

Rôle de la β -lactoglobuline dans l'activité proliférative du lactosérum

F Moulti-Mati ¹, A Mati ², J Capiaumont ¹, F Belleville ¹,
G Linden ², P Nabet ¹

¹ Université de Nancy I, faculté de médecine, laboratoire de biochimie,
BP 184, 54505 Vandœuvre Cedex, et Institut des biotechnologies de Nancy;

² Université de Nancy I, faculté des sciences, laboratoire de biochimie appliquée associé à l'INRA,
BP 239, 54506 Vandœuvre Cedex, France

(Reçu le 5 novembre 1990; accepté le 17 juin 1991)

Résumé — Le lactosérum est capable de remplacer le sérum de veau foetal (SVF) dans des cultures d'hybridomes à court terme (48 h). La β -lactoglobuline variant A ou A/B a la même activité mitogénique que le lactosérum. L'activité du variant B est significativement plus faible. Le maximum d'activité est obtenu pour des concentrations de 3 g/l variant A et A/B et de 0,75 g/l variant B. Pour la croissance cellulaire à plus long terme, 1% de SVF doit être ajouté au lactosérum. La β -lactoglobuline variant A/B (2,7 g/l) supplémenté par 1% de SVF a le même effet mitogénique que le lactosérum.

lactosérum / β -lactoglobuline / variant β -lactoglobuline / activité mitogénique / culture cellulaire

Summary — β -lactoglobulin part in mitogenic activity of bovine whey. Bovine whey is able to replace fetal calf serum (FCS) in short-term hybridoma culture (48 h). β -lactoglobulin (major protein of bovine whey) with a level of \approx 3 g/l variant A or A/B has the same effect as that of whey on DNA synthesis. The activity of variant B is significantly lower. The optimal mitogenic activity of variant A, A/B and B is obtained at concentrations of 3 g/l, 3 g/l and 0.75 g/l respectively. For monitoring cellular proliferation in long-term culture, the whey must be supplemented with 1% FCS. β -lactoglobulin variant A/B at 2.7 g/l (with 1% FCS) also promotes long-term proliferation and can replace whey. β -lactoglobulin or FCS (1%) used independently does not ensure cell survival.

whey / β -lactoglobulin / β -lactoglobulin variant / mitogen effect / cell culture

INTRODUCTION

Le lait humain ou bovin a été quelquefois utilisé en remplacement de sérums d'animaux pour compléter les milieux de culture (Klagsbrung, 1978; Sereni et Berserga, 1981). Dans des travaux précédents, nous avons montré que du lactosérum bovin pouvait remplacer le sérum de veau fœtal (SVF) dans la culture d'hybridomes à court terme (48 h). Pour des cultures à plus long terme, il faut ajouter au lactosérum 1% de SVF (Nabet *et al*, 1985; Linden *et al*, 1988; Damerdjij *et al*, 1988; Derouiche *et al*, 1990). Cependant, le lactosérum, comme le SVF, est un milieu complexe; afin d'obtenir un milieu de culture de composition mieux définie, nous avons tenté de remplacer le lactosérum par une protéine purifiée du lait. Nous avons choisi la β -lactoglobuline (β -Lg) qui est la protéine la plus abondante du lactosérum (environ 3 g/l). Elle représente environ 50% des protéines totales du lactosérum. Par ailleurs, ses caractéristiques physico-chimiques font d'elle un bon transporteur de substances hydrophobes, propriété intéressante en culture cellulaire.

La β -Lg est une chaîne polypeptidique de 162 acides aminés. On connaît 7 variants génétiques (A, B, C, D, E, F et G); seuls les variants A et B sont fréquemment rencontrés (Eigel *et al*, 1984). Ce polymorphisme a sans doute une signification biologique, par exemple, l'action inhibitrice sur la β -Lg de la phosphatase de la rate est fonction du variant; ainsi le pourcentage d'inhibition est de 40% pour le variant A, 22% pour le variant B et 12% pour le variant C (Farrell et Thomson, cités par Alais, 1984).

In vivo, son rôle biologique demeure inconnu; des travaux *in vitro* montrent que la β -Lg est capable de se lier à des substances hydrophobes : lipides (Brown, 1984; Diaz de Villegas *et al*, 1987), acides

gras (Polet-Spieker et Polet, 1981) et rétinol (Rask *et al*, 1979; Fugate et Song, 1980; Godovac-Zimmermann *et al*, 1985). D'ailleurs, la β -Lg présente des homologues de structure avec la *Retinol binding protein*; le résidu Trp 19 serait le site de fixation (Papiz *et al*, 1986; Godovac-Zimmermann et Braunitzer, 1987; Godovac-Zimmermann, 1988). Tout récemment, Said *et al* (1989) ont montré chez le rat que le rétinol pouvait être absorbé à travers l'intestin en se liant à la β -Lg bovine.

