

Effet de GH sur la différenciation de chondrocytes de lapin prépubère en culture sans sérum et sur l'activité radioimmunologique Sm-C/IGF₁ mesurable dans le milieu de culture

Maité CORVOL, Marie-France DUMONTIER, Claude PREVOT, J. BONAVENTURE (*), B. de la TOUR, J. WILLEPUT

INSERM U.30, Unité de Recherche en Biologie et Pathologie de la Croissance et du Développement.

(*) INSERM U.12, Unité de Recherche en Génétique Médicale.

Hôpital Necker-Enfants-Malades, 149, rue de Sèvres, 75743 Paris Cedex 15.

Summary. *Effect of GH on the differentiation of prepubertal rabbit chondrocytes and their immunoreactive Sm-C/IGF₁ secretion in a serum-free culture medium.*

This study concerns the immunoreactive somatomedin C secretion by prepubertal rabbit epiphyseal chondrocytes cultured in a defined serum-free medium. In such culture conditions, chondrocytes mainly synthesized Type II collagen (80 % of total collagen) during 10 days. A small amount of Type I collagen was also found with a significant ($p < 0.05$) higher level during the period of cell multiplication (6.4 ± 1.5 %) than when cells reached confluency (0.9 ± 0.2 %). During the 10 days of culture without serum and without hormone added, a Sm-C/IGF₁ activity was measured by RIA at a mean level of 30 ± 5 mU/ml/10 μ g DNA. This value was significantly higher ($p < 0.001$) than in the medium not incubated with the cells (1.7 ± 0.9 mU/ml).

When hGH was added to the culture medium during the period of cell division, the level of Sm-C/IGF₁ activity was significantly elevated at 39 ± 4 mU/ml/10 μ g DNA ($p < 0.05$) and at 55 ± 3 mU/ml/10 μ g DNA ($p < 0.001$) with 50 ng/ml and 100 ng/ml hGH concentrations respectively. On the contrary, no difference was observed at confluency in treated and non treated cells.

Introduction.

L'action stimulante de l'hormone de croissance (GH) sur la croissance du squelette se fait au moins en partie au niveau du cartilage épiphysaire (Daughaday *et al.*, 1972) par l'intermédiaire de facteurs sériques appelés somatomédines (SM) ou IGF. Plusieurs somatomédines ont été isolées et purifiées à partir du plasma (Svoboda *et al.*, 1980 ; Hall et Uthne, 1971 ; Rinderknecht et Humbel, 1976) et à partir de milieu conditionné de cellules hépatiques de rat en culture (Dulak et Temin, 1973 ; Moses, 1976).

Il est généralement admis qu'après la naissance, les somatomédines sont principalement produites au niveau du foie et que cette production est sous la dépendance de GH (McConaghey, 1972 ; Schimpff *et al.*, 1976 ; Daughaday *et al.*, 1976). Toutefois une source locale de somatomédines au niveau du tissu cible — le cartilage — a été récemment suggérée par la mise en évidence d'une activité Sm extraite de tissu mésenchymateux préchondrogénique de fœtus de souris (d'Ercole *et al.*, 1980) et de cartilage pelvien d'embryons de poulet de 9 jours, incubés en milieu sans sérum pendant 3 jours (Burch *et al.*, 1986). Il est donc possible que les chondrocytes d'animaux post-nataux produisent leur propre somatomédine et constituent ainsi un système autocrine complémentaire du système de somatomédines plasmatiques circulantes. Il est même possible que le système autocrine de production de Sm par le cartilage soit sous la dépendance de GH, comme le suggèrent Isaksson *et al.* (1982).

Le but du présent travail est de rechercher une production locale de facteurs Sm-C par les chondrocytes épiphysaires d'animaux post-nataux, de voir si cette production est en relation avec les cycles de division cellulaire et enfin si elle est dépendante de l'hormone de croissance.

Matériel et méthodes.

Animaux. — De jeunes lapins Fauve de Bourgogne (Ruvel France, mâle prépubère pesant de 200 à 350 g) sont utilisés.

