



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

[M] 1993 MATT, M.

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

THESE

présentée et soutenue publiquement le 8 septembre 1993
dans le but d'obtenir le titre de :

**DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE
LORRAINE**

Spécialité Génie Biologique

**CONCEPT ET DEVELOPPEMENT D'UN IMMUNODOSAGE
PAR POLARISATION DE FLUORESCENCE DE
BIOMOLECULES A FONCTION CARBOXYLE :
APPLICATION A LA PROSTAGLANDINE E₁ ET AU
THROMBOXANE B₂**

par

Muriel MATT

BIU NANCY
Service Commun de Documentation
INPL
2, avenue de la Forêt de Haye - B.P. 3
54501 VANDOEUVRE Cédex FRANCE

Membres du Jury

Mr A. NICOLAS : Professeur à la Faculté des Sciences
Pharmaceutiques et Biologiques de NANCY I
(**Président**)
Mr P. BROSSIER : Professeur à la Faculté des Sciences
Pharmaceutiques et Biologiques de DIJON
(**Rapporteur**)
Mr C. SELVE : Professeur à la Faculté des Sciences de NANCY I
(**Rapporteur**)
Mme M. DONNER : Directeur de recherche INSERM
Mr J.F. STOLTZ : Professeur à la Faculté de Médecine de NANCY I

Les travaux présentés dans ce document ont été réalisés au laboratoire de Chimie Analytique de la faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Nancy en collaboration avec l'unité INSERM 284 de NANCY (département instrumentation avancée et réactifs).

Je remercie tout d'abord Monsieur **Nicolas** de m'avoir accueillie dans son laboratoire et de m'avoir fait bénéficier d'excellentes conditions de travail. Je tiens à souligner ses qualités scientifiques et humaines et je le remercie d'avoir encadré ces travaux en me laissant une grande liberté dans la conduite des opérations.

Je remercie Monsieur **Selve** pour avoir accepté de juger ce travail et d'en être le rapporteur. Vos qualités d'enseignant ont contribué au choix de mon orientation professionnelle et je vous remercie pour votre accueil et votre disponibilité.

Mes plus vifs remerciements à Monsieur **Brossier** de m'avoir fait l'honneur de participer à ce jury et d'en être le rapporteur.

Je remercie Madame **Donner** pour la diversité et l'originalité du sujet de recherche proposé. Je vous remercie pour votre participation à l'élaboration de ce travail ainsi qu'à sa mise en forme.

Je remercie Monsieur **Stoltz** pour avoir accepté de juger ce travail.

Je voudrais remercier toutes les personnes qui m'ont permis de poursuivre ces travaux sans soucis matériels ni financiers.

Je réserve une mention spéciale à **Catherine Gavriloff** pour son soutien moral de chaque instant.

Je remercie Monsieur **Leroy** de m'avoir initiée aux plaisirs et aux joies de la chromatographie liquide haute performance ainsi que pour son aide scientifique.

Un grand merci à Madame **Droesch** qui a contribué à l'avancement des travaux par son aide, ses connaissances techniques, sa disponibilité et sa gentillesse.

Je tiens également à associer à ces remerciements toutes les personnes qui ont contribué à l'élaboration de ce travail par le biais de leurs connaissances scientifiques ou/et techniques : Madame **Braconot**, Monsieur **Dupéris**, Monsieur **Klein**, Monsieur **Lemire**, Madame **Muller**.

"D'une façon générale ce manuscrit est dédié au monde scientifique, avec qui mes rapports sont aussi divers qu'enrichissants"

d'après Binet, ISBN 2-85815-147-4, 1991, 12, 52

A mes parents

A ma famille

A ma fille, Alice

INTRODUCTION	9
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	
I. Le Thromboxane B₂	12
I.1. Métabolisme de l'acide arachidonique.	
Origine du thromboxane B ₂	12
I.2. Mécanisme d'action des prostaglandines et des thromboxanes .	15
I.3. Modification de l'activité du thromboxane par	
les médicaments	17
I.3.1. Inhibition de la synthèse du thromboxane A ₂	18
I.3.2. Inhibition des récepteurs du thromboxane A ₂	19
I.4. Intérêt du dosage du thromboxane B ₂ . Problèmes liés à la	
nature de la molécule	21
I.5. Métabolisme du thromboxane B ₂	22
I.6. Méthodes d'analyse du thromboxane B ₂ et de ses principaux	
métabolites	25
I.6.1. Préparation de l'échantillon	25
I.6.2. Méthodes immunologiques	26
I.6.3. Méthodes chromatographiques	32
II. Intérêt de la fluorescence dans les immunodosages :	
cas particulier de la polarisation de fluorescence	40
II.1. Rappel du principe de fluorescence	40
II.2. Les immunodosages par polarisation de fluorescence	42
II.2.1. Introduction	42
II.2.2. La polarisation de fluorescence	42
II.2.3. Principe d'un immunodosage par polarisation de	
fluorescence	45
II.2.4. Domaines d'application des immunodosages par	
polarisation de fluorescence	46
II.3. Facteurs influençant un immunodosage par polarisation	
de fluorescence	51
II.3.1. Influence de la réaction antigène - anticorps	51
II.3.2. Influence des facteurs physico-chimiques liés aux	
marqueurs fluorescents	56

III. La fluorescéine	59
III.1. Intérêts et applications.....	59
III.2. Propriétés physico-chimiques et spectrales de la fluorescéine	62
III.2.1. Propriétés physico-chimiques	62
III.2.2. Propriétés spectrales de la fluorescéine.....	66
III.3. Fonctionnalisation de la fluorescéine en vue de la dérivation des acides carboxyliques.....	71
III.4. Etude des possibilités de couplage des dérivés aminés de la fluorescéine avec la fonction carboxyle des éicosanoïdes : la réaction d'amidification.....	71
III.5. Catalyseurs d'amidification	74
III.5.1. Sels de pyridinium	76
III.5.2. Catalyseurs contenant un atome de phosphore	77
III.5.3. Les carbodiimides	78
III.5.4. Les benzotriazoles et apparentés	79

PARTIE EXPERIMENTALE

<u>1ère partie : Etude de l'amidification de la fonction carboxyle par la fluorescéine modifiée</u>	81
--	----

I. Matériel et Méthodes	81
I.1. Réactifs	81
I.2. Matériel	82
I.2.1. Système de purification.....	82
I.2.2. Système analytique.....	82
I.2.3. Détermination des propriétés spectrales	83
I.3. Protocoles de synthèse.....	83
I.3.1. Synthèse de la 5-(((2-aminoéthyl)thio)acétyl)amino) fluorescéine (AEF)	83
I.3.2. Protocoles de dérivation.....	84
I.3.3. Optimisation de la dérivation de l'acide palmitique	86

TABLE DES MATIERES

I.3.4. Dérivation de la prostaglandine E ₁ et du thromboxane B ₂	86
I.3.5. Purification des dérivés fluorescents	88
I.3.6. Propriétés spectrales	89
I.4. Etude de la stabilité du dérivé TxB ₂ - AEF	90
II. Dérivation d'une molécule modèle des éicosanoïdes : l'acide palmitique	91
II.1. Etude des marqueurs	91
II.1.1. Choix du marqueur fluorescent.....	91
II.1.2. Caractéristiques physico-chimiques de la 5-((((2-aminoéthyl)thio)acétyl)amino) fluorescéine.....	95
II.2. Etude des différents systèmes de catalyse.....	97
II.3. Optimisation de la réaction d'amidification.....	100
II.3.1. Optimisation de la phase d'activation par le mélange de catalyseurs	100
II.3.2. Optimisation de la durée et de la température d'amidification	101
II.3.3. Résultats obtenus après optimisation	102
III. Dérivation des éicosanoïdes	104
III.1. Purification des dérivés.....	104
III.1.1. Etude d'un composé modèle : la prostaglandine E ₁ ...	104
III.1.2. Le thromboxane B ₂	106
III.2. Propriétés spectrales du marqueur et des traceurs.....	108
III.2.1. Détermination des longueurs d'onde maximales d'excitation et d'émission	108
III.2.2. Rendement quantique.....	110
III.2.3. Durée de vie et anisotropie de fluorescence	111
IV. Stabilité du traceur TxB₂ - AEF	112
IV.1. Stabilité à sec.....	112
IV.2. Stabilité en solution	112
V. Conclusions	114

<u>2ème Partie : Etude préliminaire : immunodosage par polarisation de fluorescence de la Prostaglandine E₁ (PGE₁)</u>	116
I Matériel et Méthodes	116
I.1. Vérification de l'immunoréactivité du traceur PGE ₁ - AEF	116
I.1.1. Principe général	116
I.1.2. Réactifs et mode opératoire	117
I.1.3. Expression des résultats	118
I.2. Etude du dosage par polarisation de fluorescence	120
I.2.1. Description de l'appareillage	120
I.2.2. Principe des mesures	121
I.2.3. Détermination de la concentration minimale de PGE ₁ -AEF	123
I.2.4. Détermination de la concentration en anticorps	123
I.2.5. Optimisation du temps d'incubation et de la température	124
I.2.6. Courbes d'étalonnage du dosage de la PGE ₁	125
II. Résultats et discussion	126
II.1. Immunoréactivité vis à vis du traceur radioactif tritié (PGE ₁ ³ H)	126
II.2. Etude du dosage par polarisation de fluorescence	130
II.2.1. Optimisation de la concentration en PGE ₁ - AEF	130
II.2.2. Détermination de la concentration en anticorps	132
II.2.3. Détermination de la durée et de la température optimales de la réaction de compétition	134
II.2.4. Etude des courbes d'étalonnage par polarisation de fluorescence	135
III. Conclusions	140

3ème partie : Développement du dosage du thromboxane B₂	141
I. Matériel et Méthodes	141
I.1. Vérification de l'immunoréactivité du traceur TxB ₂ - AEF	141
I.1.1. Réactifs et mode opératoire	141
I.1.2. Expression des résultats	146
I.2. Analyse du thromboxane B ₂ par polarisation de fluorescence	147
I.2.1. Description de l'appareillage et du matériel	147
I.2.2. Détermination de la concentration minimale en TxB ₂ - AEF	147
I.2.3. Influence de la viscosité sur l'anisotropie de fluorescence du dérivé TxB ₂ - AEF	148
I.2.4. Détermination de la concentration en anticorps	149
I.2.5. Courbes de compétition	150
I.2.6. Cinétique de la réaction antigène-anticorps	152
I.2.7. Dosage du thromboxane B ₂ libéré par les plaquettes humaines	152
II. Résultats et discussion	154
II.1. Immunoréactivité du traceur	154
II.1.1. Immunoréactivité vis à vis des traceurs radioactifs	154
II.1.2. Immunoréactivité vis à vis du traceur enzymatique	160
II.2. Analyse du thromboxane B ₂ par polarisation de fluorescence	162
II.2.1. Détermination de la concentration minimale détectable de TxB ₂ -AEF	162
II.2.2. Influence de la viscosité du milieu de mesure	163
II.2.3. Détermination de la concentration en anticorps	166
II.2.4. Courbes d'étalonnage en milieu tampon et en milieu plasmatique	167
II.2.5. Cinétique de la réaction	173
II.2.6. Dosage du thromboxane B ₂ après stimulation des plaquettes humaines	176
III. Conclusion	178

<u>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES</u>	179
---	-----

<u>ANNEXES</u> :	183
-------------------------------	-----

- I. Analyse selon Scatchard des résultats de l'immunoréactivité du traceur PGE₁ - AEF par RIA (³H)
- II. Analyse selon Dandliker de la courbe d'étalonnage de la prostaglandine E₁ par polarisation de fluorescence
- III. Analyse selon Scatchard des résultats de l'immunoréactivité du traceur TxB₂ - AEF par RIA (¹²⁵I)
- IV. Analyse selon Scatchard des résultats de l'immunoréactivité du traceur TxB₂ - AEF par RIA (³H)
- V. Analyse selon Dandliker de la courbe d'étalonnage du thromboxane B₂ par polarisation de fluorescence

<u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u>	188
---	-----

THESE

présentée et soutenue publiquement le 8 septembre 1993
dans le but d'obtenir le titre de :

**DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE
LORRAINE**

Spécialité Génie Biologique

**CONCEPT ET DEVELOPPEMENT D'UN IMMUNODOSAGE
PAR POLARISATION DE FLUORESCENCE DE
BIOMOLECULES A FONCTION CARBOXYLE :
APPLICATION A LA PROSTAGLANDINE E₁ ET AU
THROMBOXANE B₂**

par

Muriel MATT

Membres du Jury

- Mr A. NICOLAS : Professeur à la Faculté des Sciences
Pharmaceutiques et Biologiques de NANCY I
(**Président**)
- Mr P. BROSSIER : Professeur à la Faculté des Sciences
Pharmaceutiques et Biologiques de DIJON
(**Rapporteur**)
- Mr C. SELVE : Professeur à la Faculté des Sciences de NANCY I
(**Rapporteur**)
- Mme M. DONNER : Directeur de recherche INSERM
- Mr J.F. STOLTZ : Professeur à la Faculté de Médecine de NANCY I

LISTE DES FIGURES

Figure 1 :	Structure des 3 séries de prostaglandines	12
Figure 2 :	Métabolisme de l'acide arachidonique	14
Figure 3 :	Mécanisme de l'agrégation plaquettaire	17
Figure 4 :	Structure chimique du thromboxane B ₂ . Influence du pH	22
Figure 5 :	Métabolisme du thromboxane B ₂	23
Figure 6 :	Structure chimique du 11-déhydro thromboxane B ₂	24
Figure 7 :	Principe du dosage par proximité de scintillation	29
Figure 8 :	Dérivation du thromboxane B ₂ pour une analyse par CG-SM	33
Figure 9 :	Schéma des transitions électroniques d'une molécule organique	41
Figure 10 :	Représentation schématique du processus de polarisation ou d'anisotropie de la fluorescence émise	43
Figure 11 :	Principe d'un immunodosage par polarisation de fluorescence	46
Figure 12 :	Influence du marquage de l'antigène sur la courbe de compétition par polarisation de fluorescence	54
Figure 13 :	Courbes théoriques d'immunodosages par polarisation de fluorescence	55
Figure 14 :	Structure chimique de la fluorescéine	59
Figure 15 :	Différentes structures proposées pour la fluorescéine	63
Figure 16 :	Différentes étapes de la transformation acide-base de la fluorescéine	64
Figure 17 :	Fluorescence relative normalisée de la fluorescéine en fonction du pH	68
Figure 18 :	Evolution du rendement quantique de fluorescence de la fluorescéine en fonction du pH	69
Figure 19 :	Schéma de catalyse au BMPI	77
Figure 20 :	Schéma de catalyse au DEPC	78
Figure 21 :	Schéma de catalyse au carbodiimide	79
Figure 22 :	Schéma de catalyse au BOP	80
Figure 23 :	Mécanisme d'amidification du groupe carboxyle de la prostaglandine E ₁ et du thromboxane B ₂ par la 5-(((2-aminoéthyl)thio)acétyl)amino fluorescéine (AEF)	87
Figure 24 :	Structure des différentes fluorescéines à fonction amine synthétisables	92

Figure 25 : Schéma de synthèse de la 4'-aminométhyl fluorescéine (AMF)	93
Figure 26 : Schéma de synthèse de la 5-(((2-aminoéthyl)thio)acétyl)amino) fluorescéine	94
Figure 27 : Profils de pureté de la 5-(((2-aminoéthyl)thio)acétyl)amino) fluorescéine synthétisée et commerciale	95
Figure 28 : Rendements de dérivation de l'acide palmitique par la 5-(((2-aminoéthyl)thio)acétyl)amino) fluorescéine en fonction du système de catalyse	99
Figure 29 : Importance de l'étape d'activation de l'acide palmitique et des catalyseurs	100
Figure 30 : Optimisation de la température et du temps d'amidification	101
Figure 31 : Chromatogrammes des dérivés d'acide palmitique et stéarique par la 5-(((2-aminoéthyl)thio)acétyl)amino) fluorescéine	103
Figure 32 : Contrôle par CLHP du dérivé PGE ₁ - AEF après purification par CCM	106
Figure 33 : Contrôle par CLHP du dérivé TxB ₂ - AEF après purification par CCM	107
Figure 34 : Spectres d'excitation et d'émission normalisés des marqueurs et des dérivés fluorescents	109
Figure 35 : Stabilité à 25 °C du traceur en solution dans le tampon phosphate 0,01 M pH 7,4	112
Figure 36 : Evolution de l'anisotropie de fluorescence en fonction de la durée de congélation dans le tampon phosphate/BSA	113
Figure 37 : Influence du cycle congélation/décongélation du traceur sur sa stabilité en solution	114
Figure 38 : Schéma technique du fluopolarimètre	121
Figure 39 : Courbe d'étalonnage de la prostaglandine E ₁ et de son dérivé fluorescent par RIA	127
Figure 40 : Représentation de Scatchard des courbes de dosage par RIA de la prostaglandine E ₁	128
Figure 41 : Evolution de l'anisotropie de fluorescence en fonction de la dilution du traceur	131
Figure 42 : Influence de la dilution sur l'évolution de l'intensité de fluorescence	132
Figure 43 : Variation de l'anisotropie de fluorescence en fonction du volume d'antisérum anti-prostaglandine E ₁	133

Figure 44 : Cinétique de la fixation du traceur sur l'anticorps en fonction de la température d'incubation	135
Figure 45 : Courbe d'étalonnage de la prostaglandine E ₁ . Evolution de l'anisotropie et de l'intensité de fluorescence	136
Figure 46 : Courbe d'étalonnage cumulée	137
Figure 47 : Représentation de Scatchard des résultats cumulés des courbes d'étalonnage de la prostaglandine E ₁ par polarisation de fluorescence	139
Figure 48 : Structure du thromboxane B ₂ iodé	142
Figure 49 : Courbe de dosage utilisant le traceur iodé en compétition avec du TxB ₂ froid et fluorescent	155
Figure 50 : Représentation de Scatchard du dosage utilisant le traceur iodé	156
Figure 51 : Courbe de dosage utilisant le traceur tritié en compétition avec du thromboxane B ₂ froid et fluorescent	158
Figure 52 : Représentation de Scatchard du dosage utilisant le traceur tritié	159
Figure 53 : Dosage du TxB ₂ -AEF par immunoenzymologie	161
Figure 54 : Evolution de l'anisotropie de fluorescence et de l'intensité de fluorescence du blanc en fonction de la concentration du traceur	163
Figure 55 : Influence de la viscosité du milieu sur l'anisotropie de fluorescence	164
Figure 56 : Variation de l'anisotropie en fonction du volume d'antisérum	166
Figure 57 : Courbe étalon du dosage par polarisation de fluorescence du thromboxane B ₂	168
Figure 58 : Courbe étalon du dosage par polarisation de fluorescence du thromboxane B ₂ ; moyenne des résultats cumulés	169
Figure 59 : Représentation de Scatchard de la courbe d'étalonnage	170
Figure 60 : Comparaison de la courbe d'étalonnage en milieu plasmatique ultrafiltré et dans le tampon PBS/BSA	173
Figure 61 : Cinétique de la réaction antigène-anticorps par polarisation de fluorescence	174
Figure 62 : Suivi de la cinétique de compétition par polarisation de fluorescence	176
Figure 63 : Dosage du thromboxane B ₂ plaquettaire par polarisation de fluorescence	177

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU I :	Description de certains inhibiteurs des récepteurs du thromboxane A ₂	20
TABLEAU II :	Trousses de dosage RIA du thromboxane B ₂ commercialisées	28
TABLEAU III :	Caractéristiques des dosages immunoenzymologiques du thromboxane B ₂	31
TABLEAU IV :	Marqueurs fluorescents utilisés en CLHP dans la dérivation du thromboxane B ₂	36
TABLEAU V :	Marqueurs non fluorescents utilisés dans l'analyse par CLHP du thromboxane B ₂	38
TABLEAU VI :	Immunodosages développés par polarisation de fluorescence	49
TABLEAU VII :	Caractéristiques spectrales des principaux marqueurs utilisés dans les immunodosages par polarisation de fluorescence	57
TABLEAU VIII :	Marqueurs dérivant de la fluorescéine couramment utilisés dans les applications biologiques	61
TABLEAU IX :	Caractéristiques spectrales de la fluorescéine et de ses principaux dérivés	70
TABLEAU X :	Molécules issues de la fluorescéine utilisables dans la dérivation de la fonction carboxyle	72
TABLEAU XI :	Principaux protocoles d'amidification utilisant différents catalyseurs	74
TABLEAU XII :	Protocoles d'amidification	85
TABLEAU XIII :	Evolution de l'absorbance du marqueur en solution	96
TABLEAU XIV :	Recherche d'un solvant pour la dérivation d'un acide carboxylique par la 5-((((2-aminoéthyl)thio)acétyl)amino) fluorescéine	97
TABLEAU XV :	Propriétés spectrales des traceurs et du marqueur	110
TABLEAU XVI :	Protocole opératoire du dosage radio-immunologique de la prostaglandine E ₁ utilisant un traceur tritié	118
TABLEAU XVII :	Analyse selon Scatchard du radioimmunodosage la prostaglandine E ₁	129

TABLEAU XVIII :	Analyse selon Scatchard de la courbe d'étalonnage de la prostaglandine E ₁ par polarisation de fluorescence	139
TABLEAU XIX :	Protocole opératoire du dosage radio-immunologique du thromboxane B ₂ utilisant le traceur iodé	143
TABLEAU XX :	Protocole opératoire du dosage radio-immunologique du thromboxane B ₂ utilisant le traceur tritié	144
TABLEAU XXI :	Protocole opératoire du dosage immuno-enzymologique du thromboxane B ₂ utilisant le traceur enzymatique	146
TABLEAU XXII :	Viscosité relative en fonction du pourcentage de glycérol	148
TABLEAU XXIII :	Protocole opératoire de détermination du volume d'antisérum	150
TABLEAU XXIV :	Protocole opératoire du dosage du thromboxane B ₂ dans du plasma surchargé et en milieu tampon PBS/BSA	151
TABLEAU XXV :	Analyse selon Scatchard des données du dosage du TxB ₂ - AEF utilisant le traceur iodé	157
TABLEAU XXVI :	Analyse selon Scatchard des données du dosage utilisant le traceur tritié	160
TABLEAU XXVII :	Analyse selon Scatchard de la courbe d'étalonnage par polarisation de fluorescence	171
TABLEAU XXVIII :	Influence du plasma sur les valeurs d'anisotropie et d'intensité de fluorescence	172

ABREVIATIONS et SYMBOLES

A :	absorbance
Ac :	anticorps
AEF :	5-((((2-aminoéthyl)thio)acétyl)amino) fluorescéine
Ag :	antigène
B :	fraction d'antigène liée à l'anticorps
BMPI :	iodure de bromométhylpyridinium
BOP :	benzotriazolyl-N-tris(diméthylamino)phosphonium hexafluorophosphate
BSA :	albumine sérique bovine
CCM :	chromatographie sur couche mince
CLHP :	chromatographie liquide haute performance
CPG :	chromatographie en phase gazeuse
DEPC :	diéthylcyanophosphonate
DMF :	N,N diméthylformamide
EDC-HCl :	1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)-carbodiimide, chlorhydrate
F :	concentration en antigène libre
Fb :	fraction liée
Ff :	fraction libre
FITC :	isothiocyanate de fluorescéine
FPIA :	immunodosage par polarisation de fluorescence (fluorescence polarization immunoassay)
HOBT :	1-hydroxybenzotriazole
I// ou I _{hh} :	intensité de fluorescence émise horizontalement pour l'excitation horizontale
I _⊥ ou I _{hv} :	intensité émise verticalement pour l'excitation horizontale
Ka :	constante d'affinité de l'anticorps
NHS :	N-hydroxysuccinimide
p :	polarisation de fluorescence
p ₀ :	polarisation limite de fluorescence
PEG :	polyéthylèneglycol
pf :	polarisation de fluorescence du traceur totalement libre
pb :	polarisation de fluorescence du traceur totalement lié
PGE ₁ :	prostaglandine E ₁
Q :	fluorescence molaire
r :	anisotropie de fluorescence
r ₀ :	anisotropie limite de fluorescence

R : constante des gaz parfaits
Rf : rapport frontal
SM : spectrométrie de masse
T : température
TEA : triéthylamine
TxB₂ : thromboxane B₂
V : volume moléculaire

ε : absorbance molaire
 η : viscosité
 Φ : rendement quantique
 ρ : temps de relaxation rotationnelle
 τ : durée de vie

INTRODUCTION

INTRODUCTION

L'immunoanalyse représente un domaine très important de la biologie moderne. Une étude américaine de 1989 a évalué le marché mondial des réactifs pour le diagnostic biologique à 8,5 milliards de dollars, dont 3 milliards pour les immunodosages. Cette part pourrait dépasser les 5 milliards de dollars en 1995, principalement en raison de l'avènement de tests dits "rapides" et "décentralisés" dont la vocation est d'être utilisés directement sur le terrain.

Parallèlement, dans les laboratoires hospitaliers ou privés, de nouvelles technologies orientées vers l'automatisation et la simplification des immunodosages ont pris une grande importance ces dernières années. Le développement de nouveaux traceurs non isotopiques contribue à la multiplication des sites d'utilisation : les contraintes de sécurité et d'élimination des déchets radioactifs sont supprimées.

Une des méthodes immunologiques pouvant être appliquée au dosage de molécules de faible masse moléculaire est la polarisation de fluorescence. Cette technique permet de pallier les inconvénients liés à l'utilisation d'isotopes et offre une plus grande facilité d'analyse car elle peut être automatisée.

L'objectif de l'étude présentée a été axé sur le concept et le développement d'un immunodosage du thromboxane B₂ (TxB₂) par polarisation de fluorescence.

Le dosage de certains éicosanoïdes, composants carboxyliques de la membrane plaquettaire, présente un grand intérêt dans le domaine biomédical. En effet, la dégradation des phospholipides de la membrane libère différents métabolites susceptibles de provoquer des modifications de l'hémostase et de la thrombose.

L'intérêt et les potentialités d'application d'un immunodosage de métabolites de l'acide arachidonique reposent sur la multiplicité des sites d'action de ces molécules. Mais selon le système biologique étudié, la sensibilité requise pour le dosage est différente : le dosage du TxB₂ peut être effectué après stimulation plaquettaire *in vitro* sous l'action d'agents proagrégants, la concentration est alors de quelques centaines de ng/ml. Lorsqu'il est appliqué à la détermination des concentrations circulantes *in vivo*, la sensibilité doit être comprise entre le pg et la centaine de pg/ml.

Après avoir rappelé l'origine et le rôle des éicosanoïdes ainsi que leur importance dans le domaine biologique, l'intérêt du dosage du TxB₂ est étudié dans la partie bibliographique. Les principales techniques permettant son analyse y sont développées. Les domaines d'application des immunodosages par polarisation de fluorescence sont ensuite exposés ; les avantages et les inconvénients des différents marqueurs employés dans cette technique sont évoqués. La fluorescéine présentant les meilleures caractéristiques, ses propriétés physico-chimiques et spectrales sont exposées. Le greffage de la fluorescéine sur le groupement carboxyle des éicosanoïdes devant se faire par amidification, différents systèmes de catalyses sont recherchés dans le but de les appliquer à la dérivation de ces molécules.

L'obtention d'un traceur pour l'immunodosage du TxB₂ passe par une étape de greffage d'un marqueur fluorescent sur cette biomolécule carboxylique. Après avoir déterminé les potentialités d'amidification de traceurs ayant pour structure commune la fluorescéine, la réaction de dérivation est optimisée sur des acides gras modèles.

L'application de la dérivation aux éicosanoïdes a permis de caractériser les propriétés spectrales des traceurs obtenus.

Un pré-développement de l'immunodosage du TxB_2 est effectué sur une biomolécule de la même famille : la prostaglandine E_1 . La praticabilité de l'immunodosage, la méthodologie est appliquée à la mise au point du dosage du TxB_2 par polarisation de fluorescence. La modélisation du système permet de calculer les différents paramètres du dosage tels que la constante d'affinité de l'anticorps pour le traceur, les limites d'application du dosage.

Le dosage est appliqué à la détermination de la concentration en thromboxane B_2 libéré par les plaquettes humaines après stimulation par un agent proagrégant.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Le thromboxane B₂

L1. Métabolisme de l'acide arachidonique. Origine du thromboxane B₂

Un acide gras, l'acide linoléique subit au niveau de l'hépatocyte des désaturations et des allongements successifs de sa chaîne carbonée grâce à une $\Delta 6$ désaturase. Cette molécule est à l'origine des acides gras essentiels : l'acide dihomoylinoléique, l'acide arachidonique et l'acide éicosapentaénoïque. Ces trois précurseurs, caractérisés par une chaîne carbonée insaturée en C₂₀, sont ensuite incorporés sous forme d'esters de glycérol dans les phospholipides membranaires. Ils seront libérés sous l'action de phospholipases, et en particulier par la phospholipase A₂ en ce qui concerne l'acide arachidonique.

Suivant la voie enzymatique, l'acide arachidonique est métabolisé en leucotriènes, en lipoxines, en acides linéaires hydroxylés, en prostaglandines (PG) ou en thromboxanes (Tx) (Henry, 1988).

Les prostaglandines constituent une famille importante de médiateurs chimiques locaux, rapidement détruits près de leur site de synthèse par des enzymes spécifiques.

Elles sont regroupées en 3 séries (figure 1) selon la nature du précurseur :

- l'acide dihomoylinoléique pour la série 1
- l'acide arachidonique pour la série 2
- l'acide éicosapentaénoïque pour la série 3.

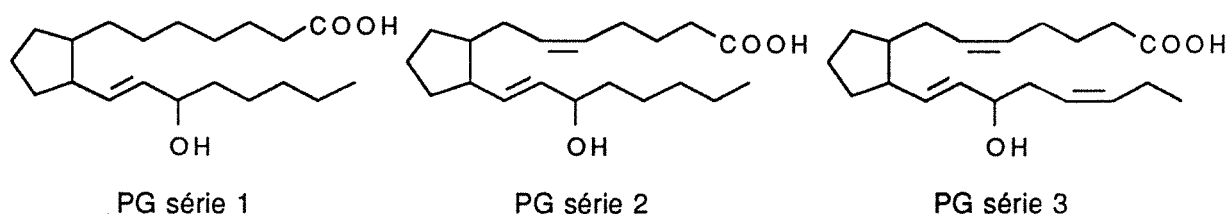


Figure 1 : Structure des 3 séries de prostaglandines

Le numéro de la série correspond au nombre de liaisons insaturées de la molécule.

L'acide arachidonique est le précurseur le plus abondant chez l'homme, ce qui explique la prédominance des prostaglandines de la série 2.

La figure 2 représente le métabolisme de l'acide arachidonique par la voie de la cyclooxygénase (Slater et coll., 1987), plaquettaire et vasculaire, et de la lipoxygénase (Hamberg et Samuelson, 1974), spécifiquement plaquettaire.

La voie spécifique de la synthèse des prostaglandines et en particulier du thromboxane A_2 requiert la transformation de l'acide arachidonique en hydroperoxyde cyclique, PGG_2 , par l'action de la cyclooxygénase, puis en endoperoxyde, PGH_2 , grâce à l'hydroperoxydase. Ces molécules, de courtes durées de vie (Nugteren et Hazelhof, 1973), sont des intermédiaires nécessaires dans la voie de synthèse des thromboxanes.