Dans le présent travail, nous avons étudié l'action mitogénique de différents variants de la β -Lg sur des cultures d'hybridomes. Parallèlement à la prolifération des cellules, nous avons testé la sécrétion des anticorps monoclonaux.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Préparation des protéines du lait (Société ASMAR, Corcieux, France)

Le lactosérum obtenu industriellement est concentré (6% en protéines), écrémé et filtré, puis il est porté quelques secondes à 84 °C et ultrafiltré à 50 °C avec une membrane à seuil de coupure 10 000 Da (10,5% en protéines). La solution de protéines est pasteurisée, concentrée par évaporation sous vide (55% en protéines), puis séchée en tour par la chaleur. Ces protéines sont appelées protéines du lait ou lactosérum lorsqu'elles sont remises en solution. Nous les utilisons généralement à la concentration de 20 g/l.

Purification de la β -lactoglobuline

La méthode utilisée est celle décrite par Lung *et al* (1987). Dans ce protocole, la β -Lg est isolée à partir du lactosérum par chromatographie d'échange d'ions sur DEAE Sephacel (Pharmacia, Suède). Le lactosérum est dialysé contre un

tampon Tris-HCl 0,1 mol/l, pH 7,5, 0,02 mol/l NaCl; le même tampon est utilisé pour équilibrer le DEAE Sephacel. Le mélange est filtré sous vide. Des tampons, de force ionique plus élevée, sont ensuite ajoutés successivement (0,04 mol/l et 0,25 mol/l en NaCl). La β -Lg est récupérée dans le dernier filtrat. Cette fraction est ensuite purifiée par chromatographie de filtration sur gel de Sephadex G100 (colonne 5 x 100 cm); un tampon phosphate de sodium 0,02 mol/l, pH 6,7, NaCl 0,1 mol/l est utilisé pour l'élu-tion.

La pureté de la β -Lg est vérifiée par électrophorèse PAGE en milieu non dissociant, en utilisant la méthode d'Hillier (1976) modifiée : électrophorèse verticale avec un gel (T : 9%, C : 2,7%) de 1,5 mm d'épaisseur, tampon de migration Tris 0,05 mol/l, glycine 0,07 mol/l, pH 8,3. La pureté est également vérifiée par chromatographie FPLC sur une colonne échangeuse d'anions (Mono Q).

Les variants A et B de la β -Lg ont été isolés à partir de lait de vaches homozygotes alors que le variant A/B provient d'un mélange de laits.

Culture de cellules

Deux souches d'hybridomes ont été utilisées : hybridome Mark 3, sécrétant un anticorps monoclonal IgG₁ anti-chaîne K des immunoglobulines de rat (don du Professeur Bazin, laboratoire d'immunologie expérimentale, faculté de médecine, Bruxelles), hybridome anti-HPL sécrétant une IgG₁ anti-hormone lactogène placentaire humaine préparé dans notre laboratoire; ces cellules sont entretenues en routine dans du RPMI 1640 (Seromed) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (Flow Laboratoires, lot 9042362 - Puteaux, France) chauffé à 56 °C pendant 30 min et 4 mmol/l de glutamine.

Test de croissance à court terme (mesure de la synthèse d'ADN)

Ce test est utilisé pour sélectionner les produits stimulant la croissance cellulaire. Les produits trouvés actifs sont ensuite testés en culture à plus long terme. Les suspensions cellulaires

(4 x 10⁵ cellules/ml) sont déposées dans des microplaques de 96 puits (Falcon, Becton, Dickinson, Grenoble, France) à raison de 100 μ l par puits; 100 μ l de produits à tester, dilués dans du RPMI sont ajoutés (6 déterminations sont faites pour chaque produit). Les plaques sont incubées 48 h à 37 °C dans un incubateur à 5% de CO₂ (Jouan EG 110 IR, France); 50 μ l de ³H thymidine à 1 μ Ci/ml (activité spécifique 4,5 Ci/mmol, Amersham, les Ulis, France) sont ajoutés pendant les dernières 24 h d'incubation. Les cellules sont collectées (Harvester Titertek Skatron) lavées, la radioactivité est comptée.

Test de prolifération cellulaire

Les cultures sont réalisées sans adaptation préalable des cellules aux milieux à tester; elles sont maintenues jusqu'à stabilisation ou chute de la prolifération cellulaire. Les cellules sont réparties dans des flacons statiques de 25 cm² à raison de 15 x 10⁴ cellules/ml. Lorsque les cellules sont à confluence (environ tous les 2 ou 3 jours), un comptage des cellules vivantes et mortes est effectué après coloration avec une solution de bleu trypan à 0,5%; puis les cellules sont réensemencées dans du milieu neuf, à la densité cellulaire de départ, c'est-à-dire 15 x 10⁴ cellules/ml.

Mesure de la sécrétion des immunoglobulines

Elle se fait par test ELISA (Douillard et Hoffman, 1983), en utilisant comme premier anticorps un sérum de chèvre anti-IgG de souris et un deuxième anticorps conjugué à la peroxydase (Tago, Burlingame, Etats-Unis).