Cultures primaires de chondrocytes. — Les animaux sont sacrifiés d'un coup à la nuque et rapidement rasés. Les épiphyses des os longs sont prélevées stérilement et disséquées sous microscope. La zone de réserve de cartilage est isolée et incubée à 37° avec de la collagénase (Clostridial collagénase Boehringer, RFA) à 0,2 % dans du Gey pendant 30 min selon la technique déjà décrite (Corvol *et al.*, 1975). La suspension cellulaire résiduelle est répartie dans des flacons de culture de 25 cm² (Corning) à raison de 1,5 à 2 × 10⁵ cellules par flacon contenant chacun 4 ml de milieu Dulbecco additionné de 10 % de sérum de veau fœtal et d'antibiotiques (pénicilline 0,1 IU/ml ; streptomycine 0,1 µg/ml). Après 24 h, les cellules sont collées, les cellules sont rincées 1 fois avec du tampon Gey et le milieu est remplacé par un milieu défini sans sérum contenant les éléments suivants dilués dans du Dulbecco (DME) : BSA pure 1 mg/ml, sodium sélénite 4 ng/ml (Sigma), transferrine 0,5 µg/ml (Calbiochem), fibronectine humaine 5 µg/ml (IBF) et FGF 100 ng/ml (Colaborative Research). Certaines cellules reçoivent de la GH (10, 50 ou 100 ng/ml) (Nanormone Nordisk). Les cellules sont incubées à 37 °C en présence de 10 % de CO₂ dans l'air et le milieu est renouvelé toutes les 48 h jusqu'au jour 10.

Les chondrocytes se divisent en conservant une forme polygonale pendant une période de 8 jours, puis la multiplication cellulaire cesse et les cellules restent à confluence jusqu'au jour 10. L'étude du collagène synthétisé et de la production d'une activité Sm-C like par les chondrocytes est faite aux deux temps de la culture : à 6 jours pendant la période de division cellulaire et à 10 jours à confluence.

Etude du collagène. — Pour l'étude du collagène effectuée sur une culture déterminée, les flacons sont séparés en 2 groupes de 16, un groupe recevant 100 ng/ml de hGH et l'autre ne recevant que le solvant. Chaque analyse de collagène est faite ensuite comparativement sur 2 groupes de 4 flacons (un témoin et un avec hGH) aux jours 6 et 10 de la culture. Le collagène nouvellement synthétisé par les chondrocytes à 7 jours et à 10 jours de culture est étudié après 20 heures d'incorporation de 20 μ Ci/ml de [3,4 ³H]-proline (CEA-Saclay) dans un milieu contenant 50 μ g/ml d'acide ascorbique et 50 μ g/ml de fumarate de β -aminopropionitrile (Freiberger *et al.*, 1980). Le milieu est éliminé et les cellules rincées trois fois puis décollées avec un rubber policeman dans un tampon Tris-HCl 100 mM pH 7,4 contenant 0,1 % de Triton X100 et des inhibiteurs de protéases (PMSF 1 mM, NEM 10 mM, EDTA 25 mM). Après centrifugation, les extraits cellulaires provenant de 4 flacons de culture traités de façon identique, sont poolés et divisés en deux parties : la première sert à mesurer l'incorporation de [³H]-proline et à calculer la quantité de protéines collagéniques nouvellement synthétisées. Cette fraction est hydrolysée avec HCl 6 N et passée sur résine échangeuse d'ions de façon à séparer [³H]-proline et [³H]-hydroxyproline. Le pourcentage de protéines collagéniques est alors calculé suivant la formule de Wiestner *et al.*, (1969) :

$$100 \times \frac{2 \text{ dpm OHpro}}{5 (\text{dpm pro- cpm OHpro}) + 2 \text{ dpm OHpro}}$$

La deuxième fraction cellulaire est digérée à la pepsine (Sigma) et lyophilisée. Les chaînes de collagène radiomarquées sont analysées après électrophorèse sur gel d'acrylamide (Neville et Glossman, 1974). Les gels sont soumis à une fluorographie par incubation en présence de EN³HANCE (NEN), puis exposés sur film radiographique. La DO de chaque bande est lue au scanner, puis intégrée. Le collagène de Type II est caractérisé à l'aide d'anticorps spécifiques anti-Type II de lapin fournis par le Dr Hartmann (Institut Pasteur de Lyon), (Bonaventure J. *et al.*, soumis à publication).

Cette étude a été répétée sur 3 cultures de chondrocytes provenant d'animaux différents ce qui donne 3 déterminations par point. Les résultats présentés sont la moyenne \pm SEM de ces 3 déterminations.