La PGH_2 est à l'origine de différentes prostaglandines selon la voie métabolique. Trois systèmes enzymatiques sont décrits. Sous l'action d'isomérases et de réductases, la PGH_2 sera métabolisée en PGD_2 ou en PGE_2 qui pourront être converties en $PGF_{2\alpha}$.

La prostacycline synthétase conduira à la PGI_2 , puis par une voie non enzymatique à la 6-céto $PGF_{1\alpha}$.

La thromboxane synthétase catalyse la conversion de PGH_2 en TxA_2 au niveau des plaquettes, des vaisseaux sanguins, du muscle cardiaque et probablement d'autres tissus (Ellis et coll., 1979). La demi-vie de cette molécule est d'environ 30 secondes à la température et au pH physiologiques (Hamberg et coll., 1975). Elle est convertie en TxB_2 , métabolite ayant des propriétés physiologiques communes avec le TxA_2 mais avec une potentialité d'action bien plus faible (environ 100 fois moins) (Lefer et coll., 1980).

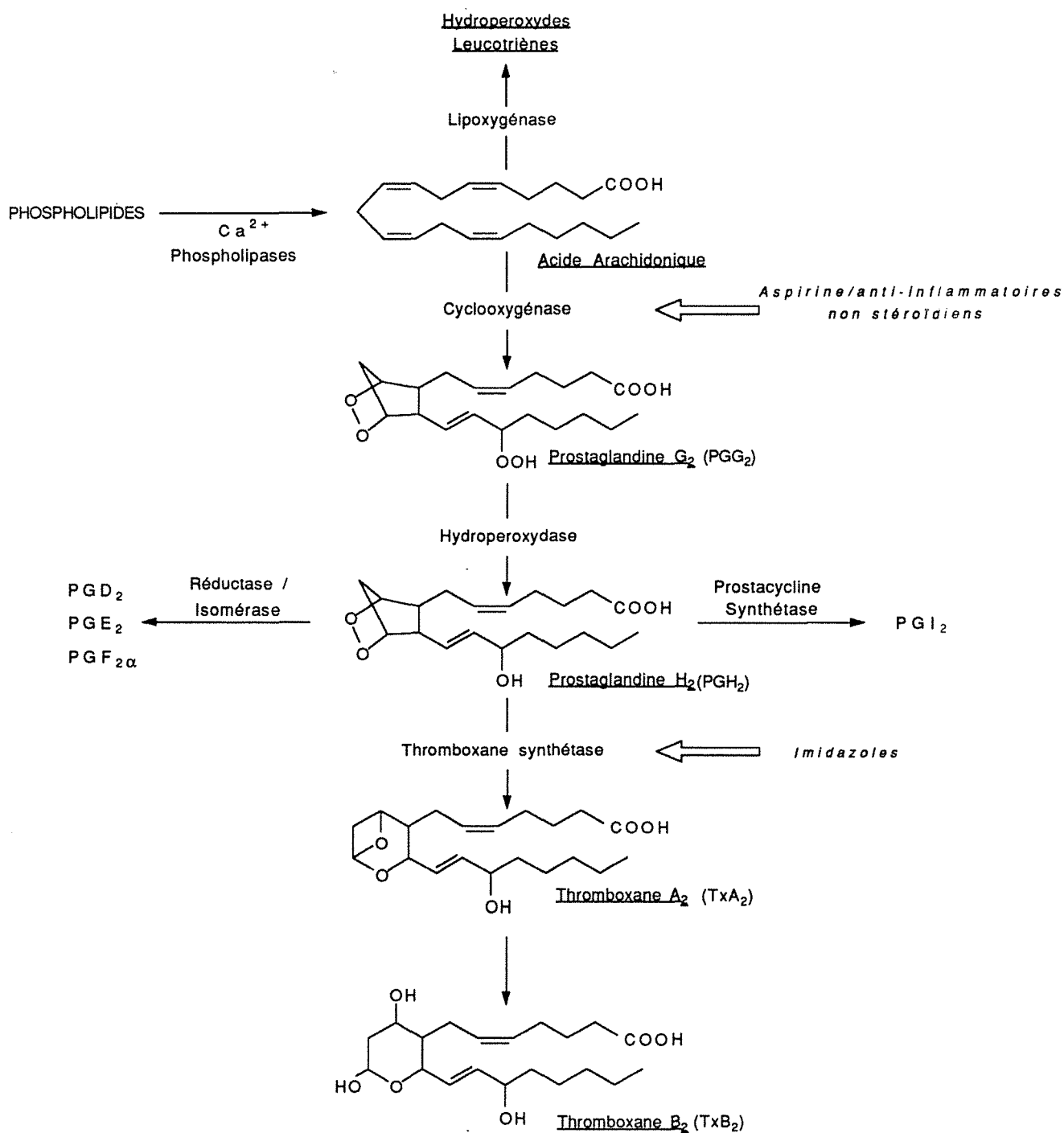


Figure 2 : Métabolisme de l'acide arachidonique

L2. Mécanisme d'action des prostaglandines et des thromboxanes

L'activité biologique des éicosanoïdes est fugace car leur demi-vie est courte, mais très prononcée par rapport à leur faible concentration tissulaire ou plasmatique (< nM).

La multiplicité de leurs actions ainsi que la diversité de leur répartition montrent qu'ils sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques (Henry, 1988) :

- rôle corono-dilatateur ($\text{PGE}_1/\text{PGI}_2$) et vaso-constricteur ($\text{TxA}_2/\text{PGF}_{2\alpha}$) sur le système cardiovasculaire
- action broncho-constrictrice ($\text{TxA}_2/\text{PGF}_{2\alpha}$ /endoperoxydes) et broncho-dilatatrice (PGE_1) sur le système respiratoire
- effet vasodilatateur sur le système rénal
- action sur toutes les phases de la sphère génitale
- contrôle de la motricité et cytoprotection du système gastro-intestinal
- au niveau du système nerveux, endocrinien et immunitaire
- et plus particulièrement un contrôle de l'hémostase et de la thrombose pour le TxA_2 .

D'autres effets ont également été observés dans la physiologie du tissu oculaire (Abdel Latif, 1991) sans avoir été élucidés, sur le contrôle de la croissance cellulaire (Amici, 1992) et sur l'amplification de la réaction douloureuse et de l'inflammation.

Un intérêt important est porté depuis de nombreuses années aux maladies cardiovasculaires et plus particulièrement aux risques de thrombose liés à une activation pathologique de l'agrégation plaquettaire.

Il existe de multiples voies entraînant l'agrégation plaquettaire (figure 3). Parmi elles, la voie des éicosanoïdes est un des mécanismes prépondérant. Les endoperoxydes PGG_2 et PGH_2 , et surtout le TxA_2 , sont de puissants inducteurs de l'agrégation plaquettaire (Fitzgerald et coll., 1990) alors que la PGE_1 , par un mécanisme d'action sur l'AMP cyclique (Kloeze, 1969), la PGD_2 et surtout la prostacycline sont de puissants inhibiteurs (Bohr et Webb, 1984).

Les mécanismes de base de la formation d'une thrombose artérielle s'apparentent à ceux de l'hémostase primaire mais sa localisation et son développement sont anormaux. Les thrombocytes produisent essentiellement le TxA_2 , tandis que la prostacycline vasodilatatrice, considérée comme le plus puissant antiagrégant connu, est synthétisée par les cellules de la paroi vasculaire. Il s'instaure un équilibre permanent entre les plaquettes et la paroi vasculaire de telle sorte que la prostacycline circulant inhibe l'adhésion des plaquettes au vaisseau sain. En cas de pathologie particulière ou de brèche vasculaire limitée, l'équilibre est déplacé en faveur du TxA_2 (Matsumoto et coll., 1992).

Le mécanisme moléculaire de l'action de ces éicosanoïdes repose sur les interactions avec les nucléotides cycliques et l'ion calcium, médiateurs intra-cellulaires. Le TxA_2 et les endoperoxydes inhibent l'adénylcyclase par l'intermédiaire d'une augmentation de la concentration en AMP cyclique alors que les PGE et la prostacycline stimulent l'adénylcyclase (Henry, 1988).

Ce mécanisme a pu être expliqué récemment grâce à l'action d'inhibiteurs ou d'inducteurs chimiques dans l'étude du métabolisme de l'acide arachidonique ainsi que dans celle des récepteurs plaquettaires du thromboxane A_2 (Busse et Seuter, 1979).

Un autre modèle plus complexe (Fitzgerald et coll., 1990) fait intervenir la présence de récepteurs différents, sur la membrane plaquettaire, pour la PGH_2 et le TxA_2 , ces récepteurs étant caractérisés par la fixation réversible (récepteur du TxA_2) ou irréversible (récepteur de la PGH_2) de l'antagoniste GR32191 (Lumley et coll., 1989). L'existence de ces récepteurs ou de différents degrés de modifications post-translationnelles d'un seul récepteur pour expliquer cette variation d'affinité reste encore à étudier.

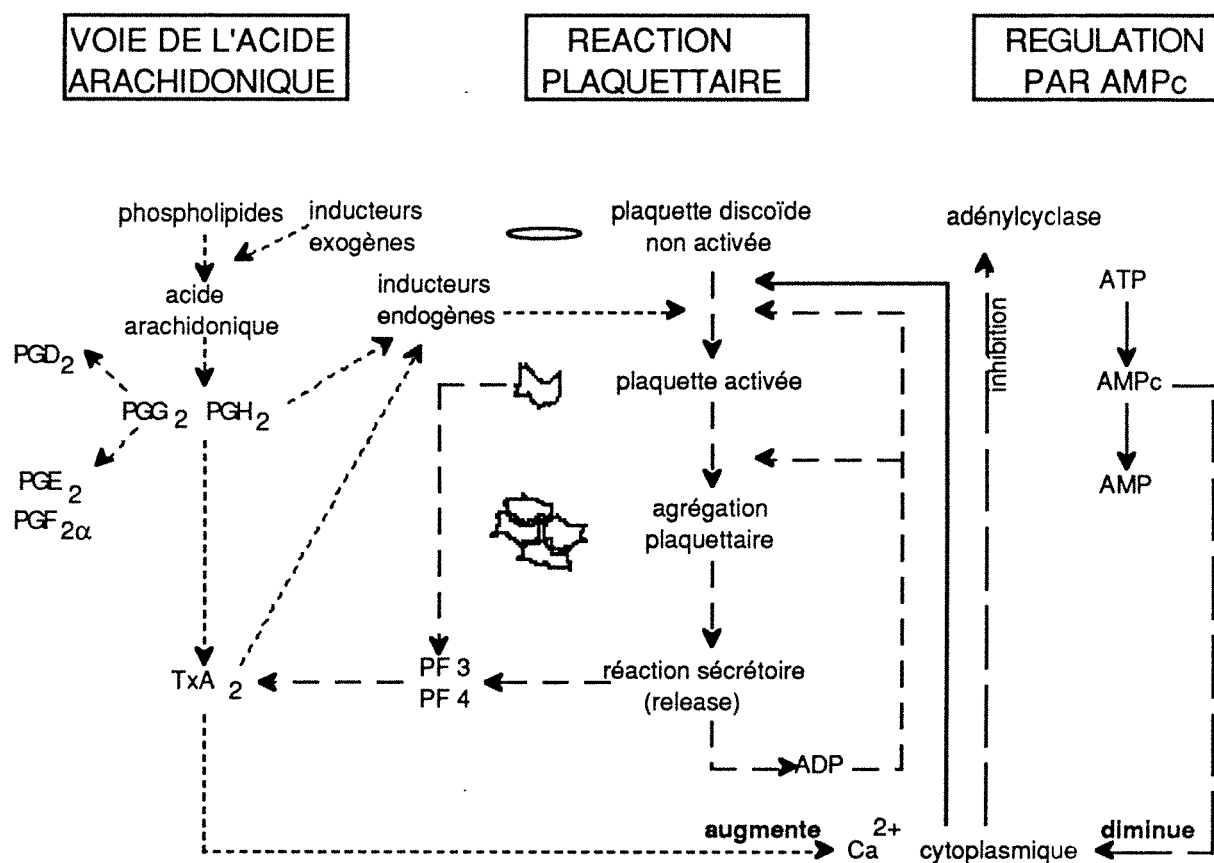


Figure 3 : Mécanisme de l'agrégation plaquettaire

PF3 : facteur plaquettaire 3, phospholipides essentiellement représentés par la phosphatidylsérine et la phosphatidyléthanolamine.

PF4 : facteur plaquettaire 4, protéine cationique localisée dans les granules et la membrane plaquettaires.

Les inducteurs exogènes sont : l'ADP, l'adrénaline, le collagène et la thrombine.

L3. Modification de l'activité des thromboxanes par les médicaments

Certains médicaments et analogues structuraux des éicosanoïdes n'ont pas les mêmes sites d'action enzymatiques dans la cascade de l'acide arachidonique, induisant des modifications de la synthèse ou de l'activité du TxA_2 , précurseur actif du TxB_2 .

Ils agissent soit au niveau de la prostaglandine G/H synthétase, soit sur le récepteur de l'endoperoxyde.

Les modifications des sites sont soit irréversibles (exemple de l'aspirine) ou réversibles, mais la durée d'action des médicaments est dépendante de la dose.

I.3.1. Inhibition de la synthèse du thromboxane A₂

La modification d'une seule des voies d'activation des plaquettes, en particulier celle du TxA₂, a une grande incidence sur l'état cardiovasculaire (Fitzgerald et coll., 1983). Ceci reflète l'importance du TxA₂ en tant qu'amplificateur du signal provoqué par les autres agonistes des plaquettes (PGI₂, PGH₂). Il peut y avoir une régulation fine de la réponse plaquettaire en modifiant la synthèse de TxA₂ et de son précurseur dans la voie des endoperoxydes, la PGH₂ (Vacas et coll., 1991).

I.3.1.1. L'aspirine et les anti-inflammatoires non stéroïdiens : inhibition de la cyclooxygénase.

L'**aspirine** exerce ses effets par une inhibition de la formation de thromboxane dans les plaquettes. Elle modifie le résidu sérine-530 de la prostaglandine G/H synthétase (ou cyclooxygénase) en l'acylant de façon irréversible (Smith et coll., 1981).

Une dose unique de 0,5-1,0 g d'aspirine provoque une inhibition substantielle de la synthèse de TxA₂ pendant 2 à 3 jours. Le taux normal de l'enzyme est rétabli au bout de 8-10 jours, les cellules nucléées telles que les cellules endothéliales étant capables de synthétiser à nouveau des cyclooxygénases. L'action de l'aspirine permet de prévenir 1/4 à 1/3 des accidents vasculaires (Patrono et coll., 1990).

De nombreux anti-inflammatoires non stéroïdiens tels que le naproxène (Vesterqvist et Green, 1989), l'indométacine (Le Guennec et coll., 1991) et le piroxicam (Drvota et coll., 1990) inhibent de façon réversible et compétitive la cyclooxygénase tant que ces médicaments ne sont pas éliminés de la circulation sanguine. L'ibuprofène, le flurbiprofène, le fénoprofène (Patrono et coll., 1979) et la phénylbutazone (Reed et coll., 1985) ont également été utilisés dans ce but.

I.3.1.2. L'imidazole et analogues : action sur la thromboxane synthétase

L'imidazole est couramment employé en tant qu'anti-agrégant lors des prélèvements sanguins. Son action porte principalement sur l'inhibition de la thromboxane synthétase, mais il agit également sur la stimulation de la phosphodiesterase et sur les processus calcium-dépendants (Needleman et coll., 1977).

Divers analogues de cette molécule ont également présenté un intérêt : le FCE 22178 (l'acide 2-dihydro-5,6-(1H-imidazol-1-yl)-7-naphtoïque) a montré une aptitude à inhiber la synthèse du TxA_2 chez des malades atteints de néphropathie diabétique (Alessandrini et coll., 1990), améliorant les fonctions rénales et réduisant les protéinuries. Le FCE 22178 est un inhibiteur puissant et durable de la thromboxane synthétase pouvant être utilisé dans l'étude de la physiopathologie rénale ou plaquettaire.

I.3.2. Inhibition des récepteurs du thromboxane A_2

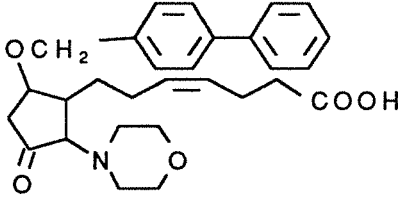
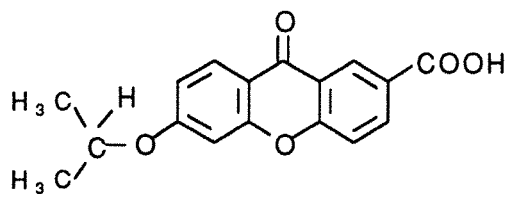
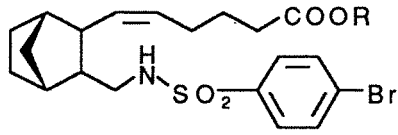
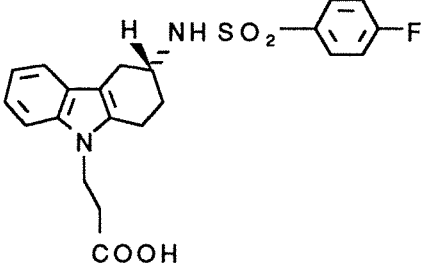
En bloquant la cyclooxygénase, la synthèse de TxA_2 est diminuée mais une modification de la synthèse de prostacycline (PGI_2) est également observée. Cet effet n'est pas recherché dans certains états pathologiques, par exemple l'infarctus du myocarde, la PGI_2 exerçant des effets bénéfiques. La prostacycline désagrège les caillots de plaquettes (Moncada et Vane, 1977), prévient leur agrégation (Moncada et Vane, 1977) et entraîne des vasodilatations (Moncada, 1976).

L'inhibition de l'action du thromboxane A_2 sur ses récepteurs, par des molécules antagonistes, a été recherchée. Ces molécules présentent des analogies structurales ou tridimensionnelles avec la partie cyclique du TxA_2 .

Alors qu'il existe peu d'antagonistes des différents récepteurs des prostaglandines, de nombreuses molécules à structures chimiques très différentes peuvent être utilisées en tant qu'antagonistes du récepteur du TxA_2 . Certaines de ces molécules utilisées *in vivo* ou *in vitro* dans l'étude de ce récepteur sont décrites dans le tableau I.

Ces molécules présentent un intérêt certain dans l'étude du mécanisme d'action du TxA_2 , cependant elles n'ont pas encore été étudiées chez l'homme.

TABLEAU I
DESCRIPTION DE CERTAINS INHIBITEURS DES RECEPTEURS
DU THROMBOXANE A₂

Molécule	Structure chimique	Potentialité d'actions	Références
AH23848		Actif <i>in vivo</i> à de faibles concentrations Utilisé dans l'étude des récepteurs sur les animaux vivants	Coleman, 1987
AH6809		Utilisation <i>in vitro</i> : forte affinité pour l'albumine - à faible concentration, antagoniste des récepteurs PGE/PGD - à forte concentration, antagoniste du TxA ₂	Coleman, 1987
ONO8809	 $R = (CH_2)_9CH_3$	Action <i>in vivo</i> démontrée dans le cas de thrombose de l'artère coronaire chez le chien	Wakitani, 1990
BAY U 3405		Action <i>in vivo</i> démontrée chez le lapin en empêchant la mort subite provoquée par l'injection de TxA ₂	Seuter et coll., 1990

I.4. Intérêt du dosage du thromboxane B₂. Problèmes liés à la nature de la molécule.

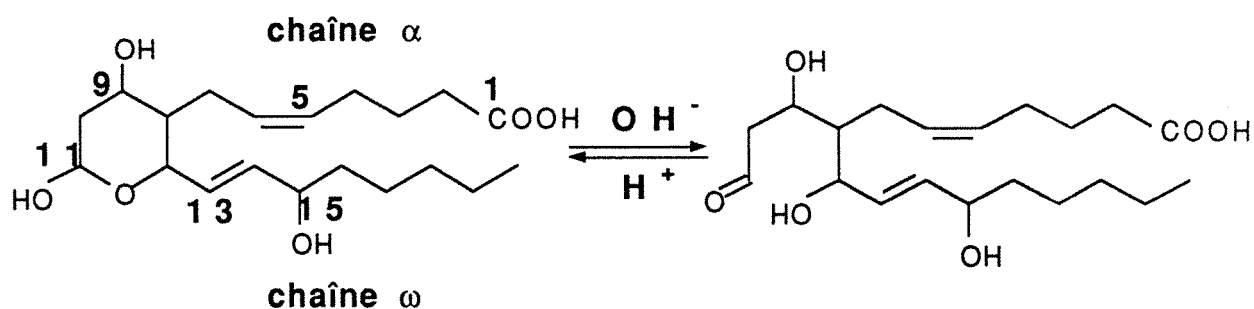
L'importance du dosage du TxB₂ relève du fait qu'il est le métabolite direct du TxA₂, molécule fortement impliquée dans l'hémostase et la thrombose, mais de trop courte durée de vie pour pouvoir être dosée dans les milieux biologiques (Hamberg et coll., 1975). Le dosage du TxB₂ sert également à mesurer l'activité pharmacologique de certains anti-inflammatoires non stéroïdiens (Fitzgerald et coll., 1983), dans l'étude de nouveaux inhibiteurs de la thromboxane synthétase (Matsumoto et coll., 1992) ou d'antagonistes des récepteurs plaquettaires du TxA₂ (Vermynen et Deckmyn, 1992).

Le rôle possible de la production accrue de TxA₂ lors des pathologies cardiovasculaires a été recherché grâce à des dosages radioimmunologiques ou chromatographiques du TxB₂ sérique, plasmatique ou urinaire (Patrono et coll., 1986 ; Fitzgerald et coll., 1983).

Le choix du milieu biologique servant aux dosages est important : les taux urinaires semblent refléter de façon prédominante une biosynthèse rénale (Fitzgerald et coll., 1983) alors que les concentrations sériques correspondraient plus à une activité biosynthétique de production de TxA₂ lié au nombre de plaquettes (Thorngren et coll., 1983 ; Carter et Hanley, 1985).

Le dosage plasmatique semble être le meilleur paramètre caractérisant l'activation *in vivo* des plaquettes. Cependant les concentrations plasmatiques physiologiques diffèrent suivant les auteurs (de 7 à 300 pg/ml). Cette variation est liée à la stimulation des cellules sanguines lors du prélèvement, ainsi les concentrations mesurées ne reflètent pas véritablement le niveau plasmatique endogène qui est de l'ordre de 2 pg/ml (Patrono et coll., 1986 ; Patrono et Ciabattoni, 1987).

Un problème important, plus particulièrement lié à la nature chimique de la molécule de TxB₂ a été soulevé lors des dosages immunologiques ou chromatographiques. La figure 4 représente la structure chimique du TxB₂ sous la forme semi-acétalique susceptible de s'ouvrir dans certaines conditions de pH (Moonen et coll., 1983). Cet équilibre entre les deux formes, ouverte ou fermée, peut générer deux pics en analyse par CLHP (Ben Gueddour, 1987) ou modifier l'affinité des anticorps (Ciabattoni et coll., 1990).



Forme fermée

Forme ouverte

acide (5Z, 9 α , 11RS, 13E, 15S)-9,11,15-trihydroxythromboxa-5,13-diène-1-oïque

Figure 4 : Structure chimique du TxB₂. Influence du pH

L5. Métabolisme du thromboxane B₂

Les problèmes de dosage du TxB₂ en milieu plasmatique ou urinaire peuvent être résolus en étudiant le métabolisme *in vivo* de cette molécule. Un intérêt important est porté actuellement au dosage de certains de ses métabolites depuis la découverte (Roberts et coll., 1977) du 2,3-dinor TxB₂, puis du 11-déhydro TxB₂ et de 18 autres métabolites minoritaires en 1981 (Roberts et coll., 1981).

La figure 5 représente le mécanisme de métabolisation du TxA₂ conduisant à ces 2 molécules.

Alors que le 11-déhydro TxB₂ a été identifié à de très faibles concentrations au niveau plasmatique (1 à 2 pg/ml) (Kumlin et Granström, 1986), sa concentration est comprise entre 390 et 1500 pg/ml (ou 315 ± 185 pg/mg de créatinine) dans les urines (Schweer et coll., 1987).

Le 2,3-dinor TxB₂ se trouve dans des domaines de concentration proches (250 ± 151 pg/mg de créatinine) (Patrono et Ciabattoni, 1987) mais avec un rapport dinor/déhydro pouvant varier de 1 : 3 à 1 : 5 (Uedelhoven et coll., 1989).

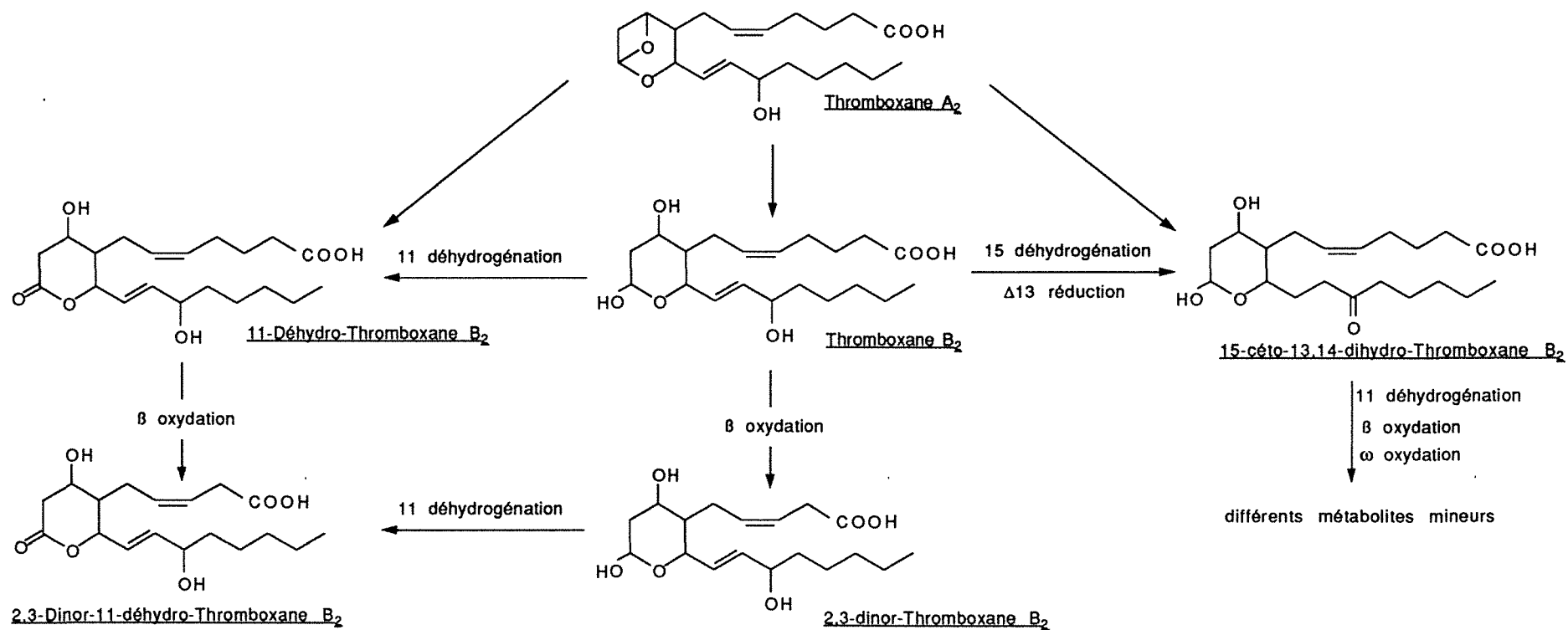


Figure 5 : Métabolisme du thromboxane B_2

Il apparaît que le dosage du 11-déhydro TxB₂ est un excellent indice représentatif de la synthèse de TxA₂ *in vivo* (Sinzinger et coll., 1990 ; Chiabrando et coll., 1992 ; Takasaki et coll., 1993) car sa concentration est relativement importante dans les urines et le prélèvement de l'échantillon biologique n'influe pas sur sa formation.

Dans les conditions physiologiques, le 2,3-dinor TxB₂ et le 11-déhydro TxB₂ urinaires sont considérés comme étant produits majoritairement par les plaquettes. Cependant les problèmes posés par la structure du TxB₂ (forme semi-acétalique, forme ouverte) pour le dosage de ces métabolites par des méthodes chromatographiques ou immunologiques restent identiques. Les 2 formes sont présentes en fonction du pH (figure 6).

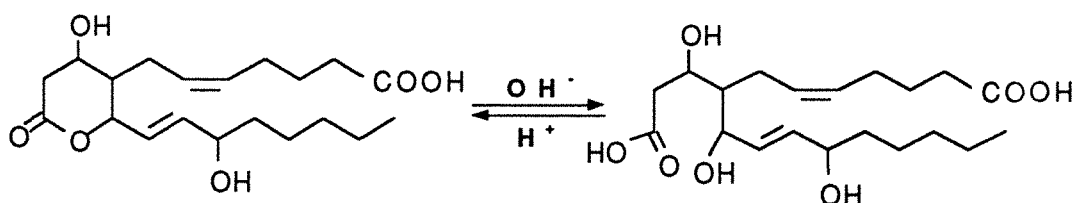


Figure 6 : Structure chimique du 11-déhydro TxB₂

Equilibre entre la forme δ lactone et la forme ouverte en fonction du pH.

En solution à pH 2, le 11-déhydro TxB₂ est à 90 % sous la forme lactone après 48 heures d'incubation. Il se retrouve à 90 % sous la forme ouverte à pH 7,4 (Kumlin et Granström, 1986). Cependant le processus d'équilibre est plus long lorsque le pH approche de la neutralité et que la température est basse.

Cette modification de structure touche également l'affinité de la reconnaissance Ag-Ac qui est fonction du pH. Malgré le couplage du carboxyle en C1 à la protéine porteuse à un pH relativement acide, les Ac produits après immunisation présentent une meilleure affinité à pH 9,2 qu'à pH 7 (aux pH extrêmes le complexe Ag-Ac se dissocie) (Ciabattoni et coll., 1990). Cette différence est liée à l'animal (le lapin) utilisé pour l'obtention des anticorps. Au pH physiologique, la température de l'animal favorise fortement la formation de la forme ouverte.

Ces phénomènes montrent la complexité de la mise en place d'un immunodosage, que ce soit pour le TxB₂ ou ses métabolites.

I.6. Méthodes d'analyse du thromboxane B₂ et de ses principaux métabolites

Différentes méthodes ont été proposées pour l'étude des métabolites de l'acide arachidonique. Les biodosages (Piper, 1987) (mesure de l'activité d'une molécule sur un organe ou des cellules) ou la chromatographie sur couche mince (Salmon et Flower, 1982) sont employés dans l'identification ou la quantification avec des sensibilités moindres que les méthodes immunologiques ou la chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

Mais ces méthodes ont permis l'identification de certains éicosanoïdes ainsi que la détermination de leur activité biologique (Vane, 1983 ; Piper, 1987) : l'activité du TxA₂ a été déterminée par biodosage grâce à l'agrégation plaquettaire (Gerrard, 1982).