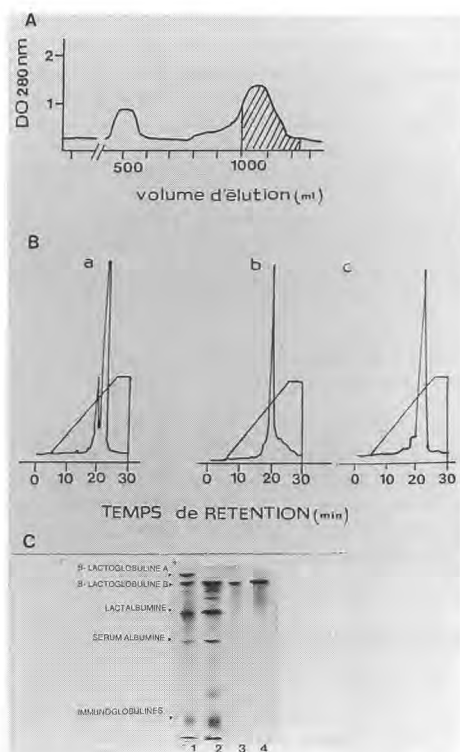
Tests statistiques

L'analyse statistique des données est traitée par le logiciel ANOVA, donnant les moyennes (m), les écart types (ET), le coefficient de variation (CV) et le test *t* de Student, pour la signification des résultats.

RÉSULTATS

Purification de la β -lactoglobuline

La figure 1 donne le chromatogramme obtenu après filtration sur gel. La zone hachurée représente le pic de lactoglobuline qui est recueilli. La chromatographie FPLC permet de calculer un degré de pureté qui est d'environ 98% pour les variants A/B et B. L'électrophorèse confirme que dans les fractions purifiées, seules apparaissent les bandes correspondant à la β -Lg.



Test de croissance à court terme

Différents variants de la β -Lg sont testés à différentes concentrations en présence ou non de sérum de veau fœtal à la concentration de 1%. Avec chaque série d'expériences, on fait un témoin positif (cellules cultivées en présence de 10% de SVF dans les mêmes conditions que les essais).

Les résultats sont consignés dans les figures 2A et 2B. La courbe dose-réponse est une courbe en cloche; de fortes concentrations en β -Lg sont inhibitrices.

Fig 1. Purification de la β -lactoglobuline. **A.** Filtration sur gel (Sephadex G100) des protéines issues de la chromatographie sur DEAE Sephacel, colonne 5 x 100 cm, tampon d'éluion phosphate de sodium 0,02 mol/l, pH 6,7, NaCl 0,1 mol/l, débit 60 ml/h, dépôt 1,5 g de protéines. **B.** Chromatographie FPLC; colonne échangeuse d'ions Mono Q. Tampon d'éluion : Tris-HCl 20 mmol/l, pH 7, gradient de NaCl 0-0,35 mol/l, (a) variant A/B, (b) variant B, (c) variant A. Débit d'éluion 1 ml/min. **C.** Electrophorèse verticale sur PAGE, milieu non dissociant, tampon de gel : Tris-HCl 0,38 mol/l, pH 8,9; tampon d'électrode : Tris 0,05 mol/l, glycine 0,07 mol/l, pH 8,3; courant continu 60 mA, 500 V, 30 W. Piste 1 : lactosérum contenant le variant A/B de la β -lactoglobuline; piste 2 : lactosérum contenant le variant B de la β -lactoglobuline; pistes 3 et 4 : β -lactoglobuline variant B purifié.

β -lactoglobulin purification. A. Gel filtration (Sephadex G100) of 1.5 g proteins from DEAE Sephacel batch chromatography, on a 5 x 100 cm column, with sodium phosphate elution buffer (0.02 mol/l pH 6.7, NaCl 0.1 mol/l), flow rate 60 ml/h. *B.* FPLC chromatography; ion exchange mono-Q column; elution buffer: Tris-HCl 20 mmol/l, pH 7, NaCl gradient 0-0.35 mol/l, (a) β -lactoglobulin variant A/B, (b) β -lactoglobulin variant B, (c) β -lactoglobulin variant A. Flow rate 1 ml/min. *C.* PAGE vertical electrophoresis in non dissociated medium; gel buffer: Tris-HCl 0.38 mol/l, pH 8.9; electrode buffer: Tris 0.05 mol/l, glycine 0.07 mol/l, pH 8.3; constant current : 60 mA, 500 V, 30 W. Lane 1 : whey containing β -lactoglobulin A/B; lane 2 : whey containing β -lactoglobulin B; lanes 3 and 4 : purified β -lactoglobulin B.