Taux de Sm-C/IGF₁ mesuré par RIA dans les milieux de culture. — Pour cette étude, au jour 2 de la culture, les flacons sont séparés en plusieurs groupes de 6 traités ou non avec 10, 50 ou 100 ng/ml de hGH. Le dosage radioimmunologique est fait sur les milieux correspondant à 48 h d'incubation aux jours 6 et 10 de la culture. Il est fait séparément sur des pools de 2 flacons de sorte que pour chaque groupe étudié, les dosages sont réalisés en triplicate. Après évaporation par lyophilisation, l'extrait est repris dans 2,5 ml de tampon phosphate pH 7,4, puis déssalé sur colonne PD10 (Pharmacia). La mesure de l'activité Sm-C est faite à l'aide de l'anticorps polyclonal préparé dans le laboratoire du Dr Van Wyk et fourni par le NIH (Furlanetto *et al.*, 1977 ; Copeland *et al.*, 1980). Cette mesure est faite sur 3 dilutions de milieu ainsi préparé et chaque dilution est réalisée en

triplicate. Le traceur utilisé est de l'IGF₁ purifié et iodé (100 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$) dans le laboratoire du Dr Van den Brande (Utrecht). Un pool de plasma d'adultes jeunes est pris comme standard et les résultats sont exprimés en mUnités, sachant que dans nos conditions expérimentales, on observe 1 mU par μl de plasma. Pour chaque expérience, le taux de Sm-C/IGF₁ est mesuré dans le milieu de base non incubé avec les chondrocytes mais traité comme ci-dessus.

Enfin, les valeurs obtenues dans les milieux de culture sont rapportées à la quantité de DNA des flacons correspondants et exprimées en mU/ml/10 μg DNA.

Cette étude a été répétée sur 3 cultures, provenant d'animaux différents. Les résultats présentés sont donc la moyenne \pm SEM de 9 déterminations par groupe étudié.

Mesure de DNA. — Le culot cellulaire de chaque flacon est recueilli par trypsination. Le DNA est extrait à l'acide perchlorique 1N et mis en évidence par réaction colorimétrique à la diphénylamine (Burton, 1956).

Statistique. — Les résultats présentés sont la moyenne \pm SEM des résultats obtenus. La significativité des variations entre les moyennes comparées est faite selon le test de t de Student.

Résultats.

Incorporation de ³H-proline et synthèse de différents types de collagène par les chondrocytes en culture en milieu sans sérum.

L'incorporation de [³H]-proline dans les protéines collagéniques par rapport aux protéines totales des chondrocytes est mesurée selon la formule décrite dans « Méthodes » et révèle qu'après 6 jours comme après 10 jours de culture, 10 % des protéines extraites du tapis cellulaire sont des protéines collagéniques. Le taux de prolyhydroxylation établi à partir de 3 cultures et calculé selon le rapport :

$$100 \times \frac{{}^3\text{H-OHpro}}{{}^3\text{H-OHpro} + {}^3\text{H-pro}} \text{ montre que } 30 \% \text{ à } 37 \%$$

des protéines collagéniques sont hydroxylées. Aucune différence n'est observée lorsque les cellules sont incubées en présence de hGH, avec un taux d'hydroxylation de 27 % à 34 %.

Le type de collagène synthétisé en grande majorité est représenté par le collagène de Type II, spécifique du cartilage. Le tableau 1 montre qu'il représente 78 % à 85 % du collagène total extrait du tapis cellulaire pendant la phase de division comme à confluence. Toutefois, on note la présence discrète mais significative de collagène de Type I avec un pourcentage significativement plus élevé ($p < 0,05$) pendant la phase de division cellulaire qu'à confluence ($6,4 \pm 1,5$ % comparé à $0,9 \pm 0,2$ %). L'addition de hGH au milieu de culture ne modifie en rien cette répartition.

TABLEAU 1

Répartition des collagènes de Types I et II extraits du pool cellulaire de chondrocytes après 6 jours et 10 jours de culture primaire en milieu défini sans sérum.

Conditions de culture		Pourcentage par rapport au collagène total (%) ^(a)	
		Type II	Type I
6 jours	Témoin	78,5 ± 6,3	6,4 ± 1,5
	hGH (100 ng/ml)	75,5 ± 5,7	7,1 ± 2,3
10 jours	Témoin	85,0 ± 5,1	0,9 ± 0,2
	hGH (100 ng/ml)	83,0 ± 7,0	0,8 ± 0,2

^(a) Chaque nombre représente la moyenne ± SEM de trois expériences réalisées à partir de cultures provenant de 3 animaux différents (n = 3).

Activité Sm-C/IGF₁.