Les biodosages restent essentiels dans l'analyse des molécules très instables (Folco et Sala, 1987) qui n'auraient pas pu être identifiées sans cette technique.

I.6.1. Préparation de l'échantillon

Quelle que soit la méthode de dosage utilisée pour la détermination des éicosanoïdes, une étape de purification de l'analyte est prérequis. Cette étape sera plus ou moins poussée pour les méthodes immunologiques ou chromatographiques selon la nature.

Les méthodes de purification des milieux plasmatiques, sériques ou urinaires utilisées sont :

- l'extraction liquide / liquide (Maas et coll., 1982)
- l'extraction liquide / solide sur silice greffée (Martineau et Falardeau, 1987)
- les méthodes chromatographiques telles que la chromatographie sur couche mince (CCM), la chromatographie liquide à haute performance (CLHP) (Maas et coll., 1982), la chromatographie d'affinité (Chiabrando 1989, Hubbard, 1987) ou la chromatographie liquide sur support greffé par l'acide phénylboronique après méthoximation (bloquage de la fonction semi-acétalique en position ouverte) du TxB₂ ou de ses métabolites (Catella et Fitzgerald, 1990 ; Lawson et coll., 1985).

Des combinaisons de ces méthodes sont également utilisées mais avec des rendements d'extraction fortement diminués (de 90% à 15%) (Lawson et coll., 1985).

I.6.2. Méthodes immunologiques

I.6.2.1. Rappel des principes des dosages immunologiques appliqués aux éicosanoïdes

Les premiers dosages des métabolites de l'acide arachidonique ont été développés en utilisant des méthodes immunologiques (Maclouf et coll., 1976 ; Granström et Kindahl, 1978). Elles reposent sur l'utilisation d'anticorps (Ac) poly- ou monoclonaux (Boutten et coll., 1993), spécifiques de l'analyte à doser (Ag), ainsi que d'un antigène marqué (Ag*) détectable par radiométrie ou spectrométrie. Le traceur peut être un isotope radioactif tel que le tritium (^3H) ou l'iode 125 (^{125}I), une enzyme (Maclouf et coll., 1987 ; Takasaki et coll., 1991), une molécule fluorescente (Luke et Schlegel, 1990) ou plus rarement un traceur de chimiluminescence (Weerasekara et coll., 1983 ; Morello et coll., 1991).

La majorité des méthodes développées ou commercialisées reposent sur la compétition entre l'antigène à doser et l'antigène marqué pour les sites de l'anticorps en quantité limitée. Les techniques utilisant l'anticorps en excès ont été peu étudiées pour le dosage des éicosanoïdes du fait de la faible masse moléculaire de ces composés.

La mesure du signal nécessite une étape de séparation du complexe Ag-Ac et de l'Ag libre. Ces méthodes en phase hétérogène peuvent entraîner une diminution de la précision du dosage et contribuer aux liaisons non spécifiques des analogues ou métabolites présents dans le milieu à doser (plasma, sérum, urine) (Granström et Kindahl, 1978).

Les dosages en phase homogène ne nécessitant pas d'étape de séparation (plus simples de mise en œuvre et automatisables) ont été récemment envisagés.

Le dosage par proximité de scintillation (SPA : Scintillation Proximity Assay) des principaux métabolites de l'acide arachidonique (TxB₂, 6-céto-PGF_{1α}, PGE₂, PGD₂, PGF_{2α}) a été développé et commercialisé par la société Amersham (Baxendale et coll., 1990).

I.6.2.2. Marqueurs isotopiques

Les radio-immunodosages permettent d'atteindre des limites de quantification de l'ordre du picogramme grâce à l'énergie des marqueurs utilisés (18,6 keV pour ^3H , 35 keV pour ^{125}I). Ces méthodes ont été développées depuis les années 70 (Maclouf et coll., 1976 ; Granström et Kindahl, 1978, Fitzpatrick, 1982) et elles restent les plus utilisées dans les études physiopathologiques (Stier et coll., 1992) ou pharmacologiques (Vial et coll., 1990) nécessitant un dosage du TxB_2 .

Bien que les dosages radioimmunologiques soient applicables directement pour les fluides biologiques, des purifications préalables par CLHP (Gelpi et coll., 1989) ou par extraction (Powell, 1987) sont préconisées dans l'analyse du TxB_2 . Une dilution de l'échantillon qui minimiserait les artéfacts de mesure ou les réactions croisées liées aux molécules biologiques ne peut être employée du fait de la faible concentration en TxB_2 .

Le tableau II rassemble les caractéristiques des différentes troupes de TxB_2 commercialisées.

Les techniques développées pour le TxB_2 reposent toutes sur la méthode par compétition. La séparation de la fraction libre de TxB_2 de la fraction liée à l'Ac se fait par adsorption de la fraction libre sur charbon dextran (Campbell et Ojeda, 1987 ; Fitzgerald et coll., 1983), par précipitation du complexe Ag-Ac par le polyéthylèneglycol (Maurin, 1986 ; Desbuquois et Aurbach, 1971) ou par un deuxième anticorps. Cette dernière méthode est peu utilisée car elle donne des précipitations incomplètes de la fraction liée et cette étape est facilement perturbée par de nombreux facteurs (Granström et Kindahl, 1978).

La mesure de la radioactivité du surnageant, dans le cas du marquage au tritium (émetteur β^-), nécessite un liquide de scintillation dont les rendements de comptage peuvent être diminués à 40%. Le marquage à l'iode permet une mesure du surnageant ou du précipité, sans adjonction de liquide de scintillation, dans un compteur γ .

TABLEAU II
TROUSSES DE DOSAGE RIA DU THROMBOXANE B₂
COMMERCIALISEES

Société	Isotope utilisé	Mode de séparation	Concentrations (pg/tube)	Principales réactions croisées (>1%)
NEN	³ H	charbon-dextran	5 - 250	PGD ₂ 2 %
	¹²⁵ I	PEG 6000	1 - 100	PGD ₂ 2,9 %
Advanced Magnetic Inc	³ H	charbon-dextran	8 - 200	-
	¹²⁵ I	2ème Ac couplé à des billes magnétiques	4 - 100	-
Pasteur	¹²⁵ I	2ème Ac + PEG	0,8 - 200	dinor-2,3 TxB ₂ et TxB ₁ > 1%
Amersham	³ H	charbon-dextran	5 - 300	PGD ₂ 1,2%
	¹²⁵ I	Amerlex (support magnétique)	3 - 400	PGD ₂ 2,5%
	³ H (SPA)	sans séparation	5 - 300	PGD ₂ 1,2% dinor-2,3 TxB ₂ 16,3%

L'étape de séparation a été éliminée par le récent développement d'un dosage par proximité de scintillation (SPA : Scintillation Proximity Assay) (Baxendale et coll., 1990).

Le dosage est également basé sur la compétition de l'analyte (marqué ou non) pour une quantité limitée en sites anticorps. Après la réaction de compétition, la solution est mise en contact avec le réactif du SPA inclus dans une matrice solide. Il consiste en des microsphères qui ont la propriété d'émettre une fluorescence lorsqu'elles sont excitées par une énergie radioactive. Elles sont recouvertes d'anticorps (anti-analyte ou d'un deuxième anticorps anti-immunoglobuline) ou de protéine A (figure 7).

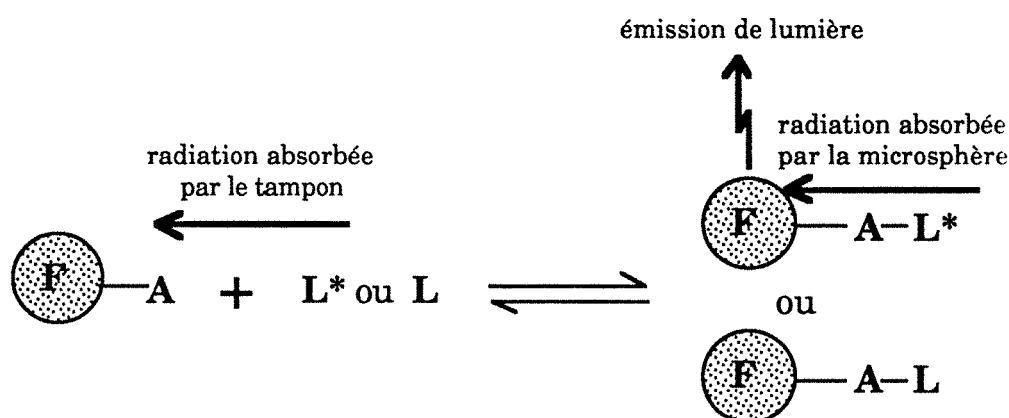


Figure 7 : Principe du dosage par proximité de scintillation

F : fluoromicrosphère ; A : 2ème anticorps ou protéine A ; L : analyte radiomarqué lié à l'anticorps spécifique ; L : analyte froid lié à l'anticorps*

La faible distance existant entre la molécule radiomarquée L* (fixée à l'anticorps) et la microsphère fluorescente, permet une excitation du fluorophore (Bosworth et Towers, 1989 ; Udenfriend et coll., 1985). L'émission de la fluorescence, indicateur de la liaison Ag*-Ac, est mesurée dans un compteur à scintillation classique.

Le traceur radioactif utilisé peut être le tritium mais également l'iode 125.

I.6.2.3. Marqueurs non isotopiques

* Marqueurs enzymatiques

Les marqueurs enzymatiques représentent la majorité des marqueurs non isotopiques utilisés pour le dosage des écosanoïdes.

Tout comme en RIA, le système repose sur la compétition. La possibilité de marquer l'anticorps à la place de l'antigène a été envisagée (Miller et coll., 1985).

L'étape de séparation de la fraction libre de l'éicosanoïde de sa fraction liée à l'anticorps se fait par lavage lorsque l'anticorps est fixé au tube (Pradelles et coll., 1985 ; Giessler et coll., 1988). Pour les dosages en phase liquide, la séparation est effectuée grâce à un deuxième anticorps précipitant (Sawada et coll., 1985), l'activité enzymatique est alors déterminée sur le précipité remis en solution.

Différents systèmes enzyme-substrat sont utilisés pour déterminer le pourcentage d'analytes fixés à l'anticorps : la réaction enzymatique libère une molécule fluorescente ou absorbant dans le visible. Le tableau III rassemble les caractéristiques des différents dosages développés ou commercialisés.

Le dosage dans les milieux biologiques nécessite, tout comme en RIA, une étape de purification de l'analyte. Les limites de quantification du TxB_2 par méthode immuno-enzymologique sont comparables à celles obtenues en RIA (de l'ordre du pg par dosage). Des trousse de dosage des métabolites du TxB_2 (2,3-dinor TxB_2 , 11-déhydro TxB_2) sont également commercialisées (Cayman Chemical, Ann Arbor, USA).

* Autres marqueurs

D'autres méthodes spectrales telles que la chimiluminescence ou la fluorescence permettent la quantification de la réaction Ag-Ac, que ce soit pour le TxB_2 ou les prostaglandines.

Une détection de l'ordre du picogramme a été obtenue en chimiluminescence après marquage du TxB_2 par l'aminohexyl-1 isoluminol (Weerasekera et coll., 1983 ; Morello et coll., 1991).

L'euporium a été utilisé récemment pour la détermination de la $\text{PGF}_{2\alpha}$ dans un dosage par fluorescence résolue dans le temps (Luke et Schlegel, 1990). La limite de quantification est de l'ordre de 2 pg, mais cette technique nécessite des étapes de couplage multiples : la polylysine (PL) sert de support à la $\text{PGF}_{2\alpha}$ ainsi qu'à une molécule (l'acide diéthylènetriamine penta-acétique) complexant l'euporium (Eu). Le rapport de couplage $\text{PGF}_{2\alpha}$: PL : Eu est de 2 : 1 : 12. La réaction Ag-Ac est réalisée en phase solide, et, après des étapes de lavage, l'euporium est chélaté par de la naphtyl-2 trifluoro acétone. La fluorescence est ensuite mesurée par un fluorimètre à résolution dans le temps.

TABLEAU III
CARACTERISTIQUES DES DOSAGES IMMUNOENZYMOLOGIQUES DU THROMBOXANE B₂

Enzyme	Substrat	Mode de détection	Limite de quantification	Réactions croisées >1%	Références
β - galactosidase	4-méthyl ombelliferyl β D galactoside	Fluorescence 360/450 nm	7 pg	-	Yamamoto et coll., 1987 Sawada et coll., 1985
acétylcholin- estérase	réactif d'Ellman	Absorption à 412 nm	1 pg	TxB ₁ 2,3-dinor TxB ₂	Laboratoire des stallergènes Pradelles et coll., 1990 Lellouche et coll., 1990
peroxydase	phénylènediamine	Absorption à 492 nm	4,5 pg	2,3-dinor TxB ₂	Reinke et coll., 1989
phosphatase alcaline	phosphate de para nitrophényl	Absorption à 405 nm	-	-	Advanced Magnetics Inc.

1.6.3. Méthodes chromatographiques

1.6.3.1. Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

L'analyse des éicosanoïdes par chromatographie en phase gazeuse reste une des méthodes les plus utilisées malgré les étapes de purification plus drastiques que pour les méthodes précédemment décrites.

La détection et la quantification se font en général par spectrométrie de masse (SM) après ionisation chimique ou par impact électronique. L'ajout d'une molécule analogue marquée par un isotope stable (^2H ou ^{18}O) en tant qu'étalon interne permet une analyse quantitative (Hubbard et coll., 1983).

Cette méthode nécessite des étapes de dérivation des fonctions polaires (blocage des fonctions carboxyle, hydroxyle et cétone) pour le processus chromatographique.

* L'étape de purification

Des processus de purification sont requis avant une analyse des éicosanoïdes par CG couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM) du fait de leur faible concentration dans les milieux biologiques.

Il est important d'éliminer tous les contaminants (issus des échantillons biologiques, des solvants, des réactifs) qui pourraient interférer au niveau de l'étape de dérivation ou qui provoqueraient des artéfacts à l'analyse : apparition de pics parasites ou suppression de l'ionisation au niveau de la détection.

* L'étape de dérivation

Alors qu'une étape de méthoximation est prérequis dans le cas d'une extraction sélective sur colonne greffée par l'acide phénylboronique, les différentes dérivations sont réalisées en général après purification.

L'estérification de la fonction carboxyle est réalisée grâce au bromure de pentafluorobenzyl, l'étherification des groupements hydroxyles par le N,N-bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide (Leis et coll., 1990 ; Schweer et coll., 1987) (figure 8).

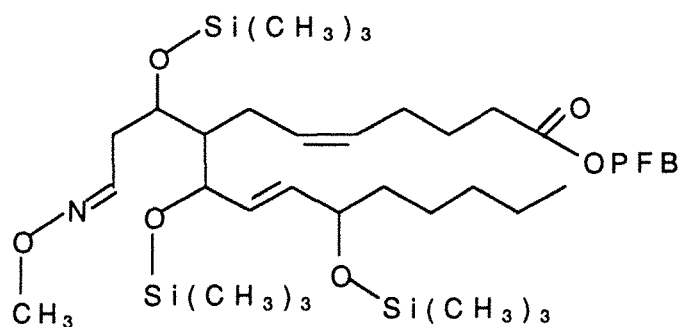


Figure 8 : Dérivation du Tromboxane B₂ pour une analyse par CG-SM

Dérivation effectuée par le chlorure de methoxyamine, le bromure de pentafluorobenzyl (PFB) et le N,N bis(trimethylsilyl) trifluoroacétamide.

Les dérivations sont habituellement effectuées dans l'ordre suivant : méthylation, estérification, silylation afin de minimiser les réactions secondaires.

De nouvelles étapes de purification sont requises afin d'éliminer l'excès des réactifs.

Il apparaît que cette technique présente des étapes longues et complexes par rapport à un immunodosage. Elle reste cependant intéressante du fait de sa spécificité liée à la séparation chromatographique, les anticorps présentant de forts taux de réactions croisées avec les molécules apparentées.

Les méthodes de détection utilisées permettent des limites de détection bien inférieures aux techniques immunologiques. La CPG couplée à la spectrométrie de masse est toujours utilisée lorsque l'analyte se trouve à des concentrations inférieures au pg/ml (dosage plasmatique du 11-déhydro TxB₂) (Catella et Fitzgerald, 1990).

C'est également par cette technique qu'ont pu être identifiés et quantifiés les vingt métabolites urinaires du TxB₂ (Roberts et coll., 1977) ainsi que le 11-déhydro TxB₃ issus de l'acide éicosapentaénoïque (Ishibashi et coll., 1990).

1.6.3.2. Chromatographie liquide haute performance (CLHP)

La CLHP en phase normale ou inverse est une autre méthode chromatographique utilisée par de nombreux auteurs dans l'analyse des éicosanoïdes. Les méthodes habituelles de détection reposent sur l'absorbance des molécules.

Alors que les leucotriènes présentent une absorbance importante en UV à 280 nm (absorbance molaire $\epsilon = 40000 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$), le TxB_2 et ses métabolites n'ont pas de bandes d'absorption spécifiques. Une détection est malgré tout possible à des longueurs d'onde inférieures à 210 nm avec une très faible limite de détection (30 ng injectés à 193 nm), et l'impossibilité de dosage dans des milieux biologiques.

Cette limite peut largement être améliorée grâce à la dérivation du TxB_2 par des marqueurs possédant une absorbance élevée, des marqueurs fluorescents, ou, plus rarement, par des molécules ayant des propriétés électrochimiques.

La dérivation permet également de s'affranchir de l'absorbance ou de la fluorescence des molécules biologiques endogènes.

D'autres types de détection peuvent être utilisés : la spectrométrie de masse (Voyksner et coll., 1987 ; Gelpi et Abian, 1990 ; Yamane et Abe, 1991) ou un détecteur de radioactivité dans l'étude du métabolisme *in vivo* de certains éicosanoïdes marqués par un isotope radioactif (Powell, 1987).

La dérivation du TxB_2 se fait sur ses fonctions hydroxyles (OH) ou carboxyle (COOH). Elle peut être de deux types : estérification du COOH ou des OH, ou amidification du COOH.

La majorité des dérivations étudiées dans la littérature porte sur l'estérification. La dérivation par amidification est peu employée en CLHP du fait de la durée de la dérivation (de 12 à 24 heures) et des rendements de dérivation fortement diminués pour les faibles concentrations (< à quelques dizaines de mg), voire même impossible à réaliser.

L'analyse dans les milieux biologiques requiert en général une étape d'extraction.

* Dérivation par des molécules fluorescentes

Les principales molécules fluorescentes employées pour la dérivation des éicosanoïdes sont rassemblées dans le tableau IV. Leur rendement quantique, les conditions de dérivation ainsi que les limites de quantification (en quantité injectée) y sont rapportés.

Les principaux fluorophores employés dérivent :

- de l'anthracène (9-anthryl diazométhane, bromure de panacyle)
- du pyrène (1-pyrényl diazométhane)
- de la coumarine (4-bromométhyl 7-méthoxy coumarine, 4-luminarine).

Certaines de ces molécules ont été étudiées lors de travaux antérieurs relatifs à la préparation de dérivés fluorescents du TxB₂ pour l'analyse par CLHP (Ben Gueddour et coll., 1993).

Les conditions d'émission de fluorescence peuvent être limitées par la méthode chromatographique employée selon la polarité des solvants et le pH des tampons. Ces paramètres sont importants afin d'optimiser les limites de quantification.

Récemment Tod et coll. (1991) ont développé de nouvelles molécules fluorescentes à partir de la coumarine : les luminarines. Elles permettent de dériver différentes fonctions chimiques. En particulier, la 4-luminarine a été étudiée dans l'amidification de prostaglandines. Cette molécule présente l'intérêt d'avoir un rendement quantique supérieur à celui des autres traceurs classiquement utilisés pour la dérivation des carboxyles et de n'être sensible ni au solvant ni au pH.

* Autres traceurs utilisés en CLHP

La détection des éicosanoïdes analysés par CLHP a été faite par absorption UV (détection des molécules fluorescentes ou de chromophores), en électrochimie ou en chimiluminescence après dérivation. Le couplage CLHP-SM a également été envisagé mais n'est pas employé en dosage de routine étant donné le coût et la technicité de l'appareillage.

Le tableau V regroupe les principales molécules utilisées dans le marquage des éicosanoïdes.

TABLEAU IV
MARQUEURS FLUORESCENTS UTILISES EN CLHP DANS LA DERIVATION DU THROMBOXANE B₂

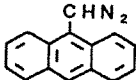
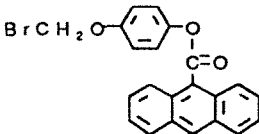
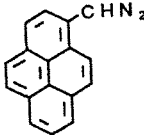
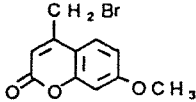
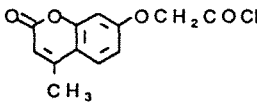
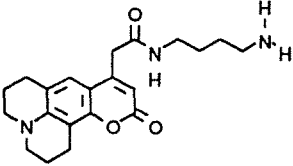
Marqueur fluorescent	Φ	Conditions de dérivation	Fonction chimique dérivée	Détection : λ _{exc} - λ _{ém} (nm)	Limite de détection (nature des éicosanoïdes dérivés)	Références
9-anthryl diazométhane 	-	pas de catalyseur 6 h à 37 °C	estérification du COOH	365 - 412	100 pg (PG et TxB ₂)	Wessel et coll., 1988 Hatsumi et coll., 1982 Yamauchi et coll., 1986I Tohyama et coll., 1988
bromure de panacyle 	0,20*	triéthylamine 2 h à 40 °C	estérification du COOH	280/365/380 - 440/450	1 pg (TxB ₂) 2 pg (PG)	Cordis et Das, 1991 Salari et coll., 1987 Engels et coll., 1988
1-pyrényl diazométhane 	-	pas de catalyseur 90 min à 25 °C	estérification du COOH	340 - 395	10 pg (PG)	Nimura et coll., 1988

TABLEAU IV (suite)

4-bromométhyl 7-méthoxy coumarine 	0,31*					
		K ₂ CO ₃ , éther couronne 10 min à 67 °C	estérification du COOH	325/360 - 385	80 pg (TxB ₂)	Turk et coll., 1978
4-bromométhyl 7-acétoxy coumarine	-	K ₂ CO ₃ + Na ₂ SO ₄ 30 min à 50 °C	estérification du COOH	365 - 460 ajout de soude en post-colonne	4 pg (PG)	Kelly et coll., 1987
chlorocarbonyl 7-méthoxy 4-méthyl coumarine 	0,43*					
		diméthylamino-4 pyridine 35 min à 60 °C	estérification des OH	320 - 380	37 pg (TxB ₂)	Ben Gueddour et coll., 1993
4-luminarine	0,5**					
		carbodiimide 24 h à 20 °C puis 1 h à 70 °C	amidification du COOH	390 - 490	100 pg (PG)	Tod et coll., 1991

* : en tampon phosphate 0,06 M à pH 7,4 ; ** : quel que soit le solvant ; Φ : rendement quantique ; PG : prostaglandines

Les détections UV et électrochimique restent des méthodes marginales du fait de leur manque de sensibilité (de l'ordre de la pmole par injection).

La 4-luminarine a été utilisée avec une détection par chimiluminescence. Après ajout d'H₂O₂ et de bis(2,4,6-trichlorophényl) oxalate en sortie de colonne, la limite de détection est de 10 pg.

Après cette revue, il apparaît que la CLHP couplée avec une détection fluorimétrique permet d'atteindre des limites de quantification ou de détection intéressantes. Cependant le problème majeur réside en l'étape de dérivation qui ne peut se faire que sur des quantités importantes. Les limites de détection représentent des quantités injectées et non des quantités dérivées.

Des étapes de purification et de concentration de l'échantillon sont utilisées afin de s'affranchir en partie de ce problème. Cette technique reste intéressante pour des études pharmacologiques *in vitro*, les concentrations d'écossanoïdes étant alors importantes (> à 300 pg/ml).

TABLEAU V
MARQUEURS NON FLUORESCENTS UTILISES DANS L'ANALYSE DU
THROMBOXANE B₂ PAR CLHP

Marqueur	Conditions de dérivation	Mode de détection	Limite de détection (nature des éicosanoïdes dérivés)	Références
bromoacétonaphtalène	N-N diisopropyl-éthylamine 1 h à 45 °C	UV à 254 nm	0,3 ng (PG)	Zoutendam et coll., 1984
bromure de panacyle + méthoxymation	-	UV à 254 nm	-	Pullen et coll., 1987
chlorure de 2,4-diméthoxy aniline	carbodiimide 1 h à 37 °C	électrochimie +1,10 V Ag/AgCl	40 pg (TxB ₂)	Knospe et coll., 1988
p-aminophénol	iodure de 2-bromo-1-méthyl pyridinium	électrochimie +0,75 V Ag/AgCl	0,1 ng (PG)	Ikenoya et coll., 1980
2,4-dinitro phénylhydrazine	-	électrochimie -0,90 V Ag/AgCl	0,120 ng (PG)	Beck et coll., 1989
4-luminarine	carbodiimide+ hydroxysuccinimide 24 h à 20 °C puis 1 h à 70 °C	chimiluminescence	10 pg (PG)	Tod et coll., 1991
(2-chloro éthyl) diéthylamine + diéthylisopropylamine	1 h à 75 °C	spectrométrie de masse	30 ppb à 3 ppm (PG + TxB ₂)	Voyksner et coll., 1987

PG : prostaglandines

II. Intérêt de la fluorescence dans les immunodosages : cas particulier de la polarisation de fluorescence

II.1. Rappel du principe de fluorescence

Au cours d'un processus d'excitation lumineuse, une molécule peut absorber un quantum d'énergie dont la valeur est donnée, en fonction de la fréquence du rayonnement provoquant la transition, par la relation :

$$E = h \nu = \frac{h c}{\lambda}$$

où h est la constante de Planck, ν la fréquence, λ la longueur d'onde et c la vitesse de la lumière.

Par excitation, la molécule parvient à l'un des états excités singulets (S_n) dans lesquels l'un des électrons se trouve dans un état énergétique supérieur à celui qu'il occupe à l'état fondamental (S_0). L'état singulet correspond au fait que tous les électrons de la molécule ont leur spin apparié.

A partir de l'état S_n , la molécule peut être dés excitée par plusieurs processus principaux (figure 9) :

- elle peut restituer l'énergie sous forme de chaleur et revenir à l'état S_0 (désactivation thermique)
- elle peut subir une interconversion non radiative en premier état excité triplet T_1 (nécessite un retournement de spin), le retour à l'état S_0 donne la phosphorescence
- elle peut restituer l'énergie par émission d'un photon, ce qui correspond au phénomène de fluorescence
- elle peut transmettre son énergie à une autre molécule
- elle peut subir une réaction photochimique.

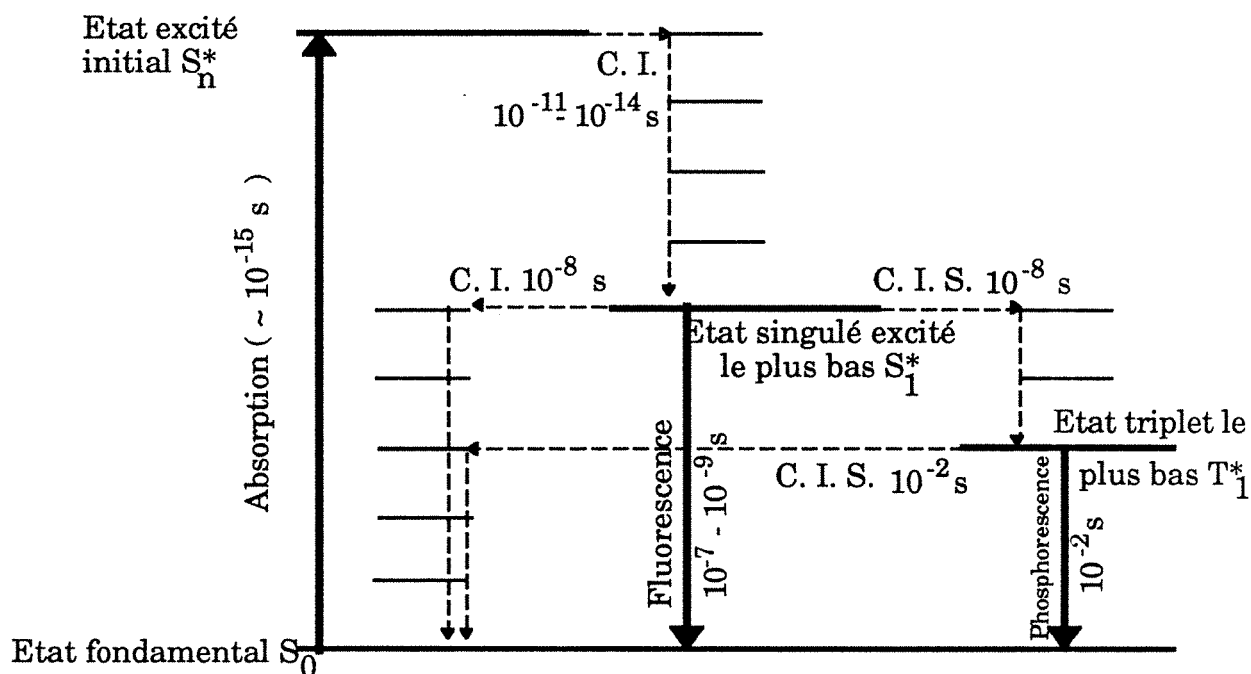


Figure 9 : Schéma des transitions électroniques d'une molécule organique
(Jablonsky, 1961)

C.I. : *Conversion Interne*

C.I.S. : *Conversion Inter-Système*



: *transitions radiatives*



: *transitions non radiatives*

Les molécules présentant des propriétés de fluorescence possèdent en général un système d'électrons π délocalisables, conférant à la molécule une configuration plane.

Ces molécules sont caractérisées par :

- une absorbance molaire (ϵ) liée à la probabilité de transition électronique. Les transitions présentant une forte probabilité auront une absorbance molaire élevée ($\epsilon = 10^4$ à $10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) alors que celles qui sont peu probables se traduiront par une faible absorbance molaire
- un rendement quantique de fluorescence (Φ) qui correspond au rapport entre le nombre de photons émis et absorbés

- une durée de vie de fluorescence (τ) qui reflète la durée moyenne de l'état singulet excité
- un effet Stokes correspondant à la différence entre la longueur d'onde d'émission et d'excitation ($\lambda_{\text{ém}} > \lambda_{\text{exc}}$ à cause de la perte d'énergie à l'émission).

II.2. Les immunodosages par polarisation de fluorescence

II.2.1. Introduction

Après la description des principes fondamentaux de la polarisation de fluorescence établis par Perrin (Perrin, 1926), cette technique a été appliquée aux systèmes biologiques par Weber (Weber, 1953 ; Weber et Teale, 1957), puis à la réaction antigène - anticorps par Dandliker à partir de 1961 (Dandliker et Feigen, 1961 ; Dandliker et coll., 1964).