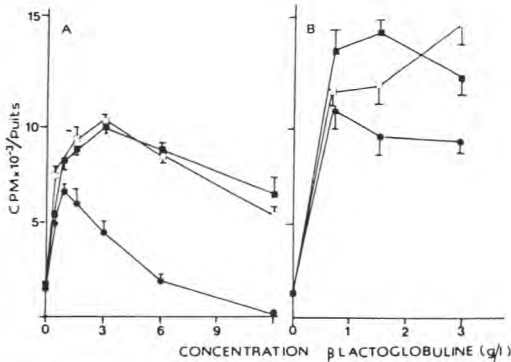


Fig 2. Test de croissance à court terme : mesure de l'incorporation de ³H thymidine dans l'ADN. Les variants de la β-lactoglobuline (□ variant A, ● variant B, ■ variant A/B) sont testés en absence de sérum de veau fœtal (A) ou en présence de 1% de sérum de veau fœtal (SVF) (B). Chaque résultat est la moyenne de 6 déterminations.

Short-term growth test: ³H thymidine incorporation into DNA. β-lactoglobulin variants (□, variant A; ●, variant B; ■, variant A/B) were tested in the absence of fetal calf serum (FCS) (A) or in the presence of 1% FCS (B). Each result represents the average of 6 replicates.

L'optimum d'activité est obtenu pour une concentration de 3 g/l pour les variants A et A/B, et pour une concentration de 0,75 g/l pour le variant B. L'activité maximale reste toujours inférieure à celle obtenue en présence de 10% de SVF pour les variants A, A/B, B. Le variant A est significativement plus actif que le variant B (P < 0,05, test ANOVA). En présence de 1% de SVF, l'activité mitogénique maximale augmente, elle atteint 71, 70, et 58% de celle du sérum de veau à 10% respectivement pour les variants A, A/B, B.

L'activité du lactosérum (20 g/l de protéines) est égale à 72% de celle du SVF, équivalente à celle des variants A et A/B.

Test de prolifération cellulaire

Ces expériences ont été réalisées sur 2 souches d'hybridomes (Mark 3 et anti-HPL). Le milieu de culture de base (RPMI 1640) a été supplémenté soit avec 10% de

SVF (témoin positif), soit avec 9% de lactosérum et 1% de SVF, soit 2,7 g/l de β-Lg variant A/B et 1% de SVF; cette concentration de β-Lg correspond aux taux physiologiques de la β-Lg dans le lait bovin et à l'optimum d'activité déterminés préalablement. A chaque passage est mesuré le nombre de cellules vivantes, de cellules mortes (figs 3 et 4). Dans le milieu de culture est dosé le taux d'immunoglobulines sécrétées (tableau I). Il n'y a pas de différence significative (test ANOVA) entre la prolifération cellulaire dans les milieux supplémentés en lactosérum et en β-Lg. Dans les 2 cas, la prolifération cellulaire représente environ 75% de celle obtenue dans le milieu supplémenté avec 10% de SVF. Il est à noter que le nombre des cellules mortes est plus faible dans les milieux supplémentés en lactosérum et β-Lg que dans celui supplémenté en SVF. Il n'y a pas de différence significative, dans la sécrétion des immunoglobulines, quel que soit le milieu utilisé.

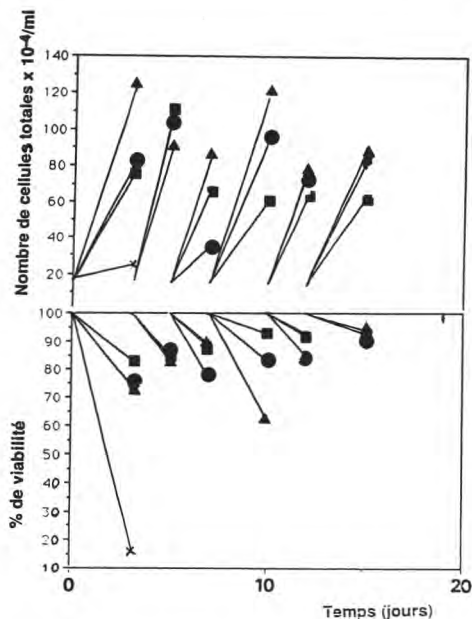


Fig 3. Prolifération de l'hybridome Mark 3 dans différents milieux de culture. ▲ : milieu supplémenté avec 10% de SVF; ■ : avec 2,7 g/l variant A/B de la β -lactoglobuline + 1% de SVF; ● : avec 9% de lactosérum (20 g/l de protéines) + 1% de SVF; X : avec 1% de SVF. A. Nombre total des cellules; B. Pourcentage des cellules vivantes. Les cellules sont ré-ensemencées tous les 2 ou 3 jours à la concentration de départ, c'est-à-dire 15×10^4 cellules vivantes/ml. Les résultats sont la moyenne de 3 flacons de 25 cm^2 et de 3 comptages par flacon.

Mark 3 hybridoma proliferation in different culture media. ▲: medium supplemented with 10% FCS; ■: supplemented with 2.7 g/l of β -lactoglobulin A/B + 1% FCS; ●: supplemented with 9% whey + 1% FCS; X: supplemented with 1% FCS. A. Percentage of living cells. B. Number of dead cells. The cells were seeded again each for 2 or 3 days at the same initial concentration (15×10^4 living cells/ml). The results were the average of 3 $\times 25 \text{ cm}^2$ flasks and 3 counts per flask.

