulation des fonctions neuro-endocrines, centrales et périphériques, ainsi que dans le contrôle de nombreux phénomènes sécrétoires et moteurs, en particulier au niveau digestif. A ce large spectre d'action, des travaux plus récents ajoutent un effet anti-prolifératif à la fois "in vivo" et "in vitro". Malgré cet effet, la biosynthèse et la sécrétion du peptide a été décrite pour des lignées cellulaires établies.

Ce travail montre que les cellules tumorales endocrines RINT<sub>3</sub> biosynthétisent et exportent de fortes quantités de somatostatine dosée par radioimmunologie. La somatostatine accumulée dans le milieu de culture n'inhibe pas la croissance de ces cellules. Devant cette apparente contradiction, nous avons décidé d'analyser plus précisément les formes moléculaires de somatostatine, produites par la lignée RINT<sub>3</sub> issue d'un cancer radio-induit chez le rat.

En effet, s'il est maintenant bien établi que les formes courtes somatostatine-15-28 (S<sub>15-28</sub>) et somatostatine-28 (S<sub>28</sub>) correspondent aux produits de maturation de précurseurs biosynthétiques, le rôle respectif de ces différentes formes n'est pas clairement défini.

La première partie de notre travail a été consacrée à la mise au point d'un immuno-transfert adapté à la détection des différentes formes moléculaires de somatostatine dans le milieu de culture. Par cette méthode, nous avons confirmé des résultats obtenus par analyses chromatographiques suivies de dosages radioimmunologiques, en faveur de l'exportation, dans le milieu de culture, de composés de haut poids moléculaire. Un précurseur de somatostatine de 15 kD est sécrété de façon prédominante. L'étude par immuno-transfert montre que ce dernier est identique à la prosomatostatine hypothalamique extraite du cortex de rat. Cette proforme est spécifiquement détectée par deux groupes d'anticorps dirigés contre des épitopes différentes de la S<sub>28</sub>. Une faible partie de ce précurseur est retrouvée sous une forme de plus haut poids moléculaire 29 kD convertible en 15 kD par réduction. Cette prédominance de précurseur dans le milieu extracellulaire suggère un défaut dans les processus de maturation post-traductionnels, conduisant à la production de formes non maturées. Ce défaut de maturation pouvant être lié à une modification de la structure primaire du précurseur, nous avons abordé par la suite une purification du peptide de 15 kD en vue de son séquençage.



Les paramètres mis en jeu pour purifier la prosomatostatine sont la taille, la charge et l'hydrophobicité.

Les modes de séparation par échange d'ions et polarité de phase inverse, utilisés en chromatographie liquide haute performance, ont été combinés. Ils ont permis de séparer plusieurs espèces immunoréactives, la proforme de 15 kD étant localisée dans les éluats par immuno-transfert. Si ces deux étapes enchainées procurent un coefficient de purification important, l'apport de la chromatographie de tamis moléculaire en étape préliminaire est très favorable pour l'élimination de protéines contaminantes de plus haut poids moléculaire. Cependant, les trois techniques chromatographiques ne peuvent être enchainées qu'après enrichissement sélectif du matériel en immunoréactivité.

Pour cela, des études de sécrétion en milieu minimum ont été réalisées. L'augmentation du calcium extracellulaire stimule de façon dose-dépendante la sécrétion de la somatostatine. De même, l'action d'un ester de phorbol tel que le TPA accélère cette sécrétion tandis que la CCK et la Forskoline n'ont qu'un faible effet. Ces résultats montrent que la libération de somatostatine dans le milieu de culture est stimuable.

Ce travail démontre qu'il existe bien un défaut de maturation dans la biosynthèse de la somatostatine, associé à l'exportation d'un précurseur dans le milieu. Son poids moléculaire a pu être établi à 15 kD. De plus, un enchainement de techniques permettant de purifier la proforme au sein des composants du milieu de culture a été proposé. Le milieu défini, correspondant à la collecte d'une solution stimulée par le calcium (5 mM), doit fournir un matériel adapté à la purification du précurseur.