Le principe et l'application de la polarisation de fluorescence ainsi que les immunodosages développés par cette technique ont fait l'objet de nombreux travaux (Chen et Bowman, 1965 ; Tengerdy, 1967 ; Jolley, 1981 ; Haidukewych, 1986 ; Gutierrez et coll., 1989 ; Urios et Cittanova, 1990). Il ne sera fait ici qu'un bref rappel du principe.

II.2.2. La polarisation de fluorescence

La lumière est constituée d'ondes électromagnétiques correspondant à l'association d'un vecteur champ électrique et d'un vecteur électromagnétique. Un ensemble de molécules fluorescentes identiques orientées de la même façon est excité par une onde polarisée verticalement. La fluorescence est observée dans une direction perpendiculaire aux vecteurs champ électrique et champ magnétique (figure 10). La probabilité maximale d'excitation de ces molécules dépend de leur orientation par rapport à la verticale. Il y a intensité maximale d'absorption lorsque les moments de transition d'absorption et la moments de transition d'émission sont parallèles.

Ce phénomène est identique pour la probabilité d'émission de fluorescence.

Pendant leur durée de vie, les molécules excitées peuvent ou non se réorienter. Selon la nature de la substance et selon la cohésion du milieu, il y aura une émission plus ou moins anisotrope définie par :

- le degré de polarisation p mesuré par l'intensité de lumière polarisée verticalement (ou $I_{//}$) et horizontalement (ou $I_{\perp}$) à la direction du vecteur champ électrique de l'onde d'excitation

$$p = \frac{I_{//} - I_{\perp}}{I_{//} + I_{\perp}}$$

- l'anisotropie r

$$r = \frac{I_{//} - I_{\perp}}{I_{//} + 2I_{\perp}} \text{ avec } p = \frac{3r}{2+r}$$

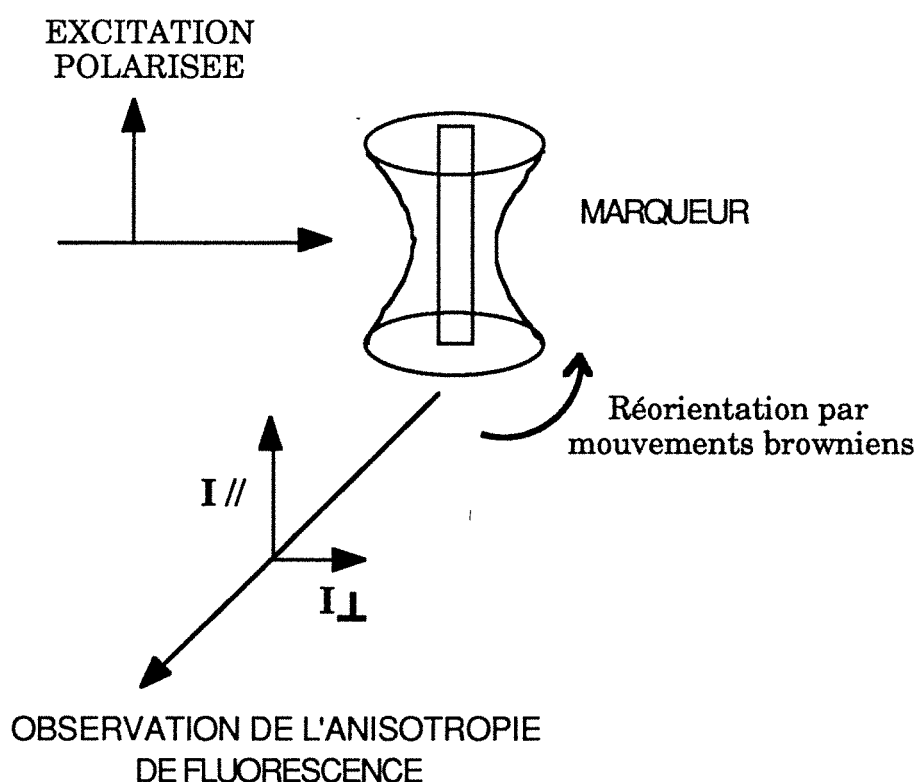


Figure 10 : Représentation schématique du processus de polarisation ou d'anisotropie de la fluorescence émise

Le degré de polarisation et l'anisotropie varient en fonction de la durée de vie de fluorescence des molécules τ et du temps de relaxation rotationnelle ρ correspondant au temps que met la molécule pour tourner sur elle-même d'un angle θ avec $\cos \theta = \frac{1}{e}$ soit approximativement $68,5^\circ$.

L'équation de Perrin décrit les variations de l'anisotropie de fluorescence en fonction de ces paramètres τ et ρ pour une molécule sphérique excitée en continue par une lumière polarisée : $r = \frac{r_0}{1 + \frac{3\tau}{\rho}}$

r_0 correspond à l'anisotropie limite en l'absence de mouvements browniens. Pour une durée de vie constante, l'anisotropie sera dépendante de ρ qui est fonction de la taille de la molécule (volume moléculaire, V), de la température (T) et de la viscosité (η) du milieu : $\rho = \frac{3 \eta V}{R T}$, R étant la constante des gaz parfaits.

L'expression de l'anisotropie devient alors : $\frac{r_0}{r} = 1 + \frac{R T \tau}{\eta V}$

et p s'exprime également par : $\frac{1}{p} = \frac{1}{p_0} + \left(\frac{1}{p_0} - \frac{1}{3} \right) \frac{R T \tau}{\eta V}$ (1)

p_0 = polarisation limite de fluorescence.

Pour un ensemble de molécules orientées au hasard et ayant leur vecteur de moment de transition d'absorption et d'émission parallèles, la valeur maximale de polarisation est de 0,5 si aucun réarrangement brownien n'intervient. Ainsi la valeur de la polarisation de fluorescence des molécules subissant des mouvements browniens rotationnels (cas le plus courant) est comprise entre 0 et 0,5 (soit une anisotropie comprise entre 0 et 0,4).

En mesurant expérimentalement la variation de $1/p$ ou $1/r$ en fonction de T/η , il est possible de déterminer le volume moléculaire hydrodynamique V . Cette situation précédemment décrite pour une population homogène de molécules sphériques, se rencontre rarement en pratique, les molécules seront mieux représentées par des ellipsoïdes dont l'excentricité représente l'asymétrie de la molécule.

II.2.3. Principe d'un immunodosage par polarisation de fluorescence (FPIA)

La possibilité de réaliser un immunodosage repose directement sur l'équation (1) précédemment décrite : le degré d'anisotropie ou de polarisation est lié aux mouvements de rotation de la molécule fluorescente présents entre le temps de l'excitation et de l'émission.

Une molécule avec un faible volume moléculaire, excitée par une lumière polarisée aura un temps de relaxation rotationnel bien inférieur à la durée de vie de fluorescence. L'anisotropie de fluorescence en résultant sera très faible, proche de 0.

Une molécule avec un grand volume moléculaire aura un temps de relaxation rotationnel comparable à la durée de vie, augmentant l'anisotropie de fluorescence.

Un dosage immunologique par polarisation de fluorescence est basé sur la différence de volume moléculaire d'un haptène marqué par une molécule fluorescente (le traceur) libre en solution et lorsqu'il est lié à un anticorps de volume moléculaire important.

La figure 11 représente le schéma réactionnel entre un Ac, un Ag libre et le traceur. La formation du complexe traceur-Ac diminue les mouvements browniens, augmente le volume moléculaire et ainsi la valeur d'anisotropie de fluorescence. Un immunodosage par polarisation de fluorescence s'effectue par une réaction de compétition pour les sites Ac entre la molécule que l'on cherche à doser et le traceur fluorescent correspondant.

L'établissement d'une courbe d'étalonnage permet une estimation quantitative de l'analyte à doser.

Cette technique est dans la plupart des cas simple de mise en oeuvre, rapide et précise. Elle combine la rapidité et les avantages d'une méthode homogène. Elle ne nécessite pas de séparation du complexe Ag-Ac et de l'Ag libre avant la mesure puisque le signal est directement proportionnel au taux de traceur lié à l'anticorps. La spécificité de la technique est due aux anticorps.

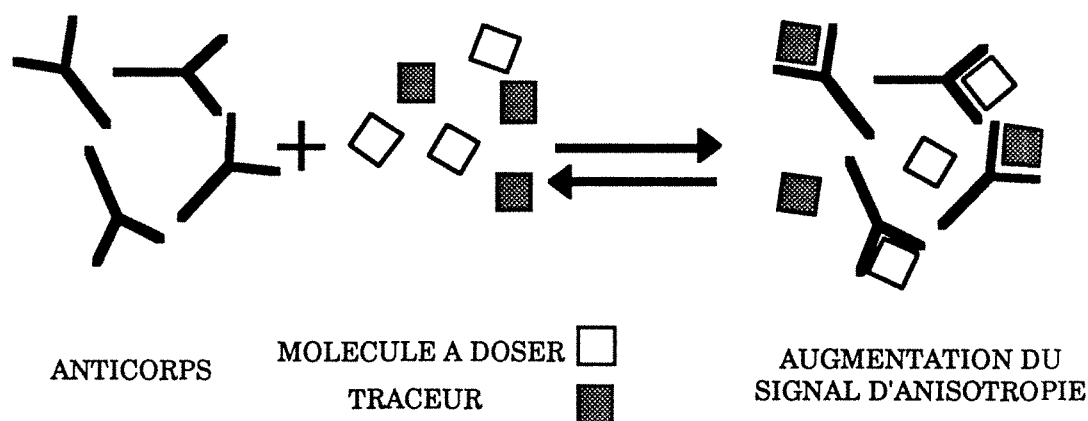


Figure 11 : Principe d'un immunodosage par polarisation de fluorescence

Ainsi, les problèmes associés à l'utilisation de la chromatographie ou des méthodes enzymatiques ou isotopiques peuvent être éliminés.

Cette technique présente un intérêt certain pour le dosage d'Ag de faible masse moléculaire ($< 2.10^4$) tels que les haptènes car la modification des mouvements browniens d'un Ag de haute masse moléculaire se liant à un Ac est bien plus faible que celle observée pour les petites molécules.

II.2.4. Domaines d'application des immunodosages par polarisation de fluorescence

De nombreux dosages ont été développés ces dernières années avec une forte implication dans le milieu biologique, la société Abbott ayant commercialisé diverses applications sur des appareils à informatique fermée (TDX, IMX) ce qui a contribué à la rapide expansion de cette technique.

Les domaines concernés par ces dosages touchent les médicaments, les stupéfiants, les hormones et certaines enzymes. Cependant les médicaments restent la classe prédominante, leur faible masse moléculaire ainsi que le domaine de concentration circulante étant en faveur de l'application de cette technique.

II.2.4.1. Médicaments

Le suivi de traitements à faible marge thérapeutique est devenu un domaine où les dosages par polarisation de fluorescence ont été rapidement appliqués. Les classes thérapeutiques concernées sont :

- les médicaments anticonvulsivants (phénobarbital, phénytoïne, valproate de sodium)
- les antibiotiques (aminoglycosides, glycopeptides)
- les glycosides cardiaques (digoxine, digitoxine)
- les médicaments anti-arythmiques (lidocaïne, procaïnamide, quinidine, disopyramide)
- les anti-asthmatiques (théophylline), les analgésiques (aspirine, paracétamol), les antinéoplasiques (méthotrexate), les immunosupresseurs (ciclosporine), les antidépresseurs tricycliques (imipramine, nortriptyline).

II.2.4.2. Stupéfiants

La méthode de détermination diffère de celle des autres médicaments car le fluide biologique concerné est plutôt l'urine que le sang, l'approche étant qualitative plutôt que quantitative. Le spectre de détermination est également plus large que pour les médicaments.

Les molécules concernées regroupent les barbituriques, la cocaïne ou son métabolite (benzoylecgonine), les amphétamines, l'acide lysergique diéthylamide (LSD), les benzodiazépines et les opiacés.

II.2.4.3. Hormones

Les dosages par polarisation de fluorescence ont été développés pour la détermination de la thyroxine (T4) sérique, de l'hydrocortisone sérique et salivaire ainsi que des stéroïdes et de l'insuline.

II.2.4.4. Autres domaines d'application

Un dosage de l'amylase dans le sérum ou les urines a été développé. Cette enzyme catalyse l'hydrolyse d'un substrat : l'amylose marqué par la fluorescéine.

Il en résulte une diminution de la valeur de polarisation du fait de l'augmentation de la rotation du fragment d'amylose restant. Ce principe d'application de la polarisation de fluorescence concerne peu de molécules.

Des dosages ont également été proposés pour différentes molécules :

- la bioptérine et la néoptérine (coenzyme de la 3-amino-acide hydroxylase) (Sawada et coll., 1985)
- la cotinine (métabolite de la nicotine) (Hansel et coll., 1986)
- le paraquat (herbicide) (Colbert et coll., 1988).

Le tableau VI regroupe les différentes caractéristiques des principaux dosages par polarisation de fluorescence développés ou commercialisés.

Malgré l'importance de l'application de la polarisation de fluorescence aux immunodosages en suivi thérapeutique ou dans les analyses cliniques, il apparaît que cette technique pourrait être étendue à d'autres domaines tels que l'environnement et l'analyse alimentaire grâce à la spécificité de discrimination entre l'antigène libre et marqué sans étape de séparation de ces formes.

TABLEAU VI
IMMUNODOSAGES DEVELOPPES PAR POLARISATION DE FLUORESCENCE

Molécule (Mr)	Marqueur (λ_{exc}/$\lambda_{\text{ém}}$)	Appareil de mesure	Concentration du marqueur	Durée d'incubation / température	Domaine de dosage (mg/L)	Référence
Acide valproïque (144)	fluorescéine 485/525	TDX kit ABBOTT	-	-	0,7 - 150	Haidukewych, 1985
Acide vanillylmandélique (198)	fluorescéine -	adaptation du TDX	1.10^{-7} M	-	0,3 - 200	Mellor et Gallacher, 1990
Astromicine (405)	fluorescéine 485/525	TDX kit ABBOTT	-	-	0,625 - 50	Uematsu et coll., 1988
Cortisol (362)	fluorescéine -	SLM4000 (Aminco)	$2,7.10^{-9}$ M	30 min / 25 °C	0,007 - 0,4	Pourfarzaneh et coll., 1980 Al Ansari et coll., 1983
Cotinine (220)	fluorescéine -	LS2B (Perkin Elmer)	1.10^{-8} M	30 min / 25 °C	0,1 - 8	Hansel et coll., 1986
Ciclosporine (1200)	fluorescéine -	TDX kit ABBOTT	-	-	0,01 - 1	Pesce et coll., 1990

TABLEAU VI (suite)

Kanamycine (484)	acide 2-naphtol 6-sulfonique 330/437	MPF2A (Perkin Elmer)	5.10^{-6} M	20 min / 30 °C	5 - 30	O'Neal et Schulman, 1984
LSD (268)	fluorescéine 470-520	(Perkin Elmer)	7.10^{-12} M	15 min / 25 °C	0,005 - 0,040	Hubbard et coll., 1983
modèle 2000						
Méthamphétamine (150)	fluorescéine -	LS 20 (Perkin Elmer)	1.10^{-8} M	30 min / 25 °C	0,3 - 20	Eremin et coll., 1988
Morphine (285)	fluorescéine -	LS2 (Perkin Elmer)	1.10^{-8} M	60 min / 25 °C	0,35 - 46	Colbert et coll., 1988
Pentobarbital (226)	fluorescéine 485/525	TDX kit ABBOTT	-	-	2,5 - 50	Earl et coll., 1991
Phénytoïne (252)	acide 2-naphtol 8-sulfonique 337/480	MPF2A (Perkin Elmer)	$7,5.10^{-7}$ M	20 min / 30 °C	5 - 20	O'Neal et Schulman, 1984
Théophylline (180)	ombelliférone 400/450	SLM8000 (Aminco)	$1,3.10^{-8}$ M	5 min / -	10 - 40	Li et coll., 1981

II.3. Facteurs influençant un immunodosage par polarisation de fluorescence

II.3.1. Influence de la réaction antigène-anticorps (Ag-Ac)

L'intérêt d'un immunodosage par polarisation de fluorescence réside principalement dans le fait qu'il peut être réalisé sans étape de séparation des formes liées à l'Ac et des formes libres.

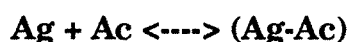
Cependant différentes conditions doivent être réunies :

- la fixation de l'haptène fluorescent à l'Ac doit entraîner une diminution des mouvements browniens rotationnels du marqueur afin d'observer une augmentation du signal d'anisotropie de fluorescence
- pour qu'il y ait une réaction de compétition entre l'analyte à doser et l'analyte marqué, le couplage de la molécule fluorescente ne doit pas modifier de façon trop importante la constante d'affinité de l'Ac ($K_a = \frac{(Ag-Ac)}{(Ag)(Ac)}$)
- il ne doit pas être observé d'encombrement stérique lié au marquage gênant la reconnaissance des sites antigéniques
- le marquage ne doit pas modifier la structure chimique des sites antigéniques entraînant une incapacité de reconnaissance de l'anticorps.

Les modèles mathématiques développés par Ekins (1974) dans le cadre d'immunodosages de type compétitif en RIA ont montré qu'un rapport des constantes d'affinité pour l'analyte marqué (K_a^*) et pour l'analyte "froid" (K_a) qui diffère de 1 entraîne une forte modification de la concentration minimale détectable : pour $\frac{K_a^*}{K_a} = 10^{-2}$ ou 10^2 la concentration minimale détectable varie de 2,8 à 20 ng/ml pour le dosage de l'insuline.

Les modèles mathématiques concernant les immunodosages envisagés par Berson et Yallow (1968) puis par Ekins (1974) ont été adaptés à la polarisation de fluorescence par Dandliker (Dandliker et coll., 1973) à la seule différence qu'il fait apparaître dans les équations la concentration du traceur et de l'Ag ou de l'haptène non marqué.

L'approche générale pour interpréter les résultats obtenus par polarisation de fluorescence est basée sur le même principe que les autres types de dosages immunologiques :



L'antigène est présent sous sa forme fluorescente F ou non fluorescente N . Les concentrations molaires F_b du conjugué fluorescent sous sa forme liée (b) ou F_f sous sa forme libre (f) est reliée à la polarisation p par l'équation :

$$\frac{F_b}{F_f} = \frac{Q_f}{Q_b} \times \frac{p-p_f}{p_b-p} \quad (2)$$

où Q est la fluorescence molaire (intensité de fluorescence divisée par la concentration en marqueur)

Q et p doivent être déterminés pour la forme libre (Q_f et p_f) et pour la forme totalement liée (Q_b et p_b) du traceur ce qui permet à Q_f , Q_b , p_f , p_b d'apparaître comme des constantes dans l'équation (2). Le rapport $\frac{F_b}{F_f}$ étant déterminé, il est possible d'extraire la valeur de F_b en l'absence d'antigène froid sachant que $F_t = F_b + F_f$. La représentation de Scatchard ($\frac{F_b}{F_f}$ en fonction de F_b) permet de calculer expérimentalement les paramètres de la réaction : la constante d'affinité de l'anticorps pour le marqueur ainsi que la concentration en sites anticorps.

Pour simplifier le modèle faisant intervenir la constante d'affinité des anticorps, Dandliker et de Saussure (1970) posent comme condition l'uniformité des sites anticorps. Ceci permet de définir une constante K_a correspondant à la moyenne des constantes d'affinité ainsi qu'un coefficient d'hétérogénéité a .

La loi d'action de masse peut être exprimée ainsi :

$$\lg F_f = \frac{1}{a_F} \times \lg \left[\frac{F_b}{F_{b\max} - F_b - N_b} \right] - \lg K_{aF} \quad (3)$$

et

$$\lg N_f = \frac{1}{a_N} \times \lg \left[\frac{N_b}{F_{b\max} - F_b - N_b} \right] - \lg K_{aN} \quad (4)$$

où $F_{b\max}$: concentration en sites de liaison sur le récepteur

F : symbole pour le marqueur

N : symbole pour l'analyte non marqué.

K_a : constante d'affinité

Les équations (2), (3), (4) permettent de déduire l'influence du marquage sur le comportement de l'équilibre de la réaction. La figure 12, reproduite de Dandliker et de Saussure (1970), montre la représentation théorique de la variation de la polarisation de fluorescence en fonction de la concentration totale en antigène, et ce pour des valeurs imposées des différentes constantes.

Cette figure montre que la sensibilité (elle sera maximale pour une pente maximale) est affectée par le marquage de l'antigène, la pente de la courbe diminuant quand K_a est diminué.

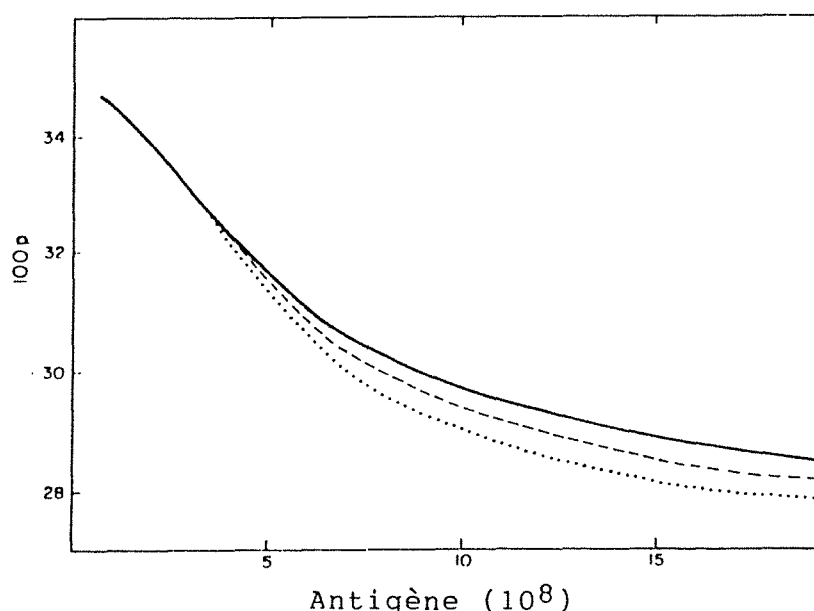


Figure 12 : Influence du marquage de l'antigène sur la courbe de compétition par polarisation de fluorescence (d'après Dandliker et De Saussure, 1970)

— : antigène marqué uniquement , $K_{aF} = 2.10^8 \text{ M}^{-1}$
 ----- : $K_{aF} = 2.10^8 \text{ M}^{-1}$, $K_{aN} = 4.10^8 \text{ M}^{-1}$
 : $K_{aF} = 2.10^8 \text{ M}^{-1}$, $K_{aN} = 8.10^8 \text{ M}^{-1}$

Plus récemment, a été développée par ces mêmes auteurs (Dandliker et coll., 1973) l'expression de la variation de la polarisation en fonction des paramètres du dosage, dans le but d'optimiser les concentrations des espèces présentes lors de la mise au point du dosage.

Cette équation spécifie la concentration en anticorps et en antigène marqué qui doivent être utilisées pour obtenir une sensibilité maximale. La concentration minimale en marqueur apparaît comme un facteur déterminant. Néanmoins ce facteur dépend sur le plan pratique de la méthode de détection et de l'instrumentation.

Ces recherches montrent que la sensibilité est altérée quand le marquage affecte la réactivité immunochimique (figure 13), cependant le cas extrême choisi met en jeu une constante d'affinité équivalente à 10 % de la constante d'affinité pour l'haptène froid.

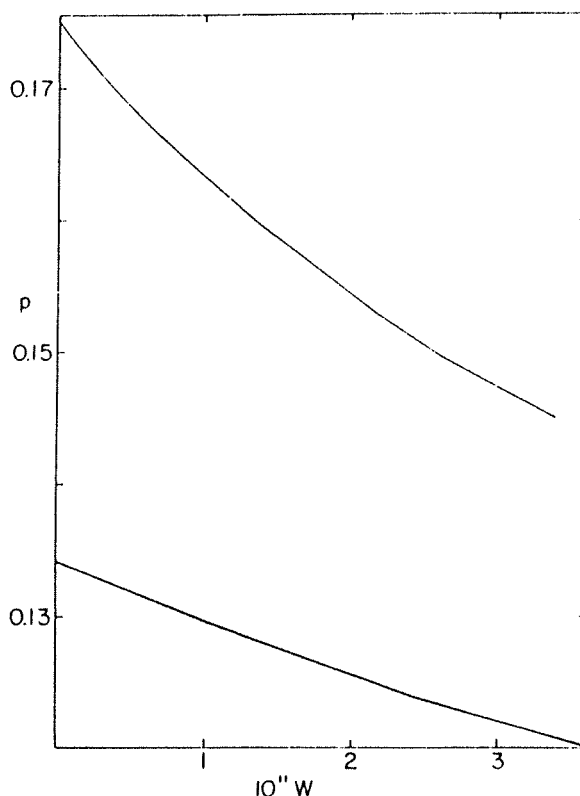


Figure 13 : Courbes théoriques d'immunodosages par polarisation de fluorescence (d'après Dandliker et coll., 1973)

Les conditions sont fixées pour que la meilleure sensibilité soit obtenue pour une concentration minimale en haptène à doser (W).

Les paramètres sont :

$K_{aN} = K_{aF} = 5.10^{10} \text{ M}^{-1}$ pour la courbe supérieure

$K_{aN} = 5.10^{10}$ et $K_{aF} = 5.10^9 \text{ M}^{-1}$ pour la courbe inférieure

Il apparaît que seule une maîtrise complète de tous les paramètres du dosage : quantité minimale de marqueur mesurable de façon reproductible, constante d'affinité conservée, variation du signal de polarisation la plus grande possible entre la forme liée et libre, permettra d'atteindre le domaine de concentration imposé pour le dosage de thromboxane B₂ dans notre étude.

II.3.2. Influence des facteurs physico-chimiques liés aux marqueurs fluorescents

II.3.2.1. Choix du marqueur fluorescent

Les marqueurs pouvant être utilisés en polarisation de fluorescence doivent présenter des caractéristiques physico-chimiques bien définies.

Afin d'obtenir un immunodosage ayant la plus petite limite de détection possible, le marqueur fluorescent doit avoir une absorbance molaire élevée (>30000) ainsi qu'un rendement quantique le plus proche possible de 1.

La durée de vie du phénomène de fluorescence doit être supérieure au temps de relaxation rotationnelle pour pouvoir observer une modification de l'anisotropie lors de l'augmentation du temps de relaxation rotationnelle. Cette durée de vie doit être supérieure à la nanoseconde.

Un effet Stokes le plus important possible permet une discrimination entre une fluorescence endogène du milieu et la fluorescence du marqueur.

La longueur d'onde d'excitation du marqueur doit s'éloigner du domaine des ultraviolets afin d'éviter la fluorescence endogène de certaines protéines plasmatiques.

Le problème majeur rencontré en FPIA pour le dosage des échantillons biologiques, et plus particulièrement sur le plasma est la sensibilité qui est limitée par la fluorescence de l'échantillon à analyser. L'émission de fluorescence naturelle d'un plasma se situe vers 520 nm, due en grande partie à la bilirubine ($\lambda_{\text{exc}} = 460 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{ém}} = 520 \text{ nm}$). De fortes concentrations en bilirubine augmentent considérablement le bruit de fond lors de l'utilisation de certains marqueurs.

Une attention toute particulière devra être portée pour les dosages utilisant la fluorescéine comme marqueur ($\lambda_{\text{exc}} = 495 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{ém}} = 520 \text{ nm}$), cette dernière étant cependant le fluorophore le plus utilisé dans les dosages par polarisation de fluorescence. Dans le cas où la concentration en analyte est élevée, une simple dilution du milieu permet de s'affranchir de ces interférences.

Un autre facteur important intervenant dans le choix du marqueur fluorescent est sa stabilité photochimique : la molécule ne doit pas subir de modifications spectrales durant l'analyse.

II.3.2.2. Marqueurs utilisés dans les immunodosages par polarisation de fluorescence

Malgré la multiplicité des marqueurs utilisés tant en fluorescence qu'en polarisation de fluorescence, peu ont réellement été employés dans les immunodosages par polarisation de fluorescence.

Les caractéristiques spectrales des marqueurs utilisés dans les immunodosages sont rassemblées dans le tableau VII. La molécule la plus couramment employée est la fluorescéine.

TABLEAU VII
CARACTERISTIQUES SPECTRALES DES PRINCIPAUX MARQUEURS
UTILISES DANS LES IMMUNODOSAGES PAR POLARISATION DE
FLUORESCENCE

Molécule	λ exc (nm)	λ ém (nm)	Effet Stokes	ϵ (M ⁻¹ .cm ⁻¹)	τ (ns)	ϕ	Absorbance modifiée par
Fluorescéine	495	520	25	7.10 ⁴	4,5	0,85	pH
Rhodamine	550	585	35	5.10 ⁴	3,0	0,70	-
Ombelliférone	380	450	70	2.10 ⁴	5,6	-	pH
Lucifer Yellow	430	520	90	1,2.10 ⁴	-	0,63	solvant
Acide 2-naphtol 6-sulfonique	330	437	107	2,9.10 ⁴	-	0,30	-
Acide 2-naphtol 8-sulfonique	337	480	143	5100	-	0,30	-

Seule la rhodamine (d'après Dandliker et coll., 1981) permet de s'affranchir des problèmes liés à la fluorescence des milieux biologiques tout en conservant des propriétés spectrales intéressantes.

Cependant cette molécule présente des difficultés d'emploi en milieu aqueux : elle a tendance à s'agréger, probablement à cause de liaisons hydrophobes.

La fluorescéine reste le marqueur le plus intéressant pour le développement d'un immunodosage par polarisation de fluorescence. Elle présente les meilleures caractéristiques spectrales requises pour la détermination de faibles concentrations en analyte telles que les écosanoïdes.

La nécessité de maîtriser parfaitement ce fluorophore tant au niveau de sa réponse spectrale que chimique a nécessité une étude bibliographique qui permet de comprendre la complexité de son comportement.

III. La fluorescéine

III.1. Intérêts et applications

La fluorescéine (figure 14) peut être considérée comme étant le premier marqueur utilisé couramment en hydrologie (Feuerstein et Selleck, 1963). Depuis, de nombreuses applications ont été envisagées en utilisant cette molécule du fait de ses caractéristiques spectrales :

- rendement quantique élevé
- longueur d'onde maximale d'absorption se situant dans le domaine du visible évitant les interférences liées à la fluorescence endogène de certaines biomolécules
- absorbance molaire élevée
- sensibilité au pH.

La fluorescéine est utilisée dans l'aide au diagnostic en médecine (Selan et coll., 1985) et principalement en ophtalmologie (Joondeph et Tessler, 1991). En cytologie, elle peut être utilisée sous sa forme non modifiée en tant que marqueur de cellules (Babcock et Kramp, 1983). Sous la forme d'esters, elle est hydrolysée en fluorescéine libre par les enzymes intracellulaires (Thomas et coll., 1979) ou par photoactivation (Krafft et coll., 1988).

La fluorescéine en tant qu'haptène est employée dans l'étude des systèmes cellulaires ou des protéines solubles (Voss, 1984 ; Koller, 1991 ; Irth et coll., 1993).