Rôles respectifs du sérum de veau et de la β -lactoglobuline

Les expériences précédentes de prolifération cellulaire ont été menées en mainte-

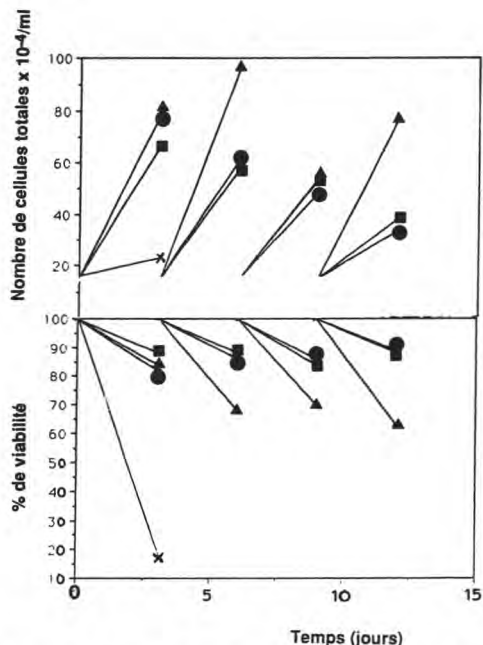


Fig 4. Prolifération de l'hybridome anti-HPL dans différents milieux de culture. ▲ : milieu supplémenté avec 10% de SVF; ■ : avec 2,7 g/l variants A/B de la β -lactoglobuline + 1% SVF; ● : avec 9% de lactosérum (protéines 20 g/l) + 1% SVF; X : avec 1% de SVF. A. Nombre de cellules vivantes; B. Pourcentage des cellules vivantes. Les cellules sont ré-ensemencées tous les 2 ou 3 jours à la concentration de départ, c'est-à-dire 15×10^4 cellules vivantes/ml. Les résultats sont la moyenne de 3 flacons de 25 cm^2 et de 3 comptages par flacon.

Anti-HPL hybridoma proliferation in different culture media. ▲: medium supplemented with 10% FCS; ■: supplemented with 2.7 g/l of β -lactoglobulin A/B + 1% FCS; ●: supplemented with 9% whey + 1% FCS; X: supplemented with 1% FCS. A. Total number of cells. B. Percentage of living cells. The cells were seeded each for 2 or 3 days at the same initial concentration (15×10^4 living cells/ml). The results were the average of 3 $\times 25 \text{ cm}^2$ flasks and 3 counts per flask.

nant 1% de SVF dans le milieu supplémenté avec la β -Lg. Il nous a paru intéressant de déterminer les rôles respectifs de la β -Lg et du SVF dans la prolifération cellulaire. Pour cela, deux séries d'expériences ont été réalisées.

Tableau I. Sécrétion d'anticorps monoclonaux en fonction du milieu de culture (mg/l). I) RPMI 1640 supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal; II) lactosérum 9% (20 g/l de protéines de lait) + 1% de SVF; III) β -lactoglobuline variant A/B (2,7 g/l) + 1% de SVF. Les résultats sont la moyenne obtenue sur les surnageants de 3 boîtes de 25 cm² testés chacun 3 fois. L'écart type est faible, toujours inférieur à $\pm 0,01$ mg/l.

Monoclonal antibody secretion according to culture medium composition (mg/l). I) RPMI 1640 supplemented with 10% fetal calf serum (FCS). II) Whey 9% (20 g/l milk proteins) + 1% FCS. III) Variant A/B of β -lactoglobulin (2.7 g/l) + 1% FCS. Results are the mean from supernatant of 3 culture boxes (25 cm²), each tested 3 times. The standard deviation is always less than ± 0.01 mg/l.

Temps de culture (j)	Hybridome Mark 3 Milieux			Hybridome anti-HPLC Milieux		
	I	II	III	I	II	III
3	15,1	15	15	10,5	11,1	10,9
5	13	19,1	16	—	—	—
6	—	—	—	11,5	10,8	10,2
7	16,2	10,7	15,5	—	—	—
9	17,3	19,7	17,1	10,5	9,7	11,8
11	15,1	15,1	15,1	—	—	—
12	—	—	—	11,9	10,3	10
15	13,1	15,1	15,1	—	—	—

Dans la première, on abaisse progressivement la concentration de SVF dans le milieu de culture de 10 à 1%. Les cultures sont maintenues 9–12 j, sauf pour la concentration de 1% de SVF où les cellules meurent au bout de 2–3 j. La figure 5 donne le nombre de cellules vivantes, comptées au 3^e j de culture, en fonction de la concentration en SVF. La prolifération cellulaire diminue progressivement, parallèlement à l'appauvrissement du milieu en SVF. Elle représente environ 63 et 38% de celle obtenue avec 10% de SVF, pour une concentration en SVF de 3 et 2% respectivement; une concentration à 1% de SVF ne peut assurer seule la croissance cellulaire à long terme.