Pendant la phase de division cellulaire et au stade de confluence, les activités Sm-C mesurées par RIA dans le milieu des chondrocytes après 48 h d'incubation sont respectivement égales à 26 ± 5 et 35 ± 5 mU/ml/10 µg DNA. Cette activité est significativement plus élevée (p < 0,05) que l'activité Sm-C mesurable dans le milieu de base non incubé avec les cellules (tabl. 2).

Pendant la phase de division cellulaire, l'addition de hGH aux cultures, provoque une élévation significative du taux de Sm-C/IGF₁. En présence de 50 ng/ml de hGH, le taux de Sm-C/IGF₁ est multiplié par 1,5 (p < 0,05) et en présence de 100 ng/ml de hGH, il est 2 fois plus élevé (p < 0,001) que le taux de base mesuré dans les milieux témoins. En revanche, l'addition de hGH pendant la phase de confluence des cellules, ne provoque aucune modification du taux de Sm-C/IGF₁ mesurable dans les milieux correspondants.

TABLEAU 2

Activité Sm-C/IGF₁ mesurée dans le milieu de culture de chondrocytes épiphysaires de lapin après 48 h d'incubation.

	Taux Sm-C/IGF ₁ (mU/ml/10 µg DNA) ^(a)	
	Phase de division	Confluence
Témoin	26 ± 5	34 ± 5
hGH	10 ng/ml	32 ± 5
	50 ng/ml	39 ± 4*
	100 ng/ml	55 ± 3**
Milieu non incubé	1,7 ± 0,9	Non détectable

^(a) Chaque nombre représente la moyenne ± SEM de 9 dosages radioimmunologiques. Trois cultures de chondrocytes provenant d'animaux différents sont pratiquées. Sur chaque culture et pour chaque point le dosage est fait en triplicate.

Un seul dosage par culture est fait sur milieu non incubé avec les cellules mais traité comme les milieux incubés (n = 3).

* p < 0,05 ; ** p < 0,001 comparé au témoin.

Enfin, il faut noter que l'addition de hGH aux cultures, quelle que soit la concentration utilisée, ne modifie en rien le taux de DNA des chondrocytes qui est à $10,80 \pm 3,2 \mu\text{g}/\text{flacon}$ au jour 6 et à $19,20 \pm 5,40 \mu\text{g}/\text{flacon}$ au jour 10 de culture primaire.

Discussion.

Les résultats observés dans le présent travail suggèrent fortement que les chondrocytes épiphysaires provenant de lapins prépubères et maintenus en culture primaire en milieu défini sans sérum produisent un ou des facteurs ayant une activité radioimmunologique de type Sm-C/IGF₁.

Une contamination par apport exogène de Somatomédine semble pouvoir être écartée puisque la culture est réalisée en l'absence de sérum. La seule source de contamination pourrait provenir de certains constituants du milieu défini comme la transferrine, l'albumine ou la fibronectine. Mais le dosage radioimmunologique de ce milieu, défini non incubé avec les cellules, ne met en évidence qu'une activité Sm-C/IGF₁ à la limite du détectable.

L'activité Sm-C/IGF₁ mesurée dans le milieu de culture des chondrocytes pourrait provenir d'une contamination de la culture par des fibroblastes. En effet, une activité Sm-C/IGF₁ est retrouvée par plusieurs auteurs dans les cultures de fibroblastes WI38 (Atkison *et al.*, 1981), et de fibroblastes de derme humain (Clemmons *et al.*, 1981 ; Adams *et al.*, 1983 et 1984). Toutefois, le présent travail a été réalisé de façon à écarter cette hypothèse : — lors de la mise en culture la préparation cellulaire est faite sous loupe binoculaire pour éliminer soigneusement muscles, tendons, aponévroses et autres sources de fibroblastes ; — au cours de la culture, la caractérisation du collagène néosynthétisé a permis de vérifier qu'il est composé à plus de 80 % par du Type II (spécifique du cartilage) et non du Type I (< 10 %).

Le taux de Sm-C/IGF₁ mesuré dans le milieu de chondrocytes en culture, sans addition de sérum ou d'hormone, ne varie pas entre le jour 6 et le jour 10 de la culture.

Ce taux est augmenté par l'addition de hGH, mais cette augmentation n'est observée qu'au 6^e jour. Elle n'existe pas au 10^e jour. Il ne semble pas que cet effet soit lié à la durée d'incubation en présence de l'hormone ou au nombre d'injections reçu par les cellules. Dans les 2 cas, le milieu étudié correspond à 48 h d'incubation et à 10 jours, les cellules ont reçu 4 injections d'hormone alors qu'elles n'en ont reçu que 2 à 6 jours.