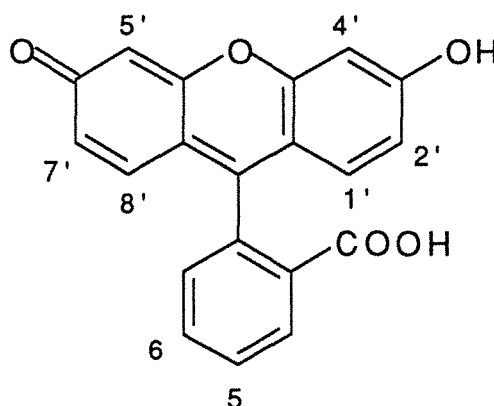


Figure 14 : Structure chimique de la fluorescéine

Les domaines d'application de la fluorescéine concernent tant la photophysique (Ullman et Khanna, 1981) que la biochimie (Waldron et coll., 1990).

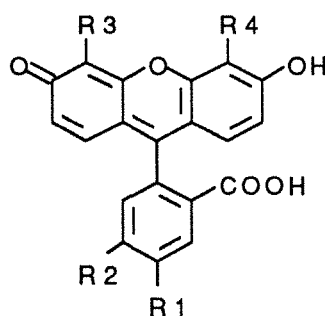
Cependant la plupart des recherches nécessitent une modification de la structure de la fluorescéine à des fins de fonctionnalisation : il est alors nécessaire de lui greffer un groupement réactif pouvant servir dans les réactions de couplage à des analytes variés.

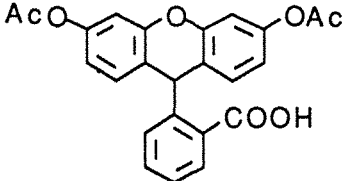
Le marqueur le plus courant est l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC, isomère I ou II) utilisé dans le marquage des fonctions amines primaires, que ce soit en polarisation de fluorescence (Hemmilä, 1985), en chromatographie (Van den Beld et coll., 1988) ou dans l'étude des protéines (Koller, 1991).

Les autres marqueurs issus de la fluorescéine sont décrits dans le tableau VIII. Les fluorescéines pouvant être impliquées dans le marquage de la fonction carboxylique seront exposées ultérieurement.

TABLEAU VIII
MARQUEURS DERIVANT DE LA FLUORESCÉINE COURAMMENT
UTILISES DANS LES APPLICATIONS BIOLOGIQUES

Fluorescéine :



Groupement chimique	Nom	Applications	Références
R_1 ou R_2 : $-N=C=S$	FITC isothiocyanate de fluorescéine	marquage de la fonction amine	Koller, 1991 Coons et coll., 1942
R_1 :	DTAF dichlorotriazinyl- aminofluorescéine	alternative à l'utilisation de FITC	Blakeslee et Baines, 1976
R_3 ou R_4 : $CH_3COOHg-$	FMA acétate mercurique de fluorescéine	quantification des groupements SH et des ponts disulfures	Shipchandler et coll., 1986
R_1 : $-NHCOCH_2I$	IAF iodoacétamido- fluorescéine	marquage des SH	Gorman, 1987
R_1 ou R_2 : $-COOH$	carboxy- fluorescéine	étude de la stabilité des liposomes	Lu Steffes et coll., 1982
	esters diacétyl ou dibutyryl	action des estérases cellulaires	Kramer et Guilbaut, 1964 Bronner et Fraser, 1986
	diacétyldihydro- fluorescéine	estérification de la dihydroartémisine	Luo et Xie, 1987

III.2. Propriétés physico-chimiques et spectrales de la fluorescéine

III.2.1. Propriétés physico-chimiques

La fluorescéine, comme l'éosine, sont des molécules connues depuis longtemps pour leurs propriétés colorantes et, à ce titre, de nombreuses études concernant la structure de ces molécules sont anciennes.

Plusieurs structures ont été proposées par différents auteurs sans qu'une preuve décisive ait été apportée en faveur de l'une d'elle (Orndorff et Hemmer, 1927 ; Davies et Jones, 1954 ; Zanker et Peter, 1958 ; Lindqvist, 1960 ; Sklyar et Mikhailov, 1966 ; Martin et Lindqvist, 1975). Or la connaissance de cette structure est fondamentale pour l'interprétation de certaines propriétés physiques, telles que le spectre d'absorption dans le visible ou le spectre de fluorescence et la réactivité chimique en analyse (formation de complexes moléculaires par exemple).

De récents travaux ont cependant permis d'élucider certains problèmes analytiques liés aux conditions expérimentales des précédentes études (Diehl et Markuszewski, 1985).

Ils ont permis d'aboutir à l'isolement de trois formes solides de la fluorescéine (figure 15) dont une n'est obtenue qu'en milieu non polaire :

- la structure lactone, forme incolore, isolée récemment à l'état solide après une étape de lyophilisation dans le dioxanne
- la structure zwitterion qui correspondrait à la forme jaune de la fluorescéine moléculaire
- la structure *p*-quinone associée à la forme rouge. Les spectres de masse de la fluorescéine rouge et jaune sont identiques, la forme jaune étant convertie en forme rouge par chauffage.

Ces trois formes ont été identifiées par diffraction des rayons X et les structures ont pu être attribuées principalement grâce à la spectrométrie infra-rouge (Markuszewski et Diehl, 1980).

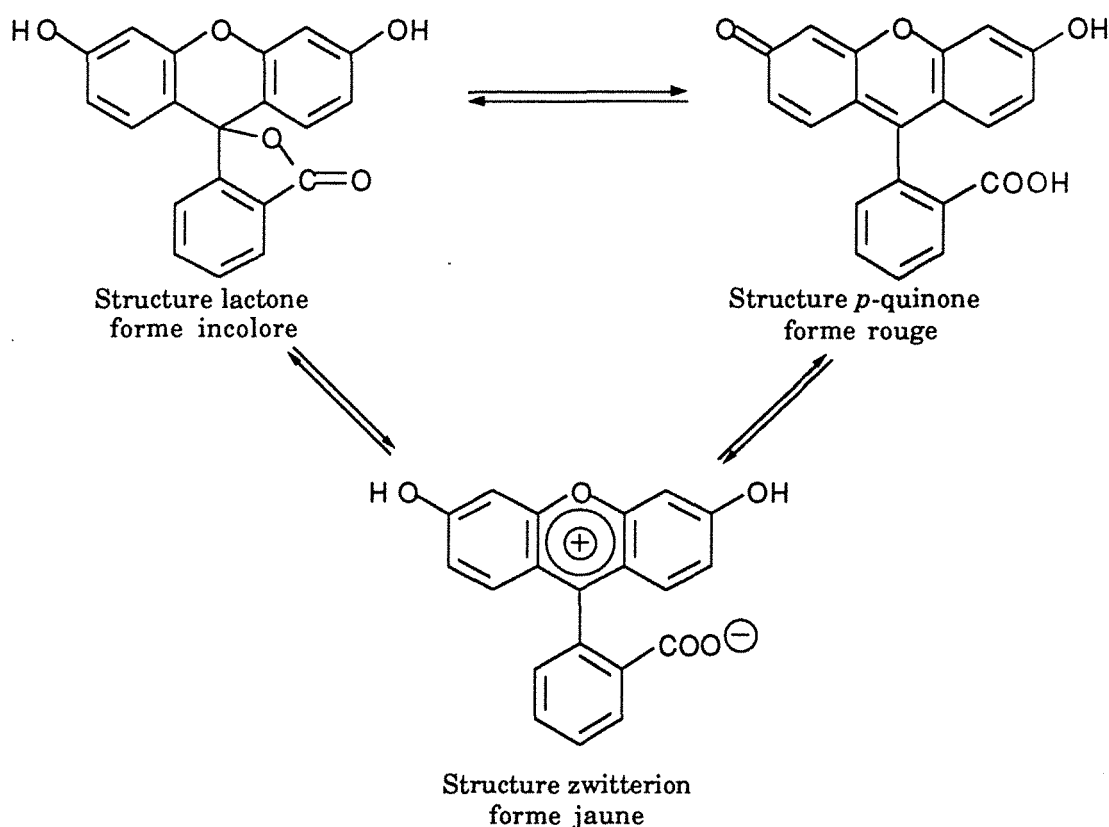


Figure 15 : Différentes structures proposées pour la fluorescéine
(d'après Diehl et Markuszewski, 1985)

III.2.1.1. Solubilité de la fluorescéine

En milieu aqueux, il n'a été mis en évidence qu'une forme unique de fluorescéine : la structure zwitterion avec une charge positive se distribuant sur le cycle comportant l'oxygène (Diehl et Markuszewski, 1985 ; Diehl et coll., 1986). Mais il n'en est pas de même dans d'autres solvants.

Pour les différents marqueurs issus de la fluorescéine, la solubilité est fonction des substituants qu'elle porte, ce qui nécessite souvent l'utilisation de solvants tels que le DMF ou le DMSO.

L'étude du comportement de la fluorescéine en solution aqueuse tamponnée a permis de montrer que sa structure était fonction du pH. Les structures correspondent aux formes FH_3^+ , FH_2 , FH^- , F^{2-} représentées sur la figure 16 (Diehl et Markuszewski, 1985 ; Diehl et coll., 1986).

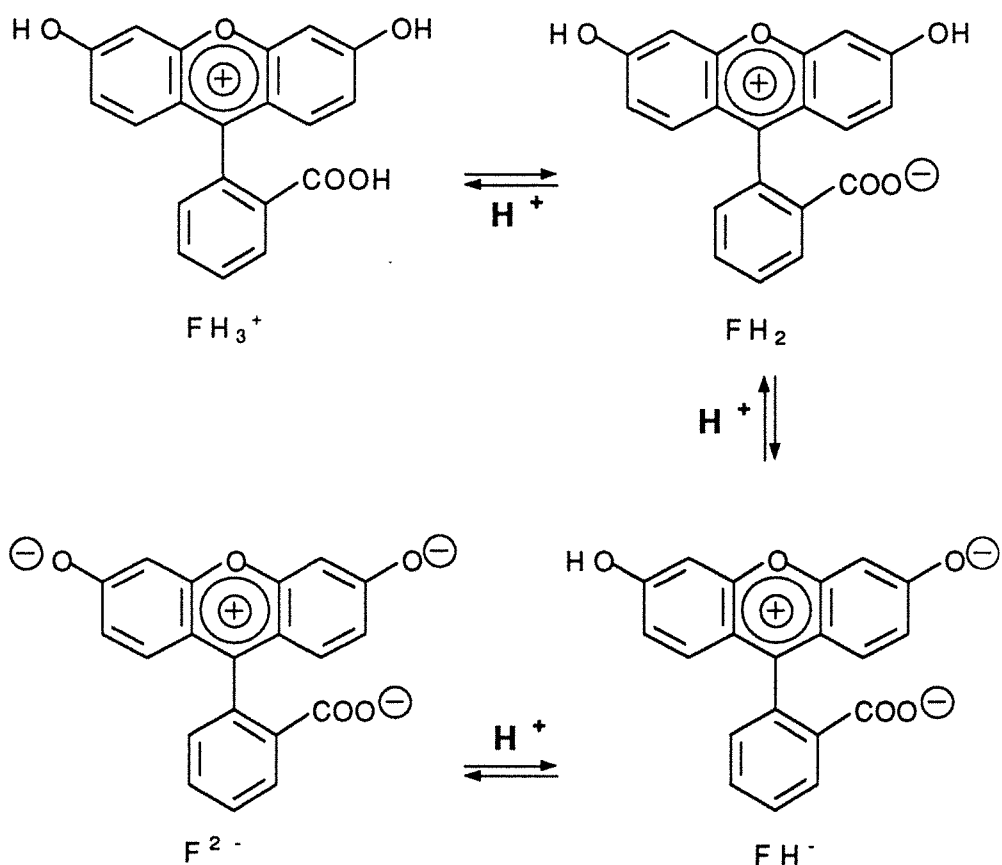


Figure 16 : Différentes étapes de la transformation acide-base de la fluorescéine

La fluorescéine est caractérisée par 3 constantes de dissociation acido-basiques. En désignant la forme non chargée de la fluorescéine par FH_2 , il est possible de définir les constantes d'acidité respectives correspondant aux équilibres suivant :



$$K_{a1} = \frac{(\text{H}^+)(\text{FH}_2)}{(\text{FH}_3^+)}$$



$$K_{a2} = \frac{(\text{H}^+)(\text{FH}^-)}{(\text{FH}_2)}$$



$$K_{a3} = \frac{(\text{H}^+)(\text{F}^{2-})}{(\text{FH}^-)}$$

La présence de ces différentes formes influe fortement sur les propriétés spectrales. Selon les auteurs les pKa des groupements ionisables de ces formes diffèrent en fonction des milieux utilisés :

	pKa FH ₃ ⁺	pKa FH ₂	pKa FH ⁻
Zanker et Peter, 1958 mélange H ₂ O/dioxanne	1,95	5,05	7,00
Martin et Lindqvist, 1975 H ₂ O, force ionique de 0,01	2,20	4,40	6,70
Vig, 1967 H ₂ O, force ionique de 1	2,25	5,10	7,10
Diehl et Horschak-Morris, 1987 H ₂ O, force ionique de 0,1	2,18	4,40	6,36

III.2.1.2. Stabilité de la fluorescéine en solution aqueuse

L'analyse de faibles quantités de fluorescéine ou de ses dérivés requiert des précautions supplémentaires pour éviter l'adsorption de la fluorescéine sur des surfaces en verre. La fluorescéine, ainsi que les composants qui ont une forte capacité de liaison hydrogène, s'adsorbent fortement sur la silice, il en résulte une diminution de la concentration dans l'échantillon ainsi que la possibilité d'effet mémoire durant un processus chromatographique (Van Den Beld et coll., 1988).

La résistance à la photolyse de la fluorescéine a également fait l'objet d'études : une solution de fluorescéine exposée à la lumière voit rapidement son absorbance diminuer alors que cette même solution protégée de la lumière reste stable. Une exposition à une lampe fluorescente de 80 W diminue l'absorbance de 20 % en 6 jours, 35 % en 10 jours et 54 % en 6 semaines.

La disparition de l'absorbance aux longueurs d'ondes maximales d'absorption indique une destruction générale de la molécule (Diehl et Horchak-Morris, 1987). Le suivi de l'évolution de l'absorption de la molécule de fluorescéine est un bon indicateur de sa stabilité ainsi que celle de ses dérivés.

Cependant de nombreux auteurs n'ont pas observé de photodégradation ou du moins de façon insignifiante, dans des conditions habituelles de détection par fluorescence (Blakeslee et Baines, 1976 ; Soini et Hemmilä, 1979 ; Gutierrez et coll., 1989)

III.2.2. Propriétés spectrales de la fluorescéine

Alors que le pH d'une solution de fluorescéine influe fortement sur son comportement chimique, il en est de même pour ses caractéristiques spectrales. Une modification de la structure de la fluorescéine par l'incorporation de différents substituants influe également de façon importante sur le rendement quantique de la molécule.

III.2.2.1. Evolution de l'absorption

Seule la forme FH_3^+ paraît associée à une unique bande d'absorption à 437 nm. Les bandes d'absorption des 3 autres espèces (FH_2 , FH^- , F^{2-}) se recouvrent non seulement entre elles mais également avec la bande à 437 nm. Les travaux actuels n'ont pas permis d'identifier les longueurs d'onde précises pour chaque forme.

Récemment Diehl et Horchak-Morris (1987) ont attribué des bandes d'absorption maximales en fonction du pH de la solution aqueuse :

- à pH 1, $\lambda_{\text{max}} = 437 \text{ nm}$ ($\epsilon = 47150 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$)
- à pH 4,8 deux maxima sont présents à 455 nm ($\epsilon = 24180 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) et à 475 nm ($\epsilon = 24055 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$)
- à pH ≥ 8 une bande unique à 490 nm ($\epsilon = 77440 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ à pH 8,25)

En augmentant le pH, il y a déplacement de la longueur d'onde maximale d'absorption vers les longueurs d'onde élevées avec une augmentation de l'absorbance molaire (effets bathochrome et hyperchrome).

Il est à noter que les solutions concentrées de fluorescéine (>10 mM) sont fortement sujettes à l'inhibition de fluorescence, une perte de linéarité est observée dans les mesures d'absorbance ou de fluorescence (Entwistle et Noble, 1992).

III.2.2.2. Evolution de la fluorescence

L'évolution de la fluorescence en fonction du pH est identique à celle de l'absorption (Diehl et Markuszewski, 1989). La figure 17 montre l'évolution de l'intensité relative de fluorescence : à partir de pH 7,5, l'intensité atteint un plateau maximal.

Ce paramètre est déterminant quant au choix du pH des solutions à doser. L'utilisation de solutions tampons est requise tant en absorption qu'en fluorescence ou en polarisation de fluorescence afin d'obtenir un maximum d'intensité du signal mesuré ainsi qu'une meilleure reproductibilité.

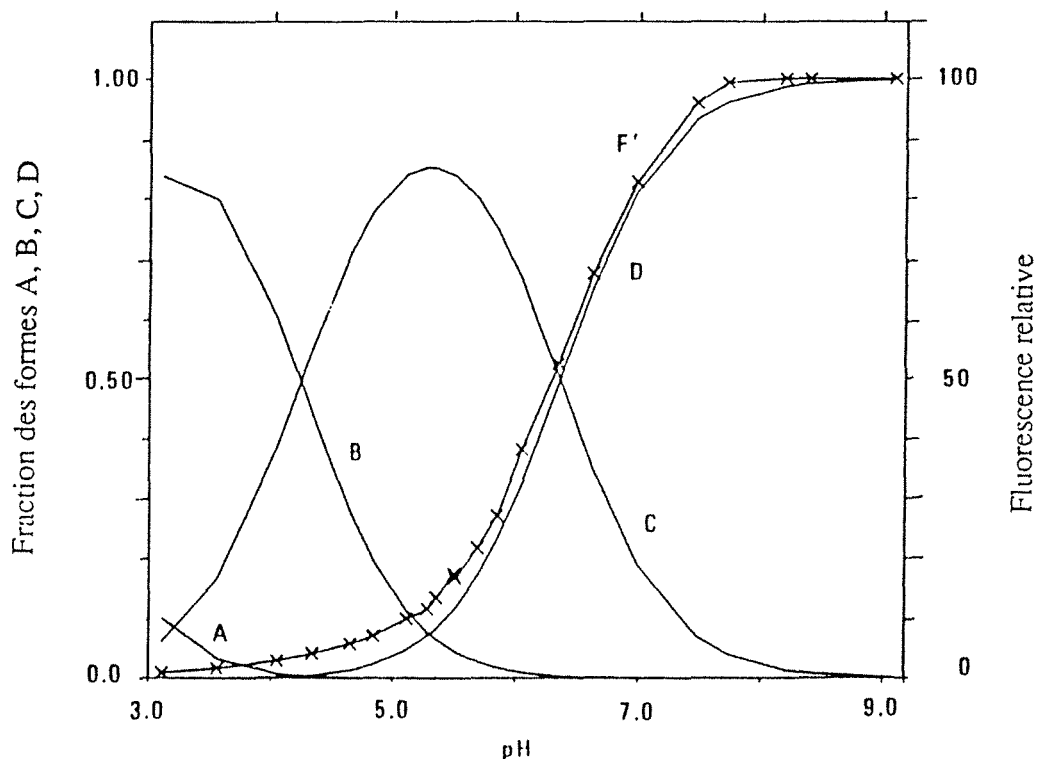


Figure 17 : Fluorescence relative normalisée de la fluorescéine en fonction du pH (d'après Diehl et Markuszewski, 1989)

Solution 6.10^{-6} M de fluorescéine, force ionique $\mu = 0,1$

Excitation à 489 nm, émission à 516 nm

A,B,C,D représentent les fractions de fluorescéine présentent sous les formes FH_3^+ , FH_2 , FH^- , F^{2-} respectivement.

Les fluorophores ayant des groupements ionisables ont leur durée de vie de fluorescence également modifiée par le pH. En milieu acide sulfurique concentré (10 M), la durée de vie de la fluorescéine est de 3,5 nsec. Elle diminue pour des solutions moins concentrées pour atteindre une valeur constante entre pH 0 et 4. Pour des valeurs de pH supérieures, la durée de vie réaugmente (Martin et Lindqvist, 1975).

Le rendement quantique de fluorescence varie également. La figure 18 montre son évolution en fonction du pH. A partir de pH 7, le rendement quantique atteint un palier maximal. C'est donc à partir de cette valeur de pH que la fluorescéine présente tous les intérêts requis dans un dosage par fluorescence.

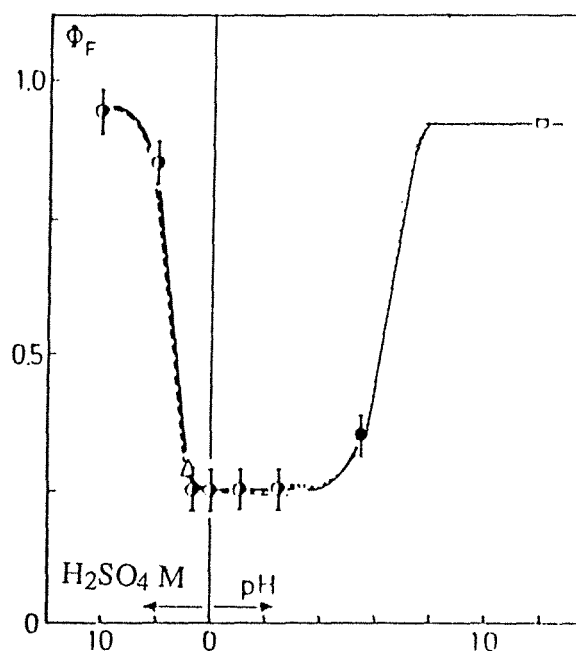


Figure 18 : Evolution du rendement quantique de fluorescence de la fluorescéine en fonction du pH (d'après Martin et Lindqvist, 1975)

Excitation à 437 nm pour $pH < 4$ et à 490 nm pour $pH > 4$

Les données spectrales obtenues par différents auteurs pour la fluorescéine et ses principaux dérivés sont décrites dans le tableau IX.

TABLEAU IX
CARACTERISTIQUES SPECTRALES DE LA FLUORESCÉINE
ET DE SES PRINCIPAUX DERIVES

Molécule	Rendement quantique Φ	Durée de vie (nsec)	Conditions opératoires	Références
Fluorescéine	environ 0,9	environ 5 nsec	solution aqueuse alcaline	Smith et coll., 1981
Fluorescéine	0,85	4,5	-	Hemmilä, 1985
Fluorescéine	0,87	-	tampon phosphate, 0,1 M pH 8	Ullman et Khanna, 1981
Fluorescéine	0,65 0,92	- -	H ₂ O pH 7 NaOH 0,1 N	Weber et Teale, 1958
Fluorescéine	-	4,5	NaOH 0,1 N	Dandliker et coll., 1973
Fluorescéine	- -	3,5 3,15	H ₂ SO ₄ 10 M H ₂ SO ₄ 5 M	Martin et Lindqvist, 1975
Fluorescéine	0,85	-	tampon phosphate	Munkholm et coll., 1990
FITC	0,76	-	0,1 M pH 7,5	
fluorescéine amine	0,015	-		
FITC (liée à une protéine)	0,85	4,5	-	Soini et Hemmilä, 1979
	fluorescence relative			
Fluorescéine	100	-	tampon borate	Blakeslee et Baines, 1976
FITC	45	-	0,1 M pH 9	

FITC : isothiocyanate de fluorescéine (isomère I)

III.3. Fonctionnalisation de la fluorescéine en vue de la dérivation des acides carboxyliques

Du fait de leur faible nucléophilie, les acides carboxyliques sont difficilement modifiés par des marqueurs en milieu aqueux. La plupart des réactions s'effectuent en milieu organique.

Jusqu'à présent, seules les réactions d'estérification étaient principalement appliquées aux acides carboxyliques du fait de la rapidité de la cinétique. La 5 -(ou 6) bromométhyl fluorescéine (tableau X) est décrite comme réactif de dérivation des acides carboxyliques, cependant les esters obtenus restent instables en milieu aqueux.

Il est apparu nécessaire de s'intéresser aux fluorescéines ayant un groupement aminé pouvant être impliqué dans une réaction d'amidification.

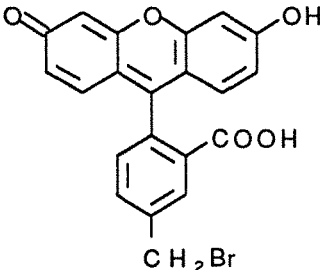
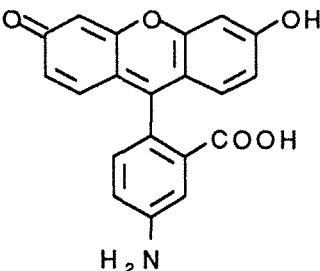
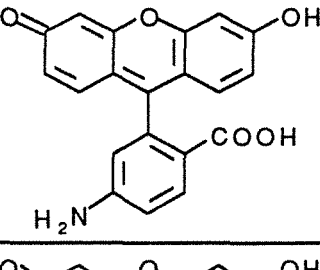
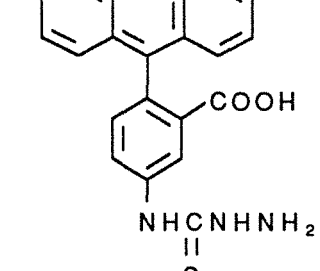
La commercialisation de telles molécules est très peu développée. Les isomères de la fluorescéine amine (tableau X) n'offrent pas de groupements suffisamment réactifs pour la dérivation de faibles quantités d'éicosanoïdes (Shipchandler et coll., 1987).

La fluorescéine-5 thiosemicarbazide, préconisée dans le marquage des fonctions aldéhydes et cétones ne présente pas les caractéristiques requises pour cette étude.

III.4. Etude des possibilités de couplage de dérivés aminés de la fluorescéine avec la fonction carboxyle des éicosanoïdes : la réaction d'amidification

Plus complexe de mise en oeuvre que les réactions d'estérification, le choix d'un couplage par amidification des éicosanoïdes relève du fait de la stabilité de la liaison. Alors qu'un ester est très sensible à l'hydrolyse, l'amide ne présente pas d'hydrolyse dans des conditions normales de conservation. Ce couplage laisse présager une meilleure stabilité du bioréactif à sec et en milieu aqueux lors de l'immunodosage par polarisation de fluorescence. La dégradation des carboxamides requiert en général la présence d'acide ou de base concentrés ainsi qu'une température supérieure à 100 °C (Challis et Challis, 1979).

TABLEAU X
MOLECULES ISSUES DE LA FLUORESCÉINE UTILISABLES DANS LA
DERIVATION DE LA FONCTION CARBOXYLE

Formule	Nom	Commercialisée par
	5 - bromométhyl fluorescéine	Molecular Probes
	Fluorescéine amine Isomère I	Molecular Probes ou Aldrich
	Fluorescéine amine Isomère II	Molecular Probes ou Aldrich
	Fluorescéine-5 thiosemicarbazide (F-5 TSC)	Molecular Probes

Les méthodes de couplage entre acides carboxyliques et amines font l'objet d'un intérêt constant tant en biochimie pour la synthèse peptidique (Hudson, 1988) qu'en chimie, par exemple dans l'analyse des acides par chromatographie (Toyo'oka et coll., 1991).

Les marqueurs fluorescents impliqués dans la dérivation des acides carboxyliques peuvent être divisés en deux groupes :

- ceux réagissant directement avec l'acide tels les composés halogénométhyles aromatiques (par exemple : la 4-bromométhyl 7-méthoxy coumarine). Cependant ces dérivations sont peu sélectives (réaction avec les phénols, thiols et imides) (Lingeman et coll., 1984)
- ceux ne pouvant être greffés qu'après une activation de la fonction carboxyle par différents réactifs de couplage. C'est cette deuxième possibilité qui est à optimiser dans le cas du couplage d'un éicosanoïde avec la fluorescéine modifiée.

En général, l'étape de formation du carboxamide requiert l'activation de la fonction carboxyle par la formation de chlorure (Challis et Challis, 1979 ; Ikeda et Kusaka, 1992) ou d'anhydride d'acides (Kita et coll., 1986). Cependant ces méthodes ne sont pas envisageables pour la dérivation des éicosanoïdes du fait des conditions opératoires drastiques et l'étape de purification nécessaire avant la réaction en présence de la molécule aminée.

Une autre possibilité consiste en l'activation de la fonction carboxyle par un catalyseur, suivie de l'attaque nucléophile de l'amine. Seule cette méthode présente les caractéristiques requises pour la dérivation des biomolécules à fonction carboxyle et plus particulièrement pour le TxB₂ étant données les conditions plus douces de réaction. De nombreux systèmes de catalyse sont décrits, mais seuls les plus courants semblent pouvoir être appliqués à cette étude.

Il est à noter que certaines réactions d'amidification sont également possibles par des enzymes telles que la thermolysine, la chymotrypsine et la papaïne (Adisson, 1988). Néanmoins, elles sont spécifiques de certains acides aminés et les rendements ne sont pas toujours très importants (30 % en moyenne). Elles requièrent également des quantités importantes en

substrat (100 à 150 mmoles) puisqu'il faut déplacer le processus d'hydrolyse dans le sens de la formation de la liaison peptidique.

La synthèse d'amide est également décrite en utilisant un tamis moléculaire de 4 Å par chauffage à des températures supérieures à 140°C (Cossy et Pale-Grosdemange, 1989). Il est évident que cette méthode ne peut être appliquée aux éicosanoides, malgré les bons rendements décrits (> 90 %).

Le choix de la procédure de couplage doit tenir compte de différents paramètres étant donnée la nature des biomolécules engagées :

- le coût de la molécule ne permet pas de l'utiliser en grande quantité pour la dérivation (au maximum de l'ordre du mg), cette condition étant alors limitante sur le rendement de la réaction
- le rendement de la dérivation doit être cependant le plus grand possible et ce pour la même raison que précédemment
- une dérivation sans étape de purification intermédiaire est préférable au vu des faibles quantités entrant en jeu
- le couplage doit se faire dans des conditions "douces" afin de ne pas altérer la structure de la biomolécule.

III.5. Catalyseurs d'amidification

Les principales classes de catalyseurs sont regroupées suivant leur nature chimique :

- les sels de pyridinium
- les composés comprenant un atome de phosphore réactif
- les carbodiimides
- les catalyseurs ayant pour formule de base le benzotriazole
- les succinimides.

Les carbodiimides et les succinimides sont souvent associés lors des réactions de couplage, ce qui augmente les rendements. Mais d'autres "cocktails" sont également possibles.

Les principaux protocoles de dérivation sont regroupés dans le tableau XI.