Dans la seconde série d'expériences, 2,7 g/l de β -Lg variant A/B sont maintenus dans le milieu de culture et la concentration de SVF est diminuée de 1 à 0%. On

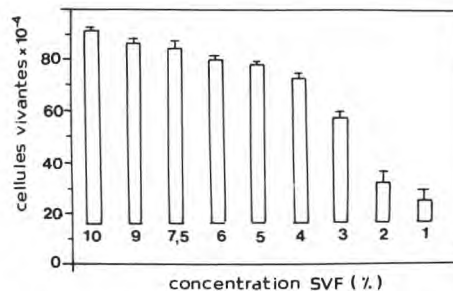


Fig 5. Prolifération de l'hybridome Mark 3 en fonction de la concentration en SVF dans le milieu de culture. Les cellules sont comptées au 3^e j de culture. Les résultats sont la moyenne des densités cellulaires de 3 flacons de 25 cm² et de 3 comptages par flacon.

Mark 3 hybridoma proliferation according to FCS concentration in the culture medium. The cells were counted on the third day of culture. The results were the average cell densities of 3 x 25 cm² and 3 counts per flask.

constate (fig 6) que la β -Lg seule est insuffisante pour permettre la prolifération à long terme. L'abaissement de la concentration en SVF entraîne une diminution significative de la croissance cellulaire ($P < 0,05$, test ANOVA) et de la sécrétion des immunoglobulines (tableau II).

DISCUSSION

Dans ce travail, nous avons vérifié si la β -Lg pouvait être utilisée comme agent mitogène dans les milieux de culture, en remplacement du lactosérum qui reste un milieu complexe. Cette protéine n'a pas été utilisée à notre connaissance pour la supplémentation des milieux de culture.

Des tests de croissance à court terme (synthèse d'ADN) révèlent des différences dans l'activité mitogénique des variants A et B, qui peuvent s'expliquer au moins en

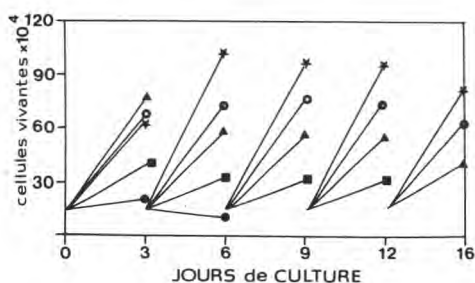


Fig 6. Prolifération de l'hybridome Mark 3 dans des milieux de culture supplémentés avec 2,7 g/l de β -lactoglobuline variant A/B et des concentrations décroissantes de SVF. \star : 1%; \circ : 0,75%; \blacktriangle : 0,5%; \blacksquare : 0,25%; \bullet : 0%. Les résultats sont la moyenne des densités cellulaires de 3 flacons de 25 cm² et de 3 comptages par flacon.

Mark 3 hybridoma proliferation in culture medium supplemented with 2.7 g/l of β -lactoglobulin A/B and increasing FCS concentrations. \star : 1%; \circ : 0.75%; \blacktriangle : 0.5%; \blacksquare : 0.25%; \bullet : 0%. The results were the average cell densities of 3 x 25 cm² flask with 3 counts per flask.

partie par des propriétés physico-chimiques différentes :

– la solubilité : le variant A est plus soluble (3 g/l) que le variant B (0,6 g/l) (Alais, 1984);

– modification de la conformation en fonction du pH du milieu : au-dessus de pH 6,8 (les milieux de culture sont tamponnés à pH 7,2), la molécule subit une transition particulière (Pessen *et al*, 1985), qui entraîne le démasquage d'un groupement carboxylique et la réactivité du groupement SH 121 (Georges *et al*, 1962; Timasheff *et al*, 1966; Mc Kenzie et Sawyer, 1967; Tandford, 1968 et 1970; McKenzie, 1971);

Tableau II. Sécrétion d'anticorps monoclonaux (hybridome Mark 3; mg/l) en fonction de la concentration en sérum de veau fœtal. Tous les milieux contiennent de la β -lactoglobuline variant A/B 2,7 g/l supplémentée avec 1% SVF (A), 0,75% SVF (B), 0,5% SVF (C), 0,25% SVF (D), 0% SVF (E). Les résultats sont la moyenne obtenue sur les surnageants de 3 boîtes de 25 cm² testés chacun 3 fois. L'écart type de ces mesures est faible, toujours inférieur à $\pm 0,01$ mg/l.

Monoclonal antibody secretion (mg/l) according to FCS concentration in culture medium. All the media contain 2.7 g/l of β -lactoglobulin variant A/B supplemented with 1% FCS (A), 0.75% FCS (B), 0.5% FCS (C), 0.25% FCS (D), 0% FCS (E). Results are the means obtained from supernatant of 3 culture boxes (25 cm²), each tested 3 times. The standard deviation is always less than ± 0.01 mg/l.