On peut émettre l'hypothèse que la réponse à hGH dépend de la réceptibilité particulière des chondrocytes au jour 6. Ce qui caractérise les cellules à ce stade de culture par rapport au jour 10, c'est qu'elles sont en phase de multiplication cellulaire intense. Le processus de division cellulaire est même particulièrement important en milieu sans sérum grâce à la présence de FGF. Ce facteur est en effet connu pour stimuler la multiplication des chondrocytes en culture (Kato and Gospodarowicz, 1984) et non leur différenciation. Une modification de l'expression phénotypique des chondrocytes en phase de division est d'ailleurs observée

dans ce travail. Les chondrocytes expriment à plus de 80 % le gène de collagène de type II spécifique du cartilage, mais il existe une production de collagène de type I significativement plus élevée pendant la période de division qu'en phase stationnaire. Or la présence et surtout l'augmentation de la synthèse de collagène de type I par les chondrocytes sont depuis longtemps considérés comme des critères de dédifférenciation (Benya *et al.*, 1978 ; Hunter *et al.*, 1984 ; Mayne *et al.*, 1984). Cette tendance transitoire à la dédifférenciation cellulaire pourrait s'accompagner d'une capacité à répondre à certaines hormones, comme la GH, qui accélèreraient le processus de différenciation. Dans nos conditions expérimentales, aucun effet de hGH n'est observé sur le DNA des chondrocytes, ni à 6 jours ni à 10 jours. La GH n'agit donc pas comme « facteur de multiplication » sur les chondrocytes mis en culture sans sérum. En revanche, la stimulation transitoire de l'activité Sm-C/IGF₁ des chondrocytes par hGH pendant la période de division cellulaire, pourrait avoir pour conséquence une stimulation de la synthèse des protéines spécifiques telles que les protéoglycanes soufrés et accélérer ainsi la survenue de la maturation des chondrocytes. C'est par ce mécanisme que pourrait se manifester l'effet direct de GH sur le cartilage suggéré par Isaksson (1982).

12^e Réunion du groupe Développement INRA,
Montpellier, 28-30 mai 1986.

Reçu en juillet 1987.
Accepté en septembre 1987.

Remerciements. — Les auteurs expriment leurs remerciements à Mlle F. Lagier qui a tapé le manuscrit.

Ce travail a été financé en partie par une subvention de Nordisk, en partie par le contrat n° 3106 CHU Necker.

Références

- ADAMS S. O., NISSLEY S. P., HANDWERGER S., RECHLER M. M., 1983. Developmental pattern of insulin-like growth factor I and II synthesis and regulation in rat fibroblasts. *Nature*, **302**, 150-153.
- ADAMS S. O., KAPADIA M., MILLS B., DAUGHADAY W. H., 1984. Release of insulin-like growth factors and binding protein activity into serum-free medium of cultured human fibroblasts. *Endocrinology*, **115**, 520-526.
- ATKISON P. R., WEIDMAN E. R., BHAUMICK B., BALA R. M., 1980. Release of somatomedin-like activity by cultured WI38 human fibroblasts. *Endocrinology*, **106**, 2006-2012.
- ATKISON P. R., BALA R. M., 1981. Partial characterization of a mitogenic factor with somatomedin-like activity produced by cultured WI38 human fibroblasts. *J. Cell Physiol.*, **107**, 317-327.
- BENYA P. D., PADILLA S. R., NIMNI M. E., 1978. Independent regulation of collagen types by chondrocytes during the loss of differentiated function in culture. *Cell*, **15**, 1313-1321.
- BURCH W. M., WEIR S., VAN WYK J. J., 1986. Embryonic chick cartilage produces its own somatomedin-like peptide to stimulate cartilage growth *in vitro*. *Endocrinology*, **119**, 1370-1376.
- BURTON K., 1956. Method for the measurement of cellular DNA. *J. Biochem.*, **62**, 315-322.