TABLEAU XI
PRINCIPAUX PROTOCOLES D'AMIDIFICATION UTILISANT
DIFFERENTS CATALYSEURS

Acide	Amine	Catalyseur	Solvant/agent de déprotonation	Temps de réaction	Rendement moyen décrit	Référence
4 mmoles	4,4 mmoles	DEPC 4,4 mmoles	DMF/TEA	30 min à 0 °C puis 1 h à 20 °C	80 %	Shioiri et coll., 1976
1 mmole	1 mmole	BEPT 1,1 mmoles	CH ₃ CN/MDPP	30 min à 20 °C	40 %	Narita et coll., 1989
10 nmoles	200 µg dipropylamine	BMPI 0,3 µmole	CH ₃ CN + CH ₂ Cl ₂ / TEA	30 min à 20 °C	40 / 80 %	Lingeman, 1986
2,3 mmoles	2,3 mmoles	DCC (2,3 mmoles) + NHS (3,4 mmoles)	DMF/TEA	20 h à 25 °C avant et après l'ajout de l'amine	20 %	Shipchandler et coll., 1987
-	-	BOP (0,1 mmole)	DMF	-	85 %	Hudson, 1988

MDPP : 9-méthyl-3,4-dihydro-2H-pyrido[1,2-a]pyrimidin-2-one

NHS : N-hydroxysuccinimide

TEA : triéthylamine

DEPC : diéthylcyanophosphate

BMPI : iodure de bromométhylpyridinium

DCC : dicyclohexylcarbodiimide

BOP : benzotriazolyl-N-tris(diméthylamino)phosphonium hexafluorophosphate BMPI :

Depuis l'expansion de la biologie moléculaire, de nombreux auteurs se sont intéressés au couplage peptidique non seulement dans le but d'augmenter les rendements de réaction mais également pour contrôler la stéréochimie. Ces différentes méthodes de catalyse sont adaptables au couplage de l'écicosanoïde avec un marqueur fluorescent porteur d'une fonction amine.

III.5.1. Les sels de pyridinium

Les sels de pyridinium tels que l'iodure de 2-bromo 1-méthyl pyridinium (BMPI) (Saigo et coll., 1977) ou le 2-bromo 1-éthyl pyridinium tétrafluoroborate (BEPT), développés dans les années 60, sont couramment employés dans les réactions de couplage (Narita et Kitagawa, 1989).

Ces catalyseurs permettent la préparation d'esters ou d'amides dans des conditions douces et avec des rendements supérieurs à 90 %.

Comme le représente le mécanisme de la réaction de la figure 19, l'anion carboxylate est facilement activé par le BMPI conduisant à la formation d'un iodure de 2-acyloxy 1-méthyl pyridinium par une attaque nucléophile de l'anion sur le carbone porteur de l'atome de brome. La triéthylamine est utilisée en tant qu'agent de déprotonation de l'acide carboxylique et de capture de l'halogénure d'hydrogène formé.

L'amide est obtenue par l'attaque nucléophile de l'amine sur la fonction carbonyle.

La réaction doit se passer en milieu non aqueux afin d'éviter les réactions parasites. L'emploi de solvants polaires aprotiques (tels que le N,N diméthylformamide, DMF) est à éviter : une réaction spontanée des sels de pyridinium est observable à température ambiante conduisant à la formation de pyridone. Ce phénomène n'est pas observé par tous les auteurs (Lingeman, 1986).

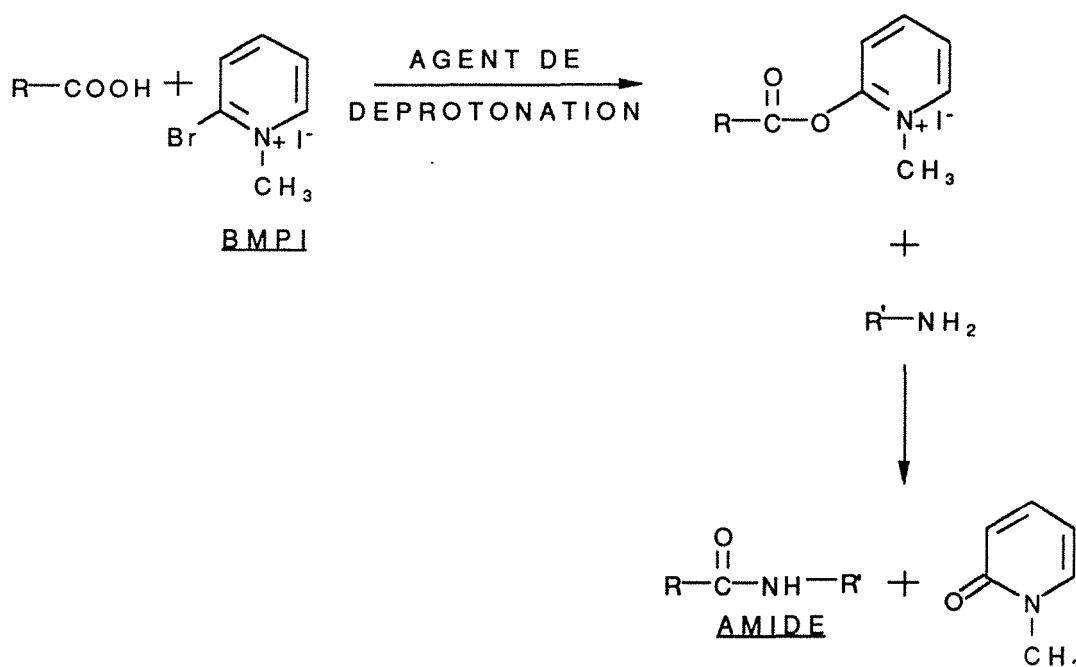
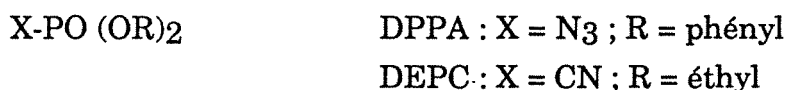


Figure 19 : Schéma de catalyse au BMPI

III.5.2. Catalyseurs contenant un atome de phosphore

Les composés organophosphorés (Hiroshi et coll., 1993) sont des molécules importantes dans la synthèse organique. La variété des composés organiques du phosphore tant au niveau de leur structure que du point de vue de leur réactivité résulte de la structure électronique de cet élément : suivant la coordinance du phosphore, il pourra agir comme nucléophile ou comme électrophile.

C'est cette dernière propriété qui est mise à contribution dans la réaction d'amidification par les organophosphorés tels que le diphenyl-phosphorazidate (DPPA) et le diéthyl-phosphorocyanidate (DEPC) :



Le DEPC présente une activité de catalyse des réactions d'amidification et d'estérification (Shioiri et coll., 1976 ; Lee et coll., 1989). Il inhibe également les réactions de racémisation. Le schéma d'amidification au DEPC est représenté sur la figure 20.

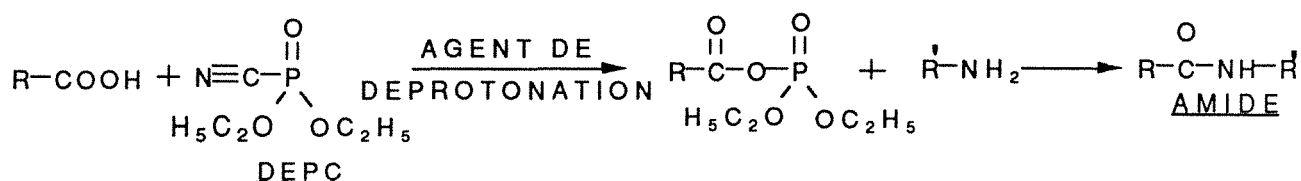


Figure 20 : Schéma de catalyse au DEPC

Les anhydrides phosphorés (Hendricksson et Hussoin, 1989) peuvent être utilisés pour le même type de réaction : ils permettent la conversion des acides carboxyliques en anhydrides, esters, amides avec de bons rendements.

III.5.3. Les carbodiimides

La famille des carbodiimides comporte de nombreuses molécules réagissant sous de multiples conditions opératoires (Mikolajczyk et Kielbasinsky, 1981). La formule générale est : $\text{R-N}=\text{C}=\text{N-R}'$. Suivant la nature des substituants R et R', le catalyseur peut être utilisé en milieu aqueux ou anhydre. Le mécanisme général de l'activation par les carbodiimides est représenté sur la figure 21.

Un mélange de carbodiimides est également proposé, le dicyclohexylcarbodiimide (DCC) est alors utilisé comme solvant à une température supérieure à 34 °C (point de fusion 34 °C) (Dray et coll., 1982). Parmi les plus courants, le DCC, le diisopropylcarbodiimide, le chlorhydrate de 1-éthyl 3-diméthylaminopropyl carbodiimide (EDC-HCl) sont utilisés dans la synthèse peptidique avec des rendements variables (Hudson, 1988). Les carbodiimides peuvent être associés avec d'autres catalyseurs (N-hydroxysuccinimide par exemple).

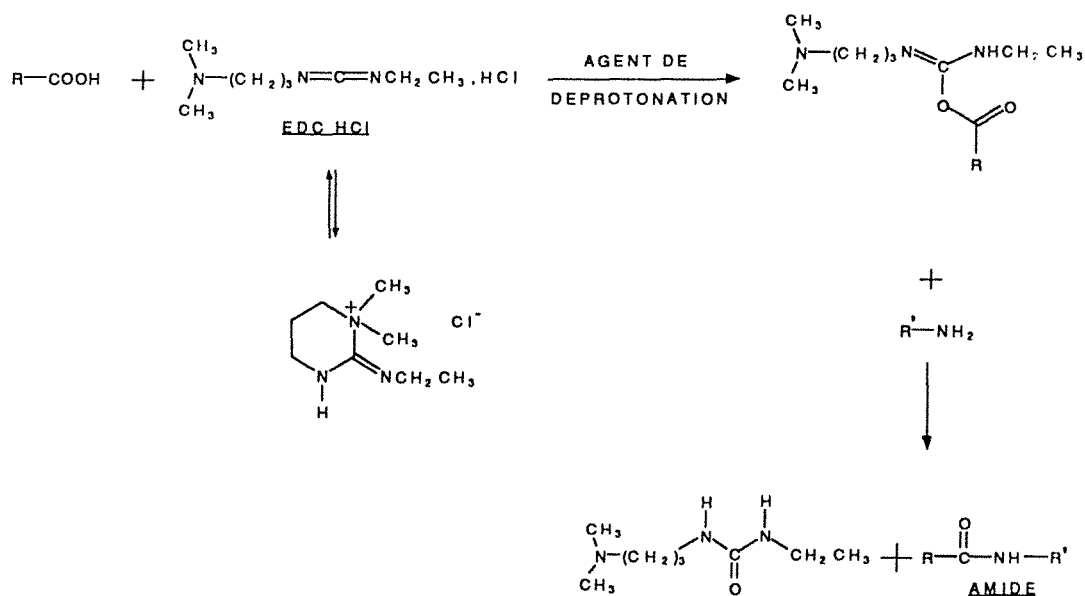


Figure 21 : Schéma de l'amidification au carbodiimide

III.5.4. Les benzotriazoles et apparentés

Les dérivés du benzotriazole et en particulier le 1-hydroxybenzotriazole sont utilisés en tant qu'inhibiteur de racémisation lors de la synthèse peptidique catalysée par un carbodiimide.

Cette stéréosélectivité peut également être obtenue avec le N-hydroxysuccinimide, plus couramment employé. Cependant de meilleurs résultats sont obtenus en présence d'hydroxybenzotriazole (Bosshard et coll., 1973).

L'addition d'hydroxybenzotriazole à des composés organophosphorés conduit à la formation d'une nouvelle génération de catalyseurs : l'hexafluorophosphate de benzotriazolyl N-oxytrisdiméthylamino phosphonium (BOP) (Castro et coll., 1975) et plus récemment à l'hexafluorophosphate de benzotriazolyl N-oxytris[pyrrolidino] phosphonium (PyBOP) (Coste et coll., 1990).

Le schéma réactionnel est présenté sur la figure 22. Le BOP en solution dans un solvant organique réagit à température ambiante pour former un ester réactif en synthèse peptidique, et ce de façon quantitative. Les temps de réactions sont inférieurs à ceux décrits pour les couplages au carbodiimide.

D'autres catalyseurs ont été synthétisés sur le même modèle que le BOP avec un groupement uronium à la place du groupement phosphonium (Knorr et coll., 1989). Ils présentent un intérêt pour la formation de liaison amide entre un haptène et une protéine porteuse, une protéine et un marqueur. Les mêmes auteurs ont également modifié un succinimide par le groupement uronium dans le même but (Bannwarth et Knorr, 1991).

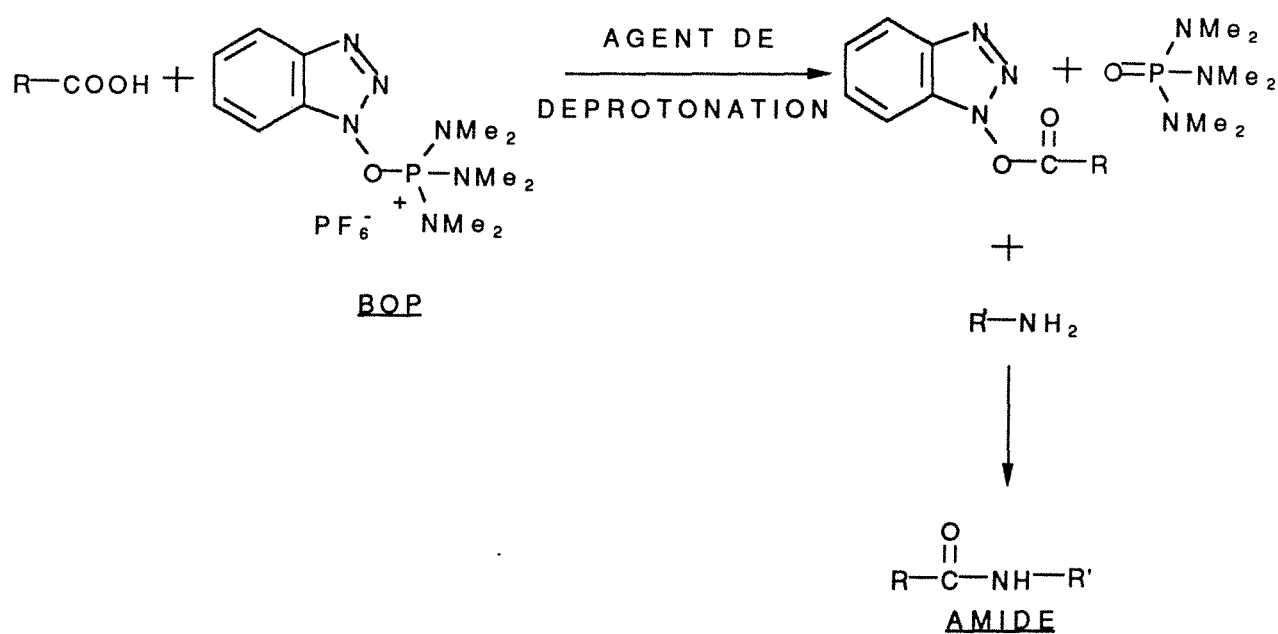


Figure 22 : Schéma de catalyse au BOP

PARTIE EXPERIMENTALE

1ère partie :

Etude de l'amidification de la fonction carboxyle par la fluorescéine modifiée

La fluorescéine, molécule intéressante du fait de ses propriétés spectrales, nécessite une modification de sa structure pour pouvoir être greffée sur un acide carboxylique. Différents fluorophores sont synthétisés à partir de la fluorescéine. Les possibilités d'amidification de ces molécules sont évaluées. Ces études ont mené au choix d'un marqueur.

Le greffage de la fluorescéine modifiée sur des biomolécules telles que le TxB₂ exige un rendement d'amidification le plus élevé possible du fait du coût important de ce dernier.

Les possibilités de dérivation sont optimisées tant au niveau du choix du système de catalyse qu'au niveau des conditions de couplage sur des acides carboxyliques modèles : l'acide palmitique et l'acide stéarique.

I. MATÉRIEL ET MÉTHODES

I.1. Réactifs

Les produits chimiques proviennent de :

Aldrich (Steinheim, Allemagne)	acide palmitique
	acide stéarique
	N-hydroxysuccinimide (NHS)
	éthylènediamine, chlorhydrate
	diéthylcyanophosphonate (DEPC)
Merck (Darmstadt, Allemagne)	acétonitrile
	N,N diméthylformamide (DMF)
	triéthylamine
	dihydrogénophosphate de sodium
	2-bromopyridine
	iodure de méthyle

Sigma (St Louis, MO, USA)

fluorescéine isothiocyanate (isomère I)
1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)-
carbodiimide, chlorhydrate (EDC-HCl)
1-hydroxybenzotriazole (HOBT)
thromboxane B₂

Upjohn Company
(Kalamazoo, Mich, USA)

prostaglandine E₁

La synthèse de l'iodure de bromométhylpyridinium (BMPI) est effectuée au laboratoire selon la méthode décrite par Saigo (Saigo et coll., 1977).

Le benzotriazolyl-N-tris(diméthylamino)phosphonium hexafluorophosphate (BOP) provient du Laboratoire de Chimie Organique du Professeur C. Selve de la Faculté des Sciences de Nancy.

I.2. Matériel

I.2.1. Système de purification

Les purifications des dérivés sont effectuées sur des plaques de chromatographie sur couche mince (CCM) 20 cm x 20 cm, recouvertes de gel de silice 60, d'épaisseur 0,2 mm (art. n° 5553, Merck, Darmstadt, Allemagne).

I.2.2. Système analytique

Le système de chromatographie liquide consiste en une pompe de modèle P2000 combinée à un détecteur spectrophotométrique UV-visible à longueurs d'ondes variables (Spectra-Physics, Santa Clara, CA, USA) ou à un spectrophotomètre UV Knauer (Merck). Le système d'injection est une vanne à boucle de 20 µl (modèle 7125, Rhéodyne, Cotati, CA, USA). Les enregistrements des chromatogrammes et l'intégration des surfaces des pics sont réalisés au moyen d'un intégrateur Chromjet (Spectra-Physics) couplé à une station de données (Winner, Spectra-Physics).

La colonne (LiChrocart 125 mm x 4 mm, Merck, Darmstadt) utilisée est pré-remplie avec un support de type apolaire constitué de silice greffée par des chaînons octadécyles (LiChrospher 100 RP-18e 5 μ m, Merck, Darmstadt). Une précolonne (4 mm x 4 mm) contenant le même support est systématiquement utilisée. La précolonne est changée dès l'apparition de pics parasites lors de la phase de nettoyage de la colonne.

L'optimisation des conditions opératoires de la réaction d'amidification est visualisée par CLHP en utilisant un gradient eau/acétonitrile :

- de 0 à 5 minutes : 100 % eau
- de 5 minutes à 25 minutes : passage à 100 % acétonitrile.

I.2.3. Détermination des propriétés spectrales

La concentration en marqueur purifié est déterminée par spectrophotométrie UV-Visible (DU 64, Beckman, Gagny, France).

Les propriétés fluorescente sont déterminées sur un spectrofluorimètre SLM 48000S (Aminco, Urbana, IL, USA).

Les anisotropies de fluorescence sont mesurées sur le premier prototype de fuopolarimètre de l'unité 284 de l'INSERM (Vandoeuvre, France).

I.3. Protocoles de synthèse

I.3.1. Synthèse de la 5-((((2-aminoéthyl)thio)acétyl)amino) fluorescéine (AEF)

L'AEF est commercialisée par la société Molecular Probes (Or, USA). Cependant, du fait de la facilité et de la rapidité de la synthèse ainsi que du coût de la molécule, celle-ci est effectuée au laboratoire.

Le solvant de synthèse est une solution de triéthylamine (TEA) à 1 % (V/V) dans du méthanol.

Le chlorhydrate d'éthylènediamine (200 mg, 1,5 mmoles) est solubilisé dans 50 ml de solvant. L'ajout goutte à goutte d'isothiocyanate de fluorescéine (FITC isomère I, 117 mg, 0,3 mmole dans 10 ml de solvant) se fait pendant 30 minutes sous agitation. Les produits sont protégés de la lumière par du papier aluminium.

La solution est laissée sous agitation magnétique pendant 1 heure. Le précipité d'AEF apparaît au bout de 15 minutes.

Il est récupéré sur creuset de Schott (n° 4), lavé avec 20 ml de méthanol, séché dans un dessiccateur sous vide d'air. Après estimation du rendement de synthèse, il est conservé à 5 °C jusqu'à utilisation.

La pureté de l'AEF obtenu est déterminée par CLHP en comparaison avec le produit commercialisé, un contrôle du point de fusion sur un microscope à platine chauffante (Reichert, Vienne, Autriche) est également fait pour chaque lot de marqueur synthétisé.

I.3.2. Protocoles de dérivation

Toutes les études de dérivation sont menées dans des tubes SVL (n° 4) fermant hermétiquement et protégés de la lumière par du papier aluminium.

Les systèmes de catalyse étudiés sont :

- catalyse à l'iodure de bromométhyl pyridinium (BMPI, Mr = 300)
- catalyse au benzotriazolyl-N-tris(diméthylamino)phosphonium hexafluorophosphate (BOP, Mr = 442)
- catalyse au diéthylcyanophosphonate (DEPC, Mr = 163, d = 1,075)
- catalyse mélange d'un carbodiimide (EDC, HCl, Mr = 191,7) et de N-hydroxysuccinimide (NHS, Mr = 115)
- catalyse au mélange EDC, HCl et 1-hydroxybenzotriazole (HOBT, Mr = 131)

Les acides dérivés sont l'acide palmitique (Mr = 256) et l'acide stéarique (Mr = 284).

Les différents systèmes de catalyse, les concentrations des réactifs ainsi que les conditions de dérivation sont regroupés dans le tableau XII.

Tous les réactifs sont solubilisés dans le DMF. Le volume réactionnel pour la phase d'activation de l'acide est de 310 µl. Le volume d'AEF (0,013 M) ajouté est de 300 µl.

TABLEAU XII
PROTOCOLES D'AMIDIFICATION

	Acide palmitique mg (mole)		BMPI mg (mole)	BOP mg (mole)	DEPC μl (mole)	EDC, HCl mg (mole)	HOBT mg (mole)	NHS mg (mole)			
Protocole I	1 (4.10 ⁻⁶)	A	2	-	-	-	-	-	I	A	I
		J	(6,7.10 ⁻⁶)						N	J	N
Blanc	-	O	2	-	-	-	-	-	C	O	C
		U	(6,7.10 ⁻⁶)						U	U	U
Protocole II	1 (4.10 ⁻⁶)	T	-	3,5 (8.10 ⁻⁶)	-	-	-	-	B	T	B
									A		A
Blanc	-	D	-	3,5 (8.10 ⁻⁶)	-	-	-	-	T	D	T
		E							I	E	I
Protocole III	1 (4.10 ⁻⁶)		-	-	-	1,5 (8.10 ⁻⁶)	0,5 (4.10 ⁻⁶)	-	O		O
									N	1,8 mg	N
Blanc	-	10 μl	-	-	-	1,5 (8.10 ⁻⁶)	0,5 (4.10 ⁻⁶)	-		(4.10 ⁻⁶ mole)	
Protocole IV	1 (4.10 ⁻⁶)		-	-	-	1,5 (8.10 ⁻⁶)	-	0,5 (4,3.10 ⁻⁶)	10 min	D'	24 h
Blanc	-	D	-	-	-	1,5 (8.10 ⁻⁶)	-	0,5 (4,3.10 ⁻⁶)		A	
		E								E	
Protocole V	1 (4.10 ⁻⁶)		-	-	10 (6,6.10 ⁻⁵)	-	-	-	à	F	à
		T									
Blanc	-	E	-	-	10 (6,6.10 ⁻⁵)	-	-	-	20 °C		20 °C
		A									

TEA : triéthylamine

BMPI : iodure de bromométhyl pyridinium

BOP : benzotriazolyl-N-tris(diméthylamino)phosphonium hexafluorophosphate

DEPC : diéthyl cyanophosphate

EDC, HCl : 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)-carbodiimide, chlorhydrate

NHS : N-hydroxysuccinimide

HOBT : 1-hydroxybenzotriazole

I.3.3. Optimisation de la dérivation de l'acide palmitique

I.3.3.1. Influence du temps d'activation de l'acide par les catalyseurs EDC, HCl et HOBT

L'acide palmitique est mis à incuber à 37 °C en présence du mélange EDC-HOBT pendant 0, 10, 20, 30, 60 minutes (concentrations identiques aux valeurs du tableau XII). L'AEF est ensuite ajoutée. Une estimation du pourcentage de dérivé formé est faite au bout de 4 heures et de 7 heures d'incubation par CLHP.

I.3.3.2. Influence de la température et du temps d'incubation

Après activation de l'acide palmitique en présence du mélange de catalyseurs EDC-HOBT à 5 °C, 20 °C, 37 °C pendant 20 minutes dans les proportions décrites dans le tableau XII, l'AEF est ajoutée. L'incubation est prolongée à ces mêmes températures pendant 24 heures. Des estimations du rendement sont effectuées à différents intervalles de temps par CLHP (1 h, 3 h, 5 h, 7 h, 18 h, 24 h).

I.3.4. Dérivation de la prostaglandine E₁ et du thromboxane B₂

La méthode de couplage utilisant le mélange EDC-HOBT (figure 23) est appliquée aux éicosanoïdes.

Le protocole est identique pour la PGE₁ (Mr = 354,5) et le TxB₂ (Mr = 370,5) : l'éicosanoïde ($2,8 \cdot 10^{-6}$ mole, 1 mg) est incubé sous agitation avec $4 \cdot 10^{-6}$ mole de EDC, HCl, $3 \cdot 10^{-6}$ mole d'HOBT et 10 µl de triéthylamine dans 0,3 ml de DMF afin de former l'ester réactif. Après 2 heures à 25 °C, 300 µl d'une solution de AEF dans le DMF ($1,1 \cdot 10^{-4}$ M) sont ajoutés. La solution est mise à incuber pendant 24 heures à 25 °C. Un blanc contenant tous les produits sauf l'éicosanoïde est effectué systématiquement.

La dérivation de l'acide palmitique (1 mg, $3,9 \cdot 10^{-6}$ mole) est réalisée en parallèle en tant que témoin de la réaction et de la purification chromatographique.

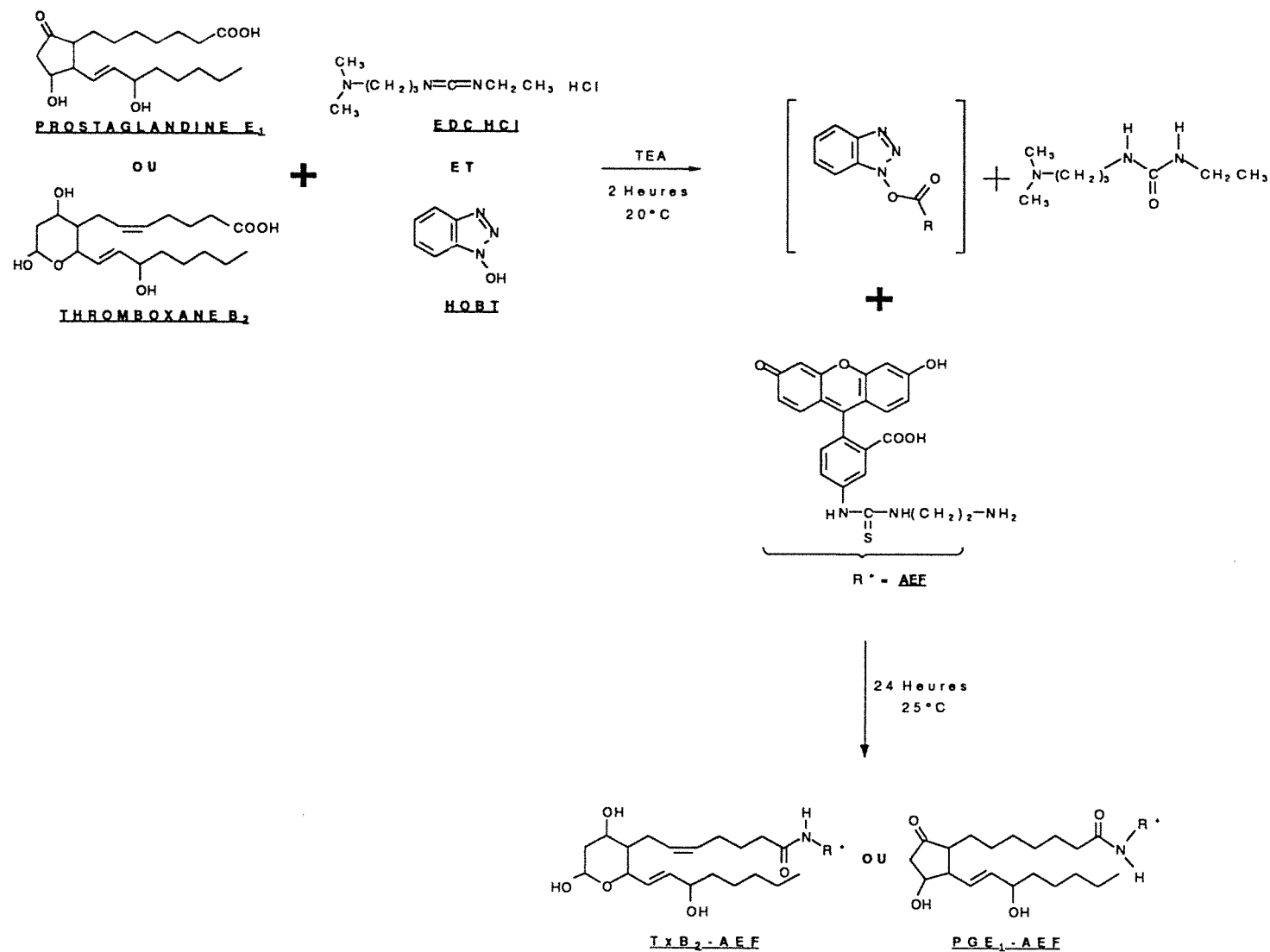


Figure 23 : Mécanisme d'amidification du groupe carboxyle de la prostaglandine E₁ et du thromboxane B₂ par la 5-(((2-aminoéthyl)thio)acétyl)amino) fluorescéine

I.3.5. Purification des dérivés fluorescents

I.3.5.1. Purification par CCM

Les traceurs obtenus précédemment (PGE₁ - AEF ou TxB₂ - AEF) sont purifiés par CCM. La phase éluante est constituée d'un mélange d'hexane/éthanol (50 : 50, V/V). Une plaque sert à la purification de 0,1 ml du milieu réactionnel. La partie de silice fluorescente correspondant aux dérivés est grattée puis extraite à l'éthanol. La solution est fractionnée (1.10^{-8} mole par tube), évaporée sous courant d'azote. Les tubes sont conservés à -20 °C sous azote, à l'abri de la lumière.

- Détermination de la concentration en traceur

La concentration en traceur est déterminée spectrophotométriquement (Pourfarzaneh et coll., 1980) par dilution des fractions purifiées dans du tampon phosphate de sodium 0,1 M pH 7. Une droite d'étalonnage d'AEF (0,1 µg/ml, 0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml ($2,2.10^{-7}$ M, $1,1.10^{-6}$ M, $2,2.10^{-6}$ M, $1,1.10^{-5}$ M, $2,2.10^{-5}$ M) conservés en solution à 5 °C pendant 6 mois) sert à la quantification du traceur ainsi qu'à une estimation de la stabilité de l'AEF en solution.

I.3.5.2. Contrôle de la pureté par CLHP

La phase mobile servant au contrôle de pureté du traceur est constituée d'un mélange de trifluoroacétate de triéthylamine (triéthylamine 0,1% dans de l'eau bidistillée, pH ajusté à 7,5 avec de l'acide trifluoroacétique) et d'acétonitrile (75 : 25, V/V). Le débit de la pompe est fixé à 1 ml.min⁻¹.