Temps de culture (j)	Milieux				
	A	B	C	D	E
3	15,4	7,4	15,5	7,4	2,4
6	15,3	15,3	10,4	2,5	0,25
9	15,8	7,2	0,7	–	–
12	15,8	7,2	0,7	–	–
15	11,4	7	–	–	–

ceci impliquerait un effet de charge plus important sur le variant A, en raison d'un résidu aspartyl en position 64, alors que le variant B a un résidu glycyll à cette position (Eigel *et al*, 1984);

– l'hydrophobicité : le variant A est un peu plus hydrophobe que le variant B (Cheftel *et al*, 1985); cependant, l'exposition à la surface de la molécule du variant A du résidu aspartyl 64 (Monaco *et al*, 1987) pourrait réduire la fixation de composés sur les zones hydrophobes (Ile 56, Leu 57 et 58, Trp 61, Ile 147, Leu 149 et Phe 151).

Lorsqu'on étudie la prolifération cellulaire, on constate que les milieux supplémentés avec 2,7 g/l de β -Lg variant A/B et 1% de SVF sont aussi efficaces que les milieux supplémentés avec 9% de lactosérum. Donc, l'activité mitogénique du lactosérum semble être liée, au moins pour la plus grande partie, à la présence de la β -Lg. La β -Lg, outre son rôle de nutriment, est un transporteur de substances hydrophobes et de métaux (Baumy et Brulé, 1988), ce qui peut expliquer son effet mitogène. Par ailleurs, il y a moins de cellules mortes dans les cultures supplémentées avec les produits provenant du lait qu'avec du SVF. La β -Lg aurait un effet protecteur, effet déjà rapporté par Polet et Polet-Spieker (1976) qui l'utilisent associée à la concanavaline A, dans des cultures de lymphocytes à court terme, et que nous avons également mis en évidence en étudiant la congélation des cellules dans du lactosérum (Derouiche *et al*, 1989).

Par contre, nous constatons que ni la β -Lg seule (2,7 g/l), ni le SVF seul à 1% ne sont capables d'assurer la prolifération cellulaire à long terme, alors qu'ajoutés ensemble, ils agissent en synergie pour assurer une croissance cellulaire qui est d'environ 75% de celle obtenue avec 10% de SVF. La concentration de 1% de SVF semble être la concentration minimale requise pour assurer en synergie avec la β -

Lg une prolifération cellulaire et une sécrétion correcte d'anticorps.

La technique utilisée pour la préparation de la β -Lg est simple, peu coûteuse, elle donne un rendement et un degré de pureté corrects, ce qui fait qu'elle est facilement utilisable pour la préparation de milieux de culture à grande échelle.

REMERCIEMENTS

Nous remercions l'équipe «protéinologie» du laboratoire de biochimie appliquée à l'université de Nancy I pour l'aide technique lors de la réalisation de la chromatographie en FPLC.

Ce travail a pu être réalisé grâce à l'aide financière de l'université de Nancy I, du district de Nancy, de la mission de la recherche de la région Lorraine, et grâce à un contrat CEE (contrat BAP 0/0129 F).

RÉFÉRENCES

- Alais C (1984) *Science du lait : principes de techniques laitières*. Sepaic, Paris, 4^e éd.
- Baumy JJ, Brulé G (1988) Binding of bivalent cations to α -lactalbumin and β -lactoglobulin: effect of pH and ionic strength. *Lait* 68, 33-48
- Brown ME (1984) Interactions of β -lactoglobulin and α -lactalbumin with lipids: a review. *J Dairy Sci* 67, 713-722
- Cheftel JC, Cuq JL, Lorient D (1985) *Protéines alimentaires. Propriétés fonctionnelles. Valeur nutritionnelle. Modifications chimiques*. Technique et documentation Lavoisier, Paris
- Damerdjji O, Derouiche F, Legrand C, Capiamont J, Bour JM, Maugras M, Belleville F, Nabet P, Paquet D, Linden G (1988) Utilisation of whey fractions as substitute for fetal calf serum in culture media. *Biotechnol Tech* 2, 253-258
- Derouiche F, Bour JM, Legrand C, Capiamont J, Belleville F, Linden G, Nabet P (1989) Improved long-term storage of hybridomas at -80 °C using a bovine milk derivative. *J Immunol Methods* 125, 13-18