- CLEMMONS D. R., UNDERWOOD L. E., VAN WYK J. J., 1981. Hormonal control of immunoreactive somatomedin production by cultured human fibroblasts. *J. clin. Invest.*, **67**, 10-19.
- COPELAND K. C., UNDERWOOD L. E., VAN WYK J. J., 1980. Induction of immunoreactive somatomedin-C in human serum by growth hormone : dose response relationships and effect on chromatographic profiles. *J. clin. Endocrinol. Metab.*, **50**, 690-697.
- CORVOL M. T., DUMONTIER M. F., RAPPAPORT R., 1975. Culture of chondrocytes from the proliferative zone of epiphyseal growth plate cartilage from prepubertal rabbits. *Biomedicine*, **23**, 103-107.
- DAUGHADAY W. H., HALL K., RABEN M. S., SALMON Jr W. D., VAN DEN BRANDE J. L., VAN WYK J. J., 1972. Somatomedin : proposed designation for sulphation factor. *Nature*, **235**, 107.
- DAUGHADAY W. H., PHILLIPS L. S., MUELLER M. C., 1976. The effects of insulin and growth hormone on the release of somatomedin by the isolated rat liver. *Endocrinology*, **98**, 1214-1216.
- D'ERCOLE A. J., APPLEWHITE G. T., UNDERWOOD L. E., 1980. Evidence that somatomedin is synthesized by multiple tissue in the fetus. *Develop. Biol.*, **75**, 315-328.
- DULAK N. C., TEMIN H. M., 1973. A partially purified polypeptide fraction from rat liver cell conditioned medium with multiplication-stimulating activity for chick embryo fibroblasts. *J. Cell Physiol.*, **81**, 153-160.
- FREIBERGER H., GROVE D., SIVARAJAH A., PINNELL S. R., 1980. Procollagen I synthesis in humane skin fibroblasts : effect of culture conditions on biosynthesis. *J. clin. Invest. Derm.*, **75**, 425-430.
- FURLANETTO R. W., UNDERWOOD L. E., VAN WYK J. J., 1977. Estimation of somatomedin-C levels in normals and patients with pituitary disease by radioimmunoassay. *J. clin. Invest.*, **60**, 648-657.
- HALL K., UTHNE K., 1971. Some biological properties of purified sulfation factor from human plasma. *Acta med. scand.*, **190**, 137-143.
- HUNTER G. K., ROGAKON C. C., PRITZKER K. P. H., 1984. Extracellular matrix synthesis by articular chondrocytes and synovial fibroblasts in long-term monolayer culture. *Biochim. Biophys. Acta*, **804**, 459-465.
- ISAKSSON O. G. P., JANSSON J. O., GAUSE I. A. M., 1982. Growth hormone stimulates longitudinal bone growth directly. *Science*, **216**, 1237-1239.
- KATO Y., GOSPODAROWICZ D., 1984. Growth requirements of low-density rabbit costal chondrocyte cultures maintained in serum-free medium. *J. Cell Physiol.*, **120**, 354-363.
- MAYNE R., ELROD B. W., MAYNE P. M., SANDERSON R. D., LINSENMAYER T. F., 1984. Changes in the synthesis of minor cartilage collagens after growth of chick chondrocytes in 5-bromo-2'-deoxyuridine or to senescence. *Exp. Cell Res.*, **151**, 171-182.
- McCONAGHEY P. J., 1972. The production of sulphation factor by the rat liver. *J. Endocr.*, **52**, 1-9.
- NEVILLE D. M. Jr., GLOSSMAN H., 1974. Molecular weight determination of membrane protein and glycoprotein subunits by discontinuous gel electrophoresis in dodecyl-sulfate. *Meth. Enzymol.*, **32 B**, 92-102.
- RINDERKNECHT E., HUMBEL R. E., 1976. Polypeptides with non-suppressible insulin-like and cell-growth promoting activities in human serum : isolation, chemical characterization and some biological properties of forms I and II. *Proc. nat. Acad. Sci. USA*, **73**, 2365-2369.
- SCHIMPF R. M., DONNADIEU M., GLASINOVIC J. C., WARNET J. M., GIRARD F., 1976. The liver as a source of somatomedin. *Acta endocrinol.*, **83**, 365-372.
- SVOBODA M. E., VAN WYK J. J., KLAPPER D. G., FELLOWS R. E., GRISSON F. E., SCHLUETER R. J., 1980. Purification of somatomedin C from human plasma : chemical and biological properties, partial sequence analysis and relationship to other somatomedins. *Biochem. J.*, **19**, 790-797.
- WIESTNER M., KRIEG T., HORLEN D., GLANVILLE R., MULLER P., 1979. Inhibiting effect of procollagen peptides on collagen synthesis in fibroblast cultures. *J. biol. Chem.*, **254**, 7016-7023.
-