Les échantillons sont reconstitués dans le même solvant avant injection.

I.3.6. Propriétés spectrales

1.3.6.1. Détermination du spectre de fluorescence

Le spectre d'émission de fluorescence est obtenu après avoir fixé la longueur d'onde d'excitation à la longueur d'onde maximale d'absorption, un balayage entre deux longueurs d'onde d'émission est effectué.

Le spectre d'excitation est tracé en fixant la longueur d'onde d'émission à la valeur maximale déterminée précédemment et en effectuant un balayage entre deux longueurs d'onde d'excitation.

Le marqueur et les traceurs sont solubilisés dans un tampon phosphate 0,1 M à pH 7,5.

I.3.6.2. Détermination du rendement quantique Φ

Les rendements quantiques de fluorescence sont déterminés par une méthode relative (Demas et Rosky, 1971) utilisant une solution de fluorescéine en tant que référence.

Les mesures sont faites dans la soude 0,1 N, la valeur du rendement quantique de la fluorescéine étant donnée pour ces conditions d'analyse.

Le rendement est calculé à partir de l'équation suivante :

$$\Phi_X = \Phi_R \cdot \frac{A_R}{A_X} \cdot \frac{E_X}{E_R} \cdot \frac{I_R}{I_X} \cdot \frac{n^2_R}{n^2_X}$$

Avec :

X : composé étudié

R : composé de référence

Φ : rendement quantique

A : absorbance

E : surface du spectre d'émission corrigé

I : intensité de la lumière d'excitation

n : indice de réfraction du solvant de mesure

Pour un même solvant et une longueur d'onde d'excitation commune, l'équation devient :

$$\Phi_X = \Phi_R \cdot \frac{A_R}{A_X} \cdot \frac{E_X}{E_R}$$

Afin d'éliminer les erreurs liées à la réabsorption et à la réflexion interne, l'absorbance des solutions est fixée à environ 0,01.

I.3.6.3. Détermination de la durée de vie de fluorescence τ

Les mesures du déclin de fluorescence sont effectuées dans la soude 0,1 N par la technique de fluorimétrie de phase. Les caractéristiques techniques du fluorimètre SLM 48000S permettent des mesures sur une gamme de fréquence allant de 8 à 180 MHz. Les mesures sont faites aux longueurs d'onde d'excitation et d'émission de la fluorescéine.

Le calcul des composantes de la durée de vie se fait par rapport à une référence de durée de vie connue et unique dont les caractéristiques spectrales se rapprochent des caractéristiques de l'échantillon à étudier. La fluorescéine sous sa forme moléculaire non modifiée chimiquement a servi de référence, sa durée de vie étant de 4,5 ns dans la soude 0,1 N (Dandliker et de Saussure, 1970).

Les données sont analysées suivant un modèle d'exponentielles multiples. La méthode des moindres carrés est employée, un test du χ^2 est appliqué pour juger de la validité de la détermination.

L4. Etude de la stabilité du dérivé TxB₂ - AEF

La stabilité du traceur TxB₂ - AEF a été étudiée à différentes températures : - 70 °C, - 20 °C, + 4 °C, + 37 °C, à sec sous azote ou en solution dans du tampon phosphate 0,01 M pH 7,4 pour une étude de la stabilité à 25 °C dans les conditions d'un dosage par polarisation de fluorescence.

La stabilité a été suivie par CCM, CLHP, spectrométrie d'absorption et par des mesures d'anisotropie de fluorescence.

II. DÉRIVATION D'UNE MOLÉCULE MODÈLE DES ÉICOSANOÏDES, L'ACIDE PALMITIQUE

II.1. Etude des marqueurs

II.1.1. Choix du marqueur fluorescent

Lors de la recherche d'un marqueur dont la structure de base est celle de la fluorescéine, deux possibilités apparaissent. Il faut :

- soit évaluer l'aptitude des différents marqueurs aminés existants pour une dérivation
- soit envisager la synthèse d'autres molécules présentant un "bras" porteur d'une fonction amine réactive.

Les seules molécules comportant une fonction amine, décrites dans la partie bibliographique (fluorescéine amine isomères I et II et la F-5 TSC) ne sont pas intéressantes quant à la faible réactivité de la fonction amine (Shipchandler et coll., 1987). Les caractéristiques spectrales sont également peu intéressantes : le rendement quantique est très faible (inférieur à 0,1) (Munkholm et coll., 1990).

Trois types de synthèse ont été envisagés à partir de la fluorescéine ou de l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) (figure 24) :

- utiliser la fonction carboxyle pour la fixation d'un groupement aminé
- modifier sa structure par ajout d'un groupement alkylamine en position 4'
- exploiter la réactivité de la molécule de FITC pour la greffer sur un bras porteur d'une fonction amine.

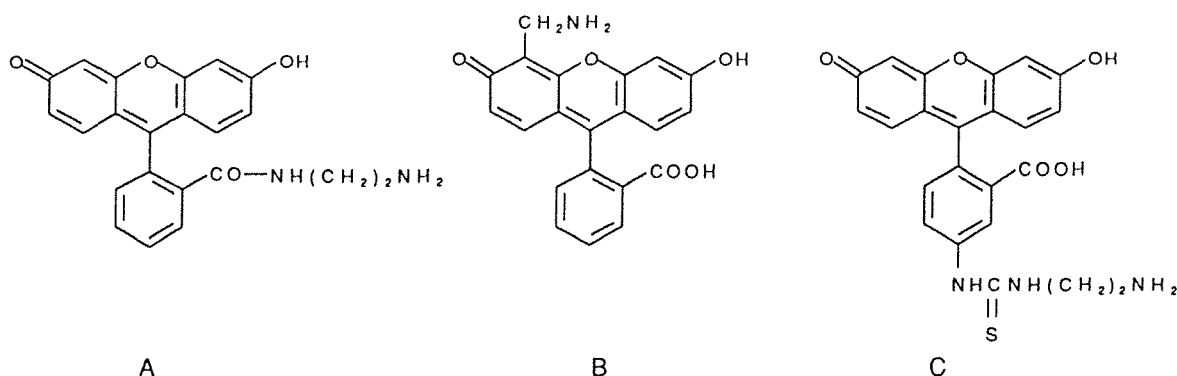


Figure 24 : Structure des différentes fluorescéines à fonction amine synthétisables

A : amido éthylamine fluorescéine

B : 4'-aminométhyl fluorescéine

C : 5-(((2-aminoéthyl)thio)acétyl)amino) fluorescéine

Des essais de modification du groupement carboxyle de la fluorescéine par amidification n'ont pas permis de conclure sur la nature des multiples produits obtenus, visualisés en CCM. La fluorescéine est activée par un catalyseur d'amidification en présence d'un agent déprotonant organique (l'éthyldiisopropylamine), puis l'ester réactif est mis en présence de trityldiéthanolamine pour former l'amide correspondant. Cette synthèse n'a malheureusement pas apporté les résultats escomptés mais elle met en évidence la complexité de la réactivité de la molécule de fluorescéine.

La synthèse d'une autre fluorescéine (figure 25) à fonction amine est publiée (Shipchandler et coll., 1987) dans le but de l'appliquer en tant que réactif dans les techniques d'immunodosages. Elle s'effectue en trois étapes :

- synthèse du substituant portant la fonction amine, le chloroacétamidométhanol
- couplage du substituant sur la fluorescéine
- libération de la fonction amine et obtention de la 4'-aminométhyl fluorescéine.

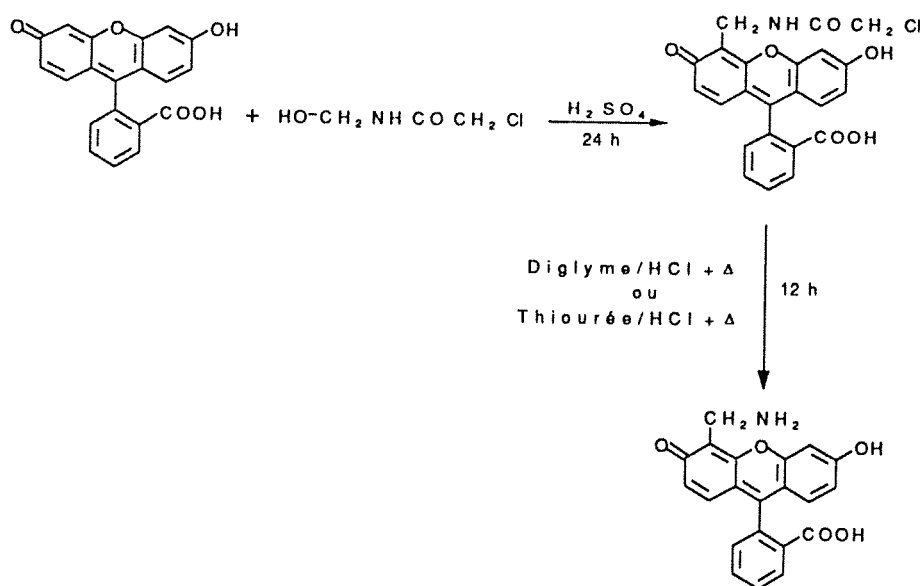


Figure 25 : Schéma de synthèse de la 4'aminométhyl fluorescéine (AMF)

La libération de la fonction amine s'effectue par une hydrolyse à l'acide chlorhydrique sous ébullition dans le 2-méthoxyéthyl éther ($T_{\text{eb}} = 162^\circ\text{C}$) ou par action de la thiourée en milieu chlorhydrique en formant une pseudothiohydantoïne (Masaki et coll., 1968).

Les étapes de synthèse sont assez aisées dans leur mise en oeuvre. Par contre les étapes de purification par chromatographie de l'intermédiaire de synthèse semi-préparative sont longues. Elles nécessitent l'utilisation d'une grande quantité de solvant. Cette méthode est limitative quant au volume et à la concentration de l'échantillon à purifier mais le produit obtenu lors de la synthèse a présenté une pureté satisfaisante. Enfin, des rendements faibles sont obtenus pour la libération de la fonction amine ($< 30\%$) et il est nécessaire d'effectuer une nouvelle étape de purification avant de pouvoir utiliser le marqueur.

La complexité des différentes opérations entrant dans la synthèse de l'AMF ne permet pas d'obtenir des quantités suffisantes de marqueur pour une étude de la dérivation des acides carboxyliques, bien que des essais de couplage aient été positifs.

Une alternative est d'utiliser la grande réactivité de la fonction thiocyanate de la FITC pour la coupler sur l'éthylène diamine (Pourfarzaneh et coll., 1986). La réaction se fait par ajout progressif de FITC sur l'amine en défaut de concentration pour éviter un couplage de deux molécules de FITC par molécule d'éthylène diamine (figure 26). Le rendement de synthèse élevé (85 %) permet l'obtention d'une quantité importante de marqueur nécessaire pour une étude de la réaction d'amidification.

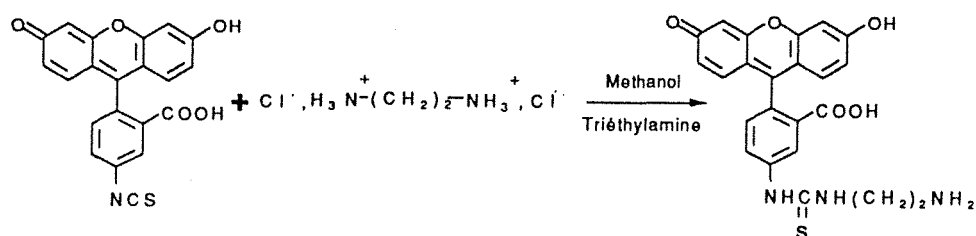


Figure 26 : Schéma de synthèse de la 5-(((2-aminoéthyl)thio) acétyl)amino) fluorescéine

II.1.2. Caractéristiques physico-chimiques de la 5-(((2-aminoéthyl)thio) acétyl)amino) fluorescéine (AEF)

Les profils chromatographiques obtenus en CLHP (figure 27) montrent la présence d'impuretés ne dépassant pas 5 % dans le cas de la synthèse, ce qui est comparable à la pureté du produit commercial. Ces impuretés correspondent en partie à un résidu de FITC.

Le point de fusion de la molécule d'AEF est de 195 °C +/- 1 °C.

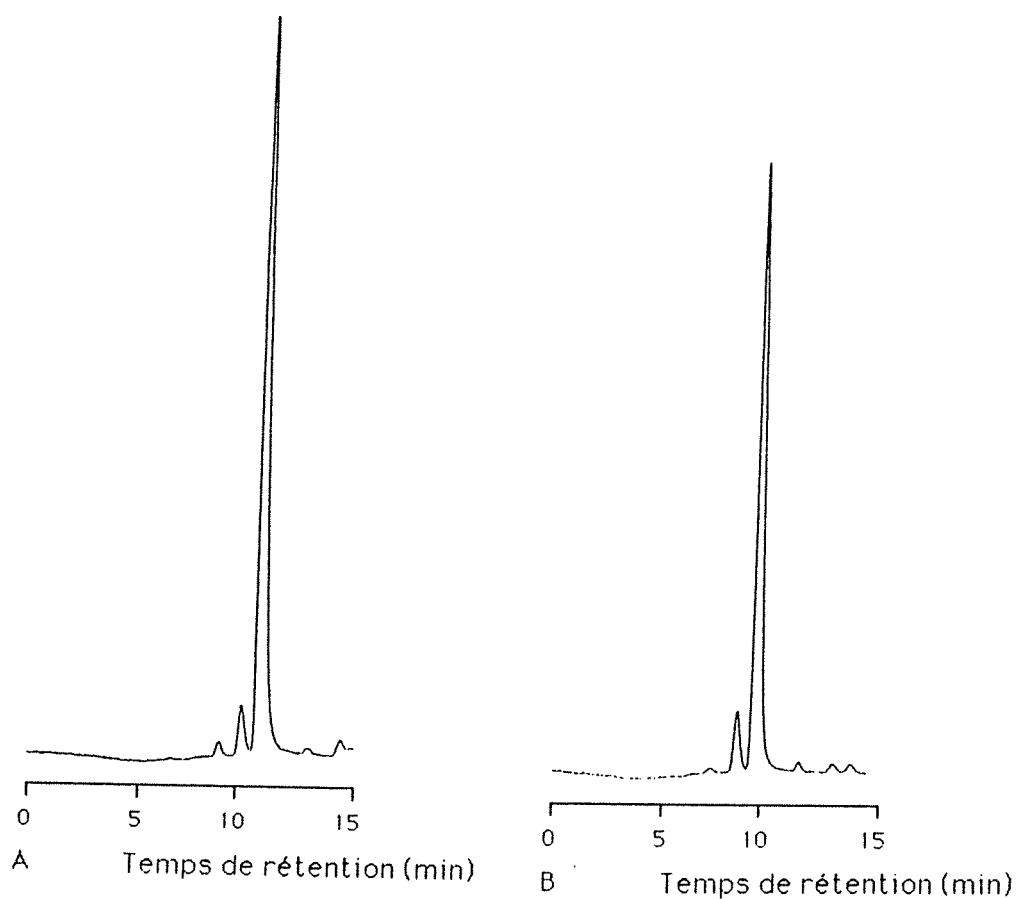


Figure 27 : Profils de pureté de la 5-(((2-aminoéthyl)thio)acétyl)amino fluorescéine synthétisée et commerciale

A : AEF synthétisée

B : AEF commerciale

Conditions chromatographiques :

- *phase stationnaire : LiChrospher 100 RP-18e 5 μ m*
- *phase mobile : gradient trifluoroacétate de triéthylamine (Eau bidistillée/triéthylamine 0,1% V/V, pH ajusté à 7,5 avec de l'acide trifluoroacétique) 100 % pendant 3 minutes puis passage à 100 % d'acétonitrile en 20 minutes*
- *débit : 1 ml/min*
- *détection à 490 nm*

La détermination de l'absorbance molaire (ϵ) de l'AEF est faite sur différentes solutions de marqueur. Ces mesures permettent de s'assurer de la linéarité de l'absorbance de l'AEF pour un domaine de concentration donnée.

La moyenne des absorbances molaires est de **67690 M⁻¹.cm⁻¹** (CV = 1%). La droite de régression exprimant la concentration en $\mu\text{g/ml}$ en fonction de l'absorbance de la solution a pour équation : $Y = 0,138 X - 0,001$ avec un coefficient de corrélation $r = 0,9999$.

Des mesures d'absorbance du marqueur en solution à + 5 °C ne montrent pas de variation au bout de 6 mois de conservation : la molécule d'AEF est totalement stable pour des conditions de conservation classiques des réactifs d'une trousse d'immunodosage (tableau XIII)

TABLEAU XIII
EVOLUTION DE L'ABSORBANCE DU MARQUEUR EN SOLUTION

	10 $\mu\text{g/ml}$	5 $\mu\text{g/ml}$	1 $\mu\text{g/ml}$	0,5 $\mu\text{g/ml}$	0,1 $\mu\text{g/ml}$
0	1,380	0,697	0,141	0,069	0,014
0,5 mois	1,375	0,695	0,138	0,071	0,017
1 mois	1,377	0,686	0,134	0,065	0,011
3 mois	1,409	0,696	0,139	0,070	0,015
5 mois	1,389	0,698	0,131	0,071	0,012
6 mois	1,387	0,693	0,129	0,069	0,010
moyenne (CV %)	1,386 (0,9)	0,694 (0,6)	0,135 (3,5)	0,069 (3,2)	0,013 (20)

Un problème important, influant fortement sur les rendements de dérivation, est le choix du solvant de la réaction. La dérivation doit se faire dans un solvant non aqueux afin d'éviter de multiples réactions parasites. Une comparaison entre les solvants utilisés en amidification (Lingeman, 1986) et la solubilité de l'AEF dans les solvants non aqueux est représentée sur le tableau XIV.

TABLEAU XIV
RECHERCHE D'UN SOLVANT POUR LA DERIVATION D'UN ACIDE
CARBOXYLIQUE PAR LA 5-(((2-AMINOETHYL)THIO)ACETYL)AMINO)
FLUORESCINE

Solvant	Estimation du rendement (Lingeman, 1986)	Solubilité de l'AEF
Acétonitrile	+	-
Méthyl éthyl cétone	+	-
Chloroforme	+/-	-
Dichlorométhane	+	-
Diéthyl éther	-	-
N,N Diméthylformamide	+	+
Hexane	+/-	-
Méthanol	-	+/-
Toluène	+/-	-

+ : réaction quantitative + : soluble
 +/- : réaction partielle +/- : moyennement soluble
 - : pas de réaction - : pas soluble

Le marqueur n'est soluble que dans le DMF. Ce solvant est favorable à la réaction de dérivation mais il peut générer de fortes réactions parasites. Cependant devant l'impossibilité de faire un autre choix, toutes les optimisations de dérivation ont été faites dans ce solvant.

II.2. Etude des différents systèmes de catalyse

L'amidification est une réaction complexe à partir du moment où la fonction acide ne peut être modifiée pour former un intermédiaire isolé tel un chlorure d'acide. Ne pouvant disposer que de faibles quantités d'éicosanoïdes, l'emploi d'agents d'activation est une alternative possible

pour la réaction de couplage. Les différents systèmes étudiés dans la partie bibliographique sont adaptés pour la dérivation d'acides gras modèles.

Après déprotonation de l'acide par une base organique telle que la triéthylamine, l'attaque nucléophile de l'acide sur le catalyseur peut se produire pour former dans des conditions douces un ester réactif qui n'est pas isolé. L'agent acylant obtenu peut réagir avec la fonction amine primaire de l'AEF pour donner l'amide correspondant.

La figure 28 présente les valeurs des rendements de dérivation obtenus après 24 heures à 20 °C en présence de différents catalyseurs :

- l'iodure de bromométhyl pyridinium (BMPI)
- le benzotriazolyl-N-tris(diméthylamino)phosphonium hexafluorophosphate (BOP)
- un mélange d'un carbodiimide et de N-hydroxysuccinimide (EDC, HCl-NHS)
- un mélange d'un carbodiimide et de 1-hydroxybenzotriazole (EDC, HCl-HOBT)

La représentation de la figure 28 exprime en pourcentage l'aire du pic de dérivé formé par rapport à l'aire totale de l'AEF. Ceci ne reflète pas la valeur exacte du rendement mais constitue une estimation. La fluorescéine résiduelle ainsi que ses produits de dégradation présentent une forte affinité pour la silice et ne sont pas totalement chromatographiés.

Le système utilisant le DEPC n'est pas représenté du fait de la non reproductibilité des résultats : un dérivé n'est pas systématiquement visualisé tant par CLHP que par CCM. Une amélioration du système n'a pas été recherchée du fait de la toxicité du DEPC.

La catalyse utilisant le BMPI ne permet pas d'obtenir un dérivé dans les conditions opératoires appliquées. Le BOP, utilisé plus généralement dans la synthèse peptidique, permet d'obtenir un dérivé mais les rendements sont restés faibles (< 20%).

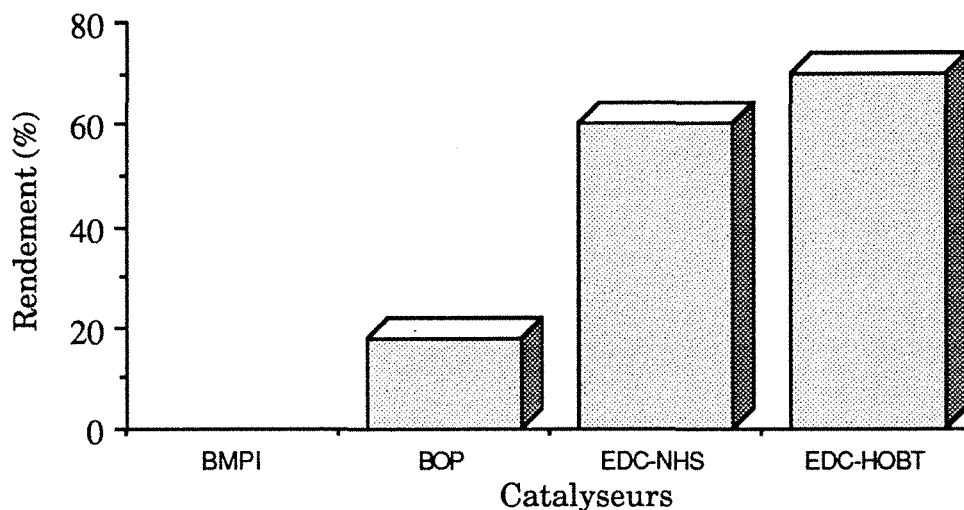


Figure 28: Rendements de dérivation de l'acide palmitique par la 5-(((2-aminoéthyl)thio)acétyl)amino) fluorescéine en fonction du système de catalyse (moyenne de deux expériences reproductibles)

Activation de l'acide 10 minutes à 20°C

Réaction avec l'AEF 24 h à 20°C

Le rendement de la réaction est augmenté lorsque le carbodiimide est utilisé en commun avec un second agent activateur tel que le NHS ou l'HOBT. L'HOBT est favorable à la réaction, car il supprime les réactions de racémisation (Bosshard et coll., 1973).

Le mélange EDC, HCl-HOBT sera choisi comme système de catalyse pour la suite des études qui consiste en une optimisation de la durée d'incubation et de la température d'activation de l'acide.

II.3. Optimisation de la réaction d'amidification

II.3.1. Optimisation de la phase d'activation par le mélange de catalyseurs

L'importance de l'étape d'activation intermédiaire de l'acide palmitique est vérifiée en faisant varier le temps de pré-incubation de 0 à 60 minutes à 37°C. Le rendement est estimé au bout de 4 et 7 heures après l'addition du marqueur (AEF).

Les résultats, représentés sur la figure 29, reflètent l'intérêt primordial de cette étape. Une activation supérieure à 20 minutes n'influe plus sur le rendement. L'évolution est similaire pour les deux temps de réaction. Lorsque cette étape est supprimée, le rendement chute de façon significative quel que soit le temps de réaction étudié.

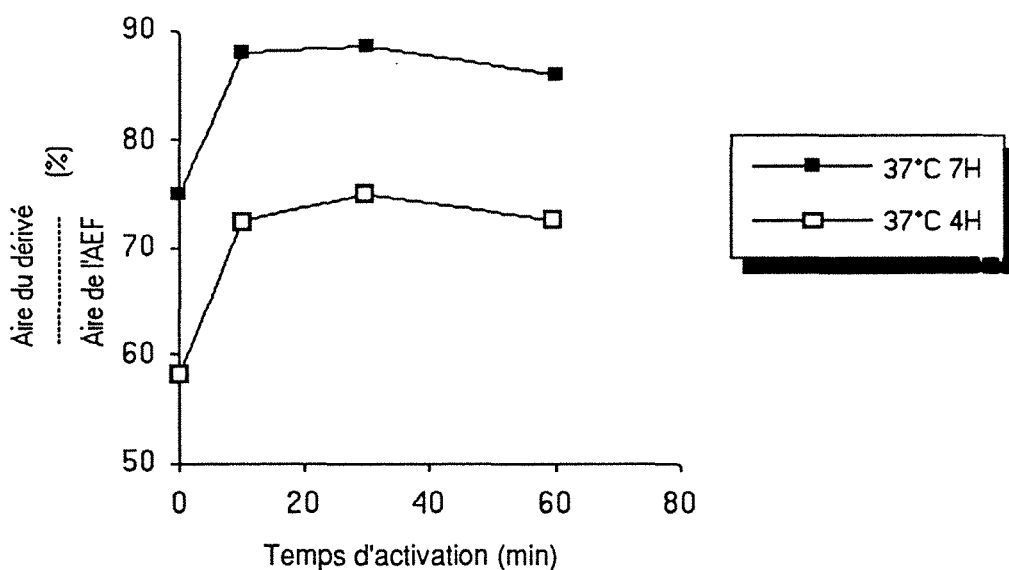


Figure 29 : Importance de l'étape d'activation de l'acide palmitique et des catalyseurs (moyenne de deux expériences)

Une activation de 20 minutes au moins sera appliquée dans la suite des études. Cette durée est à réadapter pour une température d'incubation inférieure, la cinétique de formation du dérivé étant alors modifiée.

II.3.2. Optimisation de la durée et de la température d'amidification

L'optimisation de ces paramètres est nécessaire afin que la dérivation n'entraîne pas de dégradation des biomolécules lors de leur marquage. La température maximale choisie est de 37 °C : cette température ne risque pas d'occasionner une modification importante du TxB₂ néfaste au rendement d'obtention du traceur. La réaction est menée en parallèle à 20 °C et à 5 °C (figure 30).

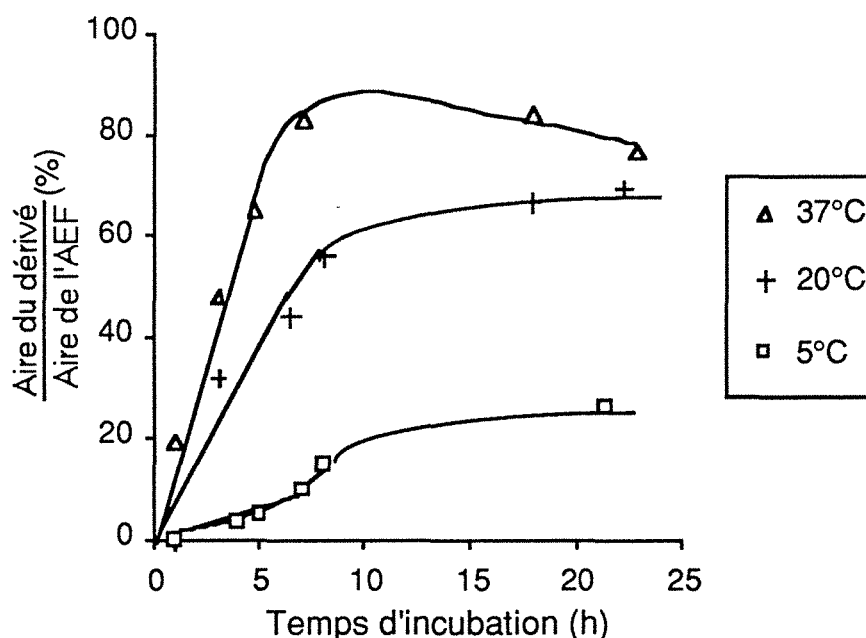


Figure 30 : Optimisation de la température et du temps d'amidification
(moyenne de deux expériences reproductibles)

L'augmentation de la température permet d'améliorer le rendement ainsi que la vitesse de formation du dérivé. Un rendement intéressant est obtenu à 20 °C au bout de 10 heures. A 37 °C, celui-ci est maximum au bout de 7 heures, alors que le rendement reste très bas à 5 °C (inférieur à 20 %).

Une température supérieure à 37 °C pourrait diminuer le temps de réaction, mais altérerait également les biomolécules. Elle n'a donc pas été envisagée. Une faible dégradation du traceur est constatée lors de l'incubation à 37 °C à partir de 10 heures de réaction.

II.3.3. Résultats obtenus après optimisation

Afin de vérifier l'optimisation de la réaction, l'amidification est réalisée également sur l'acide stéarique. Après une étape d'activation de 20 minutes à 37°C, le marqueur est ajouté. Une analyse en CLHP est effectuée au bout de 24 heures. Les résultats obtenus sont représentés sur la figure 31.

L'acide stéarique comportant deux carbones supplémentaires par rapport à l'acide palmitique, la séparation sur phase stationnaire apolaire doit donner un temps de rétention plus long que dans le cas de l'acide palmitique.

Les chromatogrammes obtenus montrent une disparition quasi complète du marqueur en faveur de la formation du dérivé correspondant. Le pic de l'acide palmitique dérivé est à 16,5 min, celui du dérivé de l'acide stéarique est à 20 minutes alors que dans le blanc la totalité de l'AEF est présente à 13 min. Cette différence de temps de rétention ainsi que l'absence de pics supplémentaires dans le blanc confirment la quantitativité et la sélectivité de la réaction d'amidification.