- Derouiche AF, Legrand C, Bour JM, Capiamont J, Gelot M, Dousset B, Belleville F, Nabet P, Linden G (1990) Biochemical aspects of whey fractions capable of monitoring hybridoma proliferation. Comparison with fetal calf serum. *Lait* 70, 313-324
- Diaz de Villegas MC, Oria R, Sala FJ, Calvo M (1987) Lipid binding by β -lactoglobulin of cow milk. *Milchwissenschaft* 42, 357-358
- Douillard JY, Hoffman T (1983) Enzyme-linked immuno sorbant assay for screening monoclonal antibody production using enzyme-labeled second antibody. *Methods Enzymol* 92, 168-175
- Eigel WN, Butler JE, Ernstrom CA, Farrel HM Jr, Harwalkar VR, Jenness R, Whitney RM (1984) Nomenclature of proteins of cow's milk. Fifth revision. *J Dairy Sci* 67, 1611-1613
- Fugate RD, Song PS (1980) Spectroscopic characterization of β -lactoglobuline-retinol complex. *Biochim Biophys Acta* 625, 28-42
- Georges C, Guinand S, Tonnelat J (1962) Étude thermodynamique de la dissociation réversible de la β -lactoglobuline B pour des pH supérieures à 5,5. *Biochim Biophys Acta* 59, 737-739
- Godovac-Zimmermann J (1988) The structural motif of β -lactoglobulin and retinol-binding protein: a basic framework for binding and transport of small hydrophobic molecules? *Trends Biochem Sci* 13, 64-67
- Godovac-Zimmermann J, Braunitzer G (1987) Modern aspects of the primary structure and function of β -lactoglobulins. *Milchwissenschaft* 42, 294-297
- Godovac-Zimmermann J, Conti A, Liberatori J, Braunitzer G (1985) Homology between the primary structure of β -lactoglobulins and human retinol binding protein: evidence for a similar biological function? *Biol Chem Hoppe-Seyler* 366, 431-438
- Hillier RM (1976) The quantitative measurement of whey proteins using polyacrylamide - gel electrophoresis. *J Dairy Res* 43, 259-261
- Klagsbrun M (1978) Human milk stimulates synthesis and cellular proliferation in cultured fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 75, 5057-5061
- Linden G, Nabet P, Bour JM (1988) Compléments de milieux de culture de cellules eucaryotes à base de produits dérivés de l'industrie laitière. Brevet français n° 8815723
- Lung C, Paquet D, Linden G (1987) Isolement de la β -lactoglobuline. Mise au point d'une méthode préparative rapide. *Sci Alim* 7 (n° hors série VIII), 167-176
- McKenzie HA (1971) β -lactoglobulins. In: *Milk proteins: chemistry and molecular biology* (McKenzie HA, ed) 2. Acad Press, New York, 257-330
- McKenzie HA, Sawyer WH (1967) Effects of pH on β -lactoglobulins. *Nature* 214, 1101-1104
- Monaco HL, Zanotti G, Spadon P, Bolognesi M, Sawyer L, Eliopoulos EE (1987) Crystal structure of the trigonal form of bovine β -lactoglobulin and its complex with retinol at 2.5 Å resolution. *J Mol Biol* 197, 695-706
- Nabet P, Linden G, Ledeaute Y, Sarem F (1985) Milieu de culture à base de lait de vache. Brevet Anvar, France, 8512907
- Papiz MZ, Sawyer L, Eliopoulos EE, North ACT, Findlay JBC, Sivaprasadarou R, Jones TA, Newcomer ME, Kraulis PJ (1986) The structure of β -lactoglobulin and its similarity to plasma retinol-binding protein. *Nature* 324, 383-385
- Pessen H, Purcell JM, Farrell HM Jr (1985) Proton relaxation rates of water in dilute solutions of β -lactoglobulin. Determination of cross relaxation and correlation with structural changes by the use of two genetic variants of a self-associating globular protein. *Biochim Biophys Acta* 828, 1-12
- Polet H, Polet-Spieker H (1976) Mechanism of the growth-promoting effect of serum albumin on concanavalin A activated lymphocytes: protective effect of the plasma proteins. *J Immunol* 117, 1275-1281
- Polet-Spieker H, Polet H (1981) Requirement of a combination of a saturated and unsaturated free fatty acid and a fatty acid carrier protein for *in vitro* growth of lymphocytes. *J Immunol* 126, 949-954
- Rask L, Anundi H, Peterson PA (1979) The primary structure of the human retinol-binding protein. *FEBS Lett* 104, 55-58
- Said HM, Ong DE, Shingleton JL (1989) Intestinal uptake of retinol: enhancement by bovine milk β -lactoglobulin. *Am J Clin Nutr* 49, 690-694
- Sereni A, Baserga R (1981) Routine growth of cell lines in medium supplemented with milk instead of serum. *Cell Biol Int Rep* 5, 339-345

Tandford C (1968) Protein denaturation. *In: Advances in protein chemistry* – 23 (Auginsen CBJr, Anson ML, Edsall JT, Richards FM, eds) Acad Press, New York, 121-282

Tandford C (1970) Protein denaturation. *In: Advances in protein chemistry* – 24 (Auginsen

CBJr, Edsall JT, Richards FM, eds) Acad Press, New York, 1-95

Timasheff SN, Mescanti L, Basch JJ, Townend R (1966) Conformational transitions of bovine β -lactoglobulins A, B and C. *J Biol Chem* 241, 2496-2501