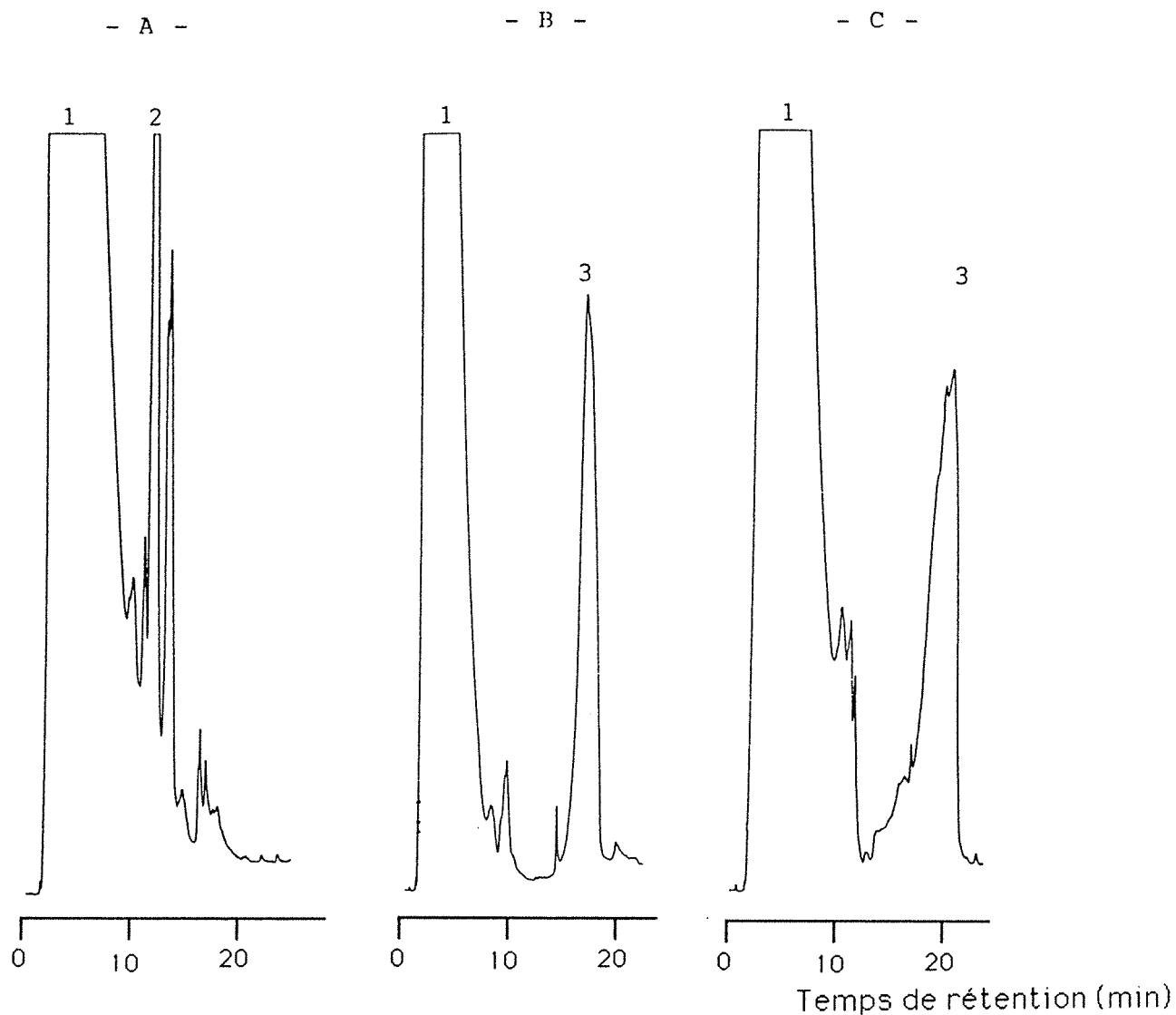


Figure 31 : Chromatogrammes des dérivés des acides palmitique et stéarique par la 5-(((2-aminoéthyl)thio)acétyl)amino) fluorescéine

A : blanc

B : dérivation de l'acide palmitique

C : dérivation de l'acide stéarique

1 : DMF et réactifs

2 : AEF

3 : dérivé

Conditions chromatographiques :

- phase stationnaire : LiChrospher 100 RP-18e 5 μ m

- phase mobile : gradient eau / acétonitrile (0 à 5 min, 100 % eau; 5 à 25 min 100 % acétonitrile)

- débit : 1 ml/min

- détection à 220 nm

III. DÉRIVATION DES ÉICOSANOÏDES

III.1. Purification des dérivés

III.1.1. Etude d'un composé modèle : la PGE₁

III.1.1.1. Importance du modèle prostaglandine E₁

Après l'optimisation des conditions de dérivation sur des acides gras de polarité comparable au TxB₂, il est apparu important d'évaluer les potentialités de dérivation de la fonction carboxyle d'une molécule apparentée. Le choix s'est porté sur une prostaglandine de la première série, la PGE₁. Tout comme le TxB₂, elle possède une fonction carboxyle. Mais son coût moindre, la disponibilité d'antisérums commercialisés pour effectuer une analyse en polarisation de fluorescence ainsi que sa bonne stabilité en comparaison avec celle du TxB₂ en font un composé d'étude intéressant.

Les prostaglandines correspondant à la dégradation de la PGE₁ par réaction de déshydratation sont la PGA₁ et la PGB₁. La formation de ces produits est principalement observable suite à l'action d'un enzyme (la déhydrase) lors de la production d'anticorps par immunisation.

Une dégradation lors du couplage à la protéine porteuse est relevée par Dray (Dray et coll., 1982) mais d'une manière insignifiante, les courbes de dosage restant totalement superposables d'après l'auteur.

La PGE₁ est une biomolécule qui présente toutes les caractéristiques intéressantes pour une modélisation des différentes étapes intervenant dans la conception d'un immunodosage d'éicosanoïde.

III.1.1.2. Purification du traceur

La visualisation de la formation du dérivé est effectuée en CCM en effectuant un dépôt du blanc réactif, un dépôt de l'acide palmitique dérivé et un dépôt de la PGE₁ dérivée. Un mélange du blanc et du dérivé PGE₁ est systématiquement adjoint sur la même plaque de CCM en tant que témoin de migration. Ceci permet d'éviter des erreurs d'interprétation liées au mode de séparation.

Les rendements de dérivation déterminés par CLHP sont plus faibles que pour les acide gras (rendement d'environ 30 %). Il semble donc que la fonction carboxyle soit moins réactive ou qu'il y ait un processus de dégradation de la biomolécule. Le rendement reste cependant intéressant : la mise au point d'un immunodosage ne nécessitant pas de grandes quantités de traceur.

Le choix de la CCM comme mode de purification s'est fait sur un critère de facilité et de rapidité : une grande quantité du milieu réactionnel peut être purifiée en même temps. La totalité du volume (0,6 ml) peut être traitée en 4 heures depuis les étapes de dépôt, de migration, d'extraction du traceur par l'éthanol, de quantification puis de fractionnement, de l'élimination du solvant sous azote jusqu'à la mise en conservation à - 20°C. Cette méthode permet de s'affranchir de la présence du solvant du milieu réactionnel peu volatil (DMF). Elle limite le temps d'exposition du traceur à l'oxydation et à la lumière.

La séparation du traceur de l'excès de réactif en CCM laisse apparaître trois taches à des rapports frontaux (Rf) distincts :

- à Rf 0 se trouve le marqueur AEF en excès qui ne migre pas dans ce système chromatographique (hexane/ethanol 50:50, V/V)
- à Rf 0,84 se trouve une impureté du marqueur
- à Rf 0,91 est situé le dérivé PGE₁ - AEF.

Le dérivé de l'acide palmitique apparaît à un Rf de 0,98.

III.1.1.3. Contrôle de la pureté par CLHP

La vérification de la pureté se fait par CLHP en recherchant la présence de contaminants dans le traceur. Un profil type obtenu est présenté sur la figure 32. Celui-ci montre la présence de fluorescéine résiduelle. Cependant le pic correspondant au dérivé PGE₁ - AEF représente généralement 90 à 95 % de la surface totale des pics obtenus. Il n'est pas nécessaire d'effectuer d'autres étapes de purification pour une application dans un immunodosage par polarisation de fluorescence, celle ci étant suffisante.

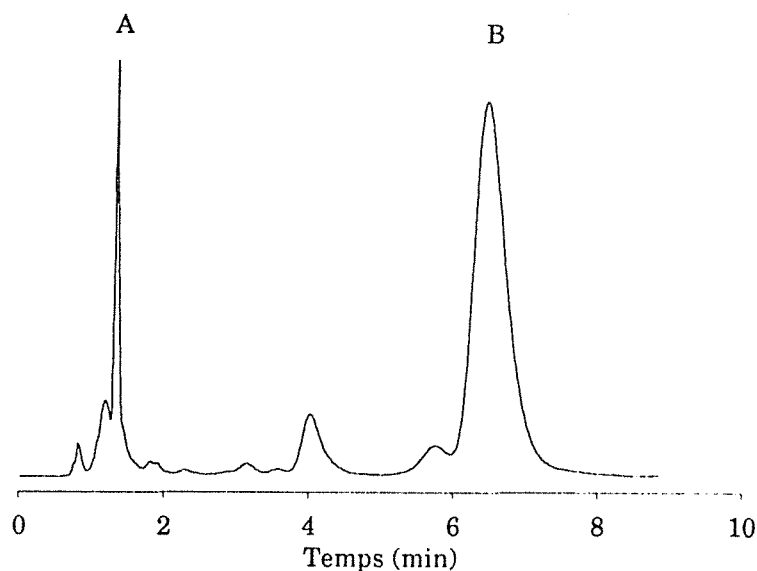


Figure 32 : Contrôle par CLHP du dérivé PGE₁ - AEF après purification par CCM

A : fluorescéine résiduelle

B : PGE₁ - AEF

Conditions chromatographiques :

- phase stationnaire : LiChrospher 100 RP-18e 5 μ m
- phase mobile : mélange d'acétate de triéthylamine (eau bidistillée/triéthylamine 0,1% V/V, pH ajusté à 7,5 avec de l'acide trifluoroacétique) et d'acétonitrile (75 : 25, V/V)
- débit : 1 ml/min
- détection à 490 nm.

Toutefois, les analyses spectrales ont été faites sur des fractions purifiées par CLHP. Les fractions correspondant à la PGE₁ - AEF sont récupérées, évaporées à sec sous azote puis reconstituées dans le solvant approprié à la mesure. Ceci permet de s'assurer de la représentativité des résultats qui pourraient être entachés par la présence de contaminants de fluorescéine.

III.1.2. Le thromboxane B₂

La dérivation du TxB₂ et la purification du traceur sont faites dans les mêmes conditions que pour la PGE₁. La migration sur CCM du milieu de

dérivation présente également trois taches correspondant au marqueur, à son impureté et au dérivé TxB₂ - AEF.

La troisième tache, présente uniquement lors de la dérivation du TxB₂, à un R_f = 0,95 est extraite.

Une analyse par CLHP est également faite afin de contrôler la pureté des lots (figure 33).

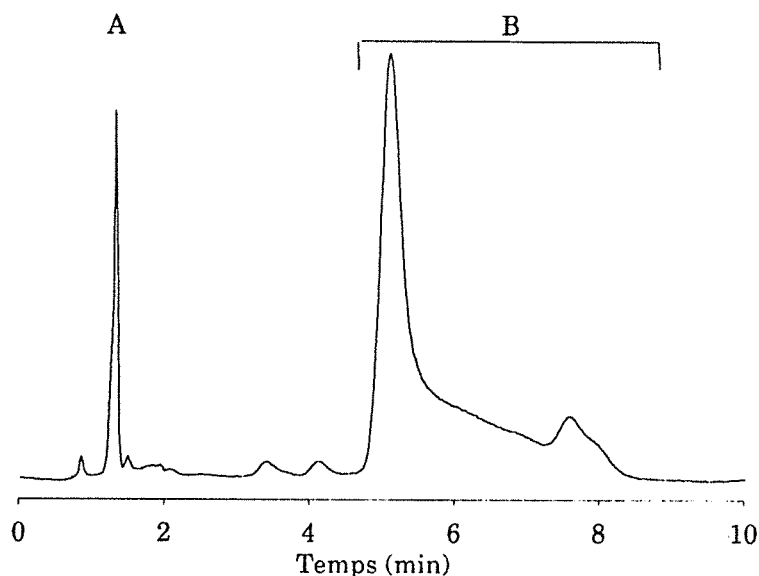


Figure 33 : Contrôle par CLHP du dérivé TxB₂ - AEF après purification par CCM

A : fluorescéine résiduelle

B : TxB₂ - AEF

Conditions chromatographiques :

- *phase stationnaire : LiChrospher 100 RP-18e 5μm*
- *phase mobile : mélange d'acétate de triéthylamine (eau bidistillée/triéthylamine 0,1% V/V, pH ajusté à 7,5 avec de l'acide trifluoroacétique) et d'acétonitrile (75 : 25, V/V)*
- *débit : 1 ml/min*
- *détection à 490 nm.*

Le tracé du chromatogramme présente la particularité de montrer le dédoublement du pic de TxB₂ - AEF. Ceci correspond à la présence des deux formes isomères ouverte et fermée de la structure semi-acétalique du TxB₂. Comme dans les précédents travaux (Ben Gueddour, 1987), il est possible de

mettre en évidence l'équilibre formé entre ces deux structures : une analyse par CLHP après récupération du pic majoritaire génère deux pics.

La purification par CCM est meilleure pour le TxB₂ que pour la PGE₁. La pureté du dérivé est généralement supérieure à 95 % en raison de la meilleure séparation obtenue entre l'amide (R_f 0,95) et l'impureté située à un R_f de 0,84.

Les conditions expérimentales de dérivation permettent l'obtention de dérivés fluorescents de la PGE₁ et du TxB₂. La présence d'une tache unique supplémentaire par rapport au blanc témoin en CCM, la présence d'une faible quantité d'impuretés visualisée par CLHP sont des critères importants dans l'obtention de réactifs utilisables en polarisation de fluorescence. Il est nécessaire à présent de définir leurs propriétés spectrales.

**Les conditions expérimentales choisies pour la dérivation
des éicosanoïdes sont :**

- éicosanoïde (2,8.10⁻⁶ mole, 1mg), EDC, HCl (4.10⁻⁶ mole), HOBT (3.10⁻⁶ mole), triéthylamine (10 µl) dans 0,3 ml de DMF incubés 2 heures à 25 °C
- 300 µl d'une solution de AEF dans le DMF (1,1.10⁻⁴ M) sont ajoutés, incubation pendant 24 heures à 25 °C

III.2. Propriétés spectrales du marqueur et des traceurs

Pour vérifier l'influence de l'étape de dérivation sur les propriétés spectrales de la fluorescéine, le comportement des traceurs en comparaison avec le marqueur AEF est étudié. Les mesures sont effectuées sur le marqueur et sur les dérivés des éicosanoïdes purifiés par CLHP en comparaison avec la fluorescéine dont les caractéristiques spectrales de cette molécule étant bien connues (Diehl et Markuszewski, 1989).

II.2.1. Détermination des longueurs d'onde maximales d'excitation et d'émission

Les spectres d'excitation et d'émission des différentes molécules sont représentés sur la figure 34.

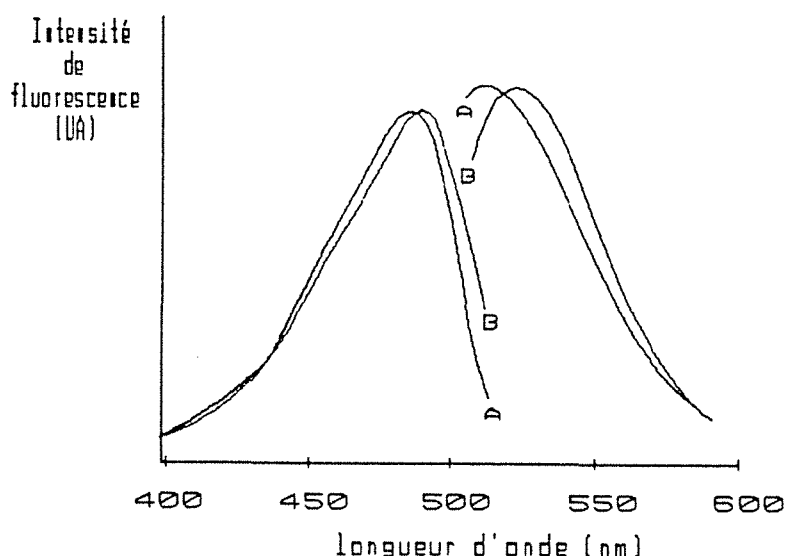


Figure 34 : Spectres d'excitation et d'émission normalisés des marqueurs et des dérivés fluorescents

A : marqueurs (fluorescéine, AEF)

B : traceurs (PGE_1 - AEF, TxB_2 - AEF)

L'étude des caractéristiques spectrales regroupées dans le tableau XV montre que la modification de la structure initiale de la fluorescéine n'est pas sans conséquence sur ses propriétés photophysiques. Cette observation est en accord avec les études faites par Munkholm et coll. (1990) portant sur l'inhibition de fluorescence de différents marqueurs issus de la fluorescéine. Une légère modification des longueurs d'ondes maximales est observée sans pour autant augmenter l'effet Stokes de façon intéressante.

Les variations minimales rencontrées lors de la détermination des longueurs d'ondes maximales d'absorption et d'émission de fluorescence n'influent pas dans un dosage par polarisation de fluorescence : une faible variation ne modifie pas la valeur d'anisotropie de fluorescence mais seulement l'intensité du signal.

TABLEAU XV
PROPRIETES SPECTRALES DES TRACEURS ET DU MARQUEUR

		λ_{exc} nm (1)	$\lambda_{ém}$ nm (1)	Effet Stokes nm	Rendement quantique (2)	Durée de vie (2)	Anisotropie de fluorescence (1)
Marqueur	Fluorescéine	487	510	23	0,85	4,50	0,030
Marqueur	FITC	490	520	30	0,76		
Marqueur	AEF	487	510	23	0,65	4,04	0,030
Traceur	PGE ₁ -AEF	490	516	26	0,55	4,01	0,077
Traceur	TxB ₂ -AEF	490	516	26	0,55	4,10	0,076
Traceur *	TxB ₂ - Mmc	330	410	80	0,31	3,9	0,045
Traceur *	TxB ₂ - 7-MMC	318	378	60	0,43	6,6	0,047
Traceur*	TxB ₂ - P	375	475	100	0,20	9,8	0,230

* *Ben Gueddour et Coll. (1993)*

(1) *tampon phosphate 0,1M à pH 7,5*

(2) *soude 0,1 N*

TxB₂ - Mmc : TxB₂ marqué par la 4-bromométhyl-7 methoxy coumarine

TxB₂ - 7-MMC : TxB₂ marqué par la chlorocarbonyl 7-méthoxy 4-méthyl coumarine

TxB₂ - P : TxB₂ marqué par le bromure de panacyle

III.2.2. Rendement quantique

Le rendement quantique du marqueur (tableau XV) présente une modification importante par rapport à celui de la fluorescéine : la modification de la structure de la fluorescéine entraîne une diminution

d'environ 25 %. Les mesures sont effectuées en milieu basique (NaOH 0,1 N) du fait de la valeur de référence de la fluorescéine, la variation du rendement reste identique pour un pH inférieur (Munkholm et coll., 1990).

Ces valeurs sont intéressantes par rapport aux rendements quantiques des marqueurs couramment utilisées en polarisation de fluorescence (FITC) ou d'autres traceurs obtenus à partir des structures coumariniques ou pyréniques synthétisées par Ben Gueddour (1987).

Ce gain va permettre d'abaisser la concentration minimale détectable en fluorescence et en polarisation de fluorescence.

III.2.3. Durée de vie et anisotropie de fluorescence

Les deux paramètres principaux intervenant dans la théorie et l'application de la polarisation de fluorescence sont :

- le déclin de fluorescence apparent
- la polarisation ou l'anisotropie de fluorescence.

Ces valeurs sont déterminées pour les deux traceurs (Tableau XV). Une comparaison avec les paramètres obtenus pour les marqueurs fait apparaître des variations suite à la modification de la molécule de fluorescéine.

La modification de la fluorescéine entraîne une diminution de la durée de vie de 4,5 ns à 4 ns (moyenne de 4 déterminations). Il pourrait y avoir un changement du processus de relaxation suite au greffage du "bras" porteur de la fonction amine. La variation simultanée du rendement quantique est en faveur de cette hypothèse. Le couplage du marqueur aux deux éicosanoïdes ne modifie plus ces valeurs, il n'y a pas modification de la résonance électronique de la fluorescéine.

Une augmentation du volume moléculaire de la fluorescéine par le greffage d'une molécule de masse molaire sensiblement égale est en faveur d'une augmentation de la valeur d'anisotropie. Une augmentation de 50 % de cette valeur est observable entre le marqueur et les traceurs. Il n'y a pas de différence entre la PGE₁ - AEF et le TxB₂ - AEF : la structure ainsi que la masse molaire de ces deux biomolécules sont proches.

IV. Stabilité du traceur TxB₂ - AEF

IV.1. Stabilité à sec

La stabilité du dérivé est suivie à - 70 °C, - 20 °C et à 37 °C, à l'abri de la lumière. L'analyse en CLHP à différents temps de conservation des lots conservés à - 70 °C et à - 20 °C ne présente pas de modification des profils chromatographiques au bout de 4 mois : la conservation à sec à ces deux températures est satisfaisante.

Par contre une perte de 10 % en traceur est observée pour une conservation à 37 °C au bout de 48 heures. La dégradation provient certainement d'une dénaturation de la molécule de TxB₂ : de nouveaux pics apparaissent sur les chromatogrammes à des temps de rétention inférieurs au TxB₂ - AEF.

IV.2. Stabilité en solution

La stabilité du traceur a été suivie par des mesures en CLHP et en polarisation de fluorescence afin de s'assurer de son évolution en solution.

Le suivi par CLHP de la concentration en traceur (figure 35) ne présente pas de variations significatives entre 1 h et 6 h à 25 °C. Ceci est corrélé par la faible libération du marqueur AEF.

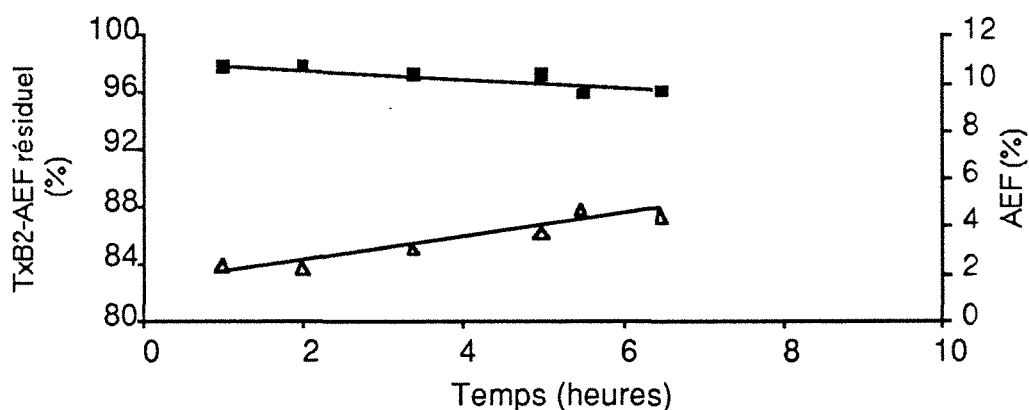


Figure 35: Stabilité à 25 °C du traceur en solution dans le tampon phosphate 0,01 M pH 7,4 (n = 2)

■ : évolution du pourcentage résiduel du traceur TxB₂ - AEF

Δ : évolution du pourcentage du marqueur AEF libre

Une stabilité de 6 heures à 25 °C est largement suffisante puisque, lors de l'immunodosage, les valeurs d'anisotropie ne varient plus au bout d'une heure.

La conservation à - 20 °C du traceur en solution après reconstitution en tampon phosphate/BSA est suivie par des mesures d'anisotropie de fluorescence : une baisse de la valeur est représentative de la dégradation du produit, c'est à dire de la libération de la molécule de fluorescéine. Les résultats obtenus sont représentés sur la figure 36. Il montre une stabilité d'une valeur d'anisotropie de fluorescence après 10 jours de conservation.

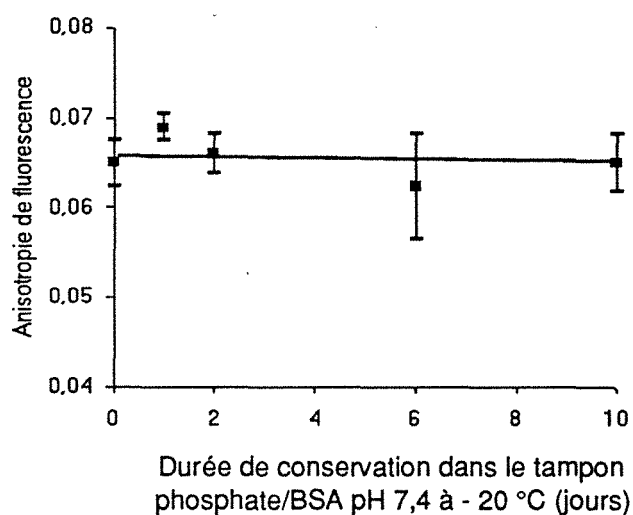


Figure 36 : Evolution de l'anisotropie de fluorescence en fonction de la durée de congélation dans le tampon phosphate/BSA (CV sur 6 déterminations)

Il ne semble pas y avoir de modification de la structure du traceur. Cependant il est nécessaire de fractionner la solution de traceur pour une congélation afin d'éviter des cycles répétés de congélation/décongélation comme le montre la figure 37. Une baisse importante de la valeur d'anisotropie est observable au bout du troisième cycle pour atteindre pratiquement l'anisotropie de l'AEF au bout du quatrième cycle.

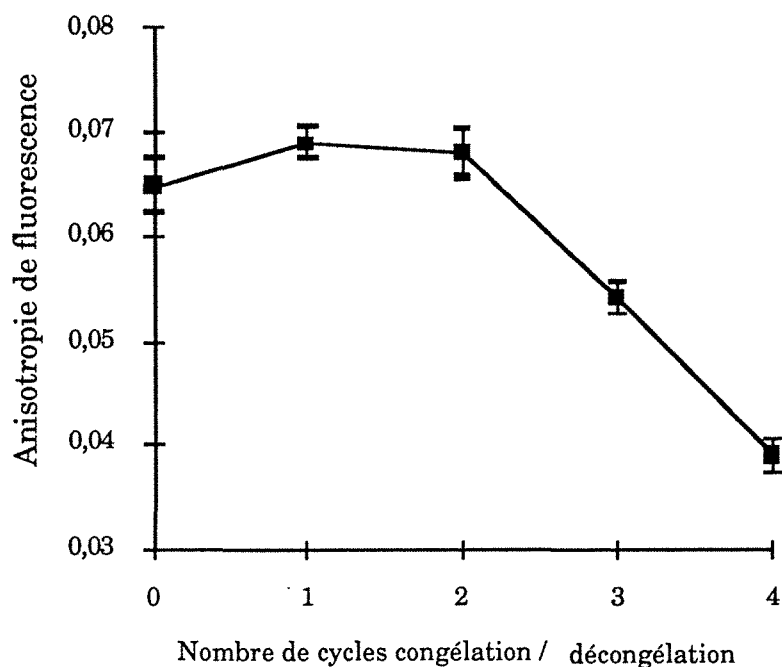


Figure 37 : Influence du cycle congélation/décongélation du traceur sur sa stabilité en solution (CV sur 6 déterminations)

V. Conclusions

Après le choix du marqueur fluorescent, la 5-((((2-aminoéthyl)thio)acétyl)amino) fluorescéine, un couplage par réaction d'amidification sous différentes conditions de catalyse montre l'aptitude de l'AEF pour la dérivation : la fonction amine primaire peut être impliquée dans une attaque nucléophile.

Le rendement de la réaction obtenu en employant un mélange de catalyseurs composé d'un carbodiimide et d'un inhibiteur des réactions de racémisation (EDC, HCl-HOBT) est intéressant. L'optimisation de la réaction conduit à

l'obtention d'un dérivé d'acide gras dans des conditions douces avec un rendement élevé, proche de 90 %.

Les conditions de dérivation ont permis d'appliquer directement le protocole à la dérivation des éicosanoïdes malgré la faible quantité entrant en jeu (mg). Les rendements de dérivation, bien que diminués (voisins de 30 %), restent suffisants. Un processus simple de purification par CCM permet d'obtenir en peu de temps une quantité de traceur suffisante pour des déterminations spectrales ou pour la mise au point d'un immunodosage.

Les caractéristiques spectrales montrent une diminution du rendement quantique des dérivés par rapport à celui du marqueur. Cependant les spécificités restent intéressantes par rapport aux autres marqueurs utilisés en polarisation de fluorescence.

Il n'a pas été possible de caractériser les dérivés obtenus (TxB₂ - AEF, PGE₁ - AEF) par des techniques structurales : la RMN et la spectroscopie infrarouge nécessitent une quantité importante de produits et la SM n'a pas donné de résultats concluants du fait de la fragilité des molécules.

Le traceur TxB₂ - AEF présente une stabilité intéressante à sec : il peut être conservé pendant au moins 4 mois à - 20 °C. En solution à + 20 °C, il ne montre pas de dégradation ni de variation d'anisotropie au bout de 6 heures, durée supérieure à celle de la réalisation d'un immunodosage. D'autre part, il peut être reconstitué en solution tampon et réutilisé ultérieurement à condition de le conserver à - 20 °C.

Une étude de reconnaissance par les anticorps de ces deux traceurs va permettre de confirmer l'intérêt qu'ils présentent pour le développement d'un immunodosage.

2ème Partie : Etude préliminaire : immunodosage par polarisation de fluorescence de la Prostaglandine E₁ (PGE₁)

Les précédentes études ont confirmé les aptitudes spectroscopiques des traceurs développés. Il va s'agir maintenant de définir les aptitudes "immunologiques" de ces dérivés. Cette partie s'articule sur les possibilités de reconnaissance par des anticorps anti-PGE₁ par le biais d'un dosage radioimmunologique, puis par une étude en polarisation de fluorescence. Cette étude, préliminaire à la mise au point du dosage du TxB₂, donne des informations sur les possibilités et les limites de la praticabilité de l'immunodosage et permettra d'optimiser certains paramètres du développement du dosage du TxB₂ par polarisation de fluorescence.

I. MATÉRIEL ET MÉTHODES

I.1. Vérification de l'immunoréactivité du traceur PGE₁ - AEF

I.1.1. Principe général

Le principe consiste à étudier le déplacement par compétition de la PGE₁ tritiée en présence d'une quantité limitée d'anticorps, soit par la PGE₁ non marquée, soit par le traceur fluorescent.

Plus la concentration en analyte (PGE₁ ou PGE₁ - AEF) sera élevée, plus le traceur tritié sera déplacé de sa liaison à l'anticorps.

La différence de structure des traceurs laisse présager une différence de comportement vis à vis de la reconnaissance par les anticorps. La comparaison des traceurs sera appréhendée par le calcul de la constante d'affinité et permettra de vérifier si le dérivé fluorescent présente toujours une affinité suffisante pour réaliser un immunodosage par polarisation de fluorescence.

I.1.2. Réactifs et mode opératoire

La trousse de dosage de la PGE₁ utilise un traceur tritié (Advanced Magnetix Inc., Cambridge, MA, USA).

Tous les réactifs sont stables pendant 3 mois à + 4 °C. La trousse comporte les produits suivants :

- **tampon phosphate 10 mM à pH 7**
contenant 0,1 % de gamma globulines
bovine et 0,1 % d'azide de sodium
- **PGE₁ tritiée** 40 Ci/mmole, 2 µCi sous forme
lyophilisée, reconstituée avec
10 ml de solution tampon
- **anticorps anti-PGE₁ de lapin** sous forme lyophilisée,
reconstitué dans 10 ml de tampon
- **solution de charbon-dextran sur support**
magnétique dans l'eau distillée en
présence de 0,1 % d'azide de sodium
- **étalon de PGE₁** 100 ng sous forme lyophilisée,
reconstitué dans 1 ml de tampon.

La gamme étalon est réalisée par une série de dilutions afin d'obtenir des concentrations en PGE₁ de 20 ng/ml, 6,7 ng/ml, 2,2 ng/ml, 0,74 ng/ml, 0,24 ng/ml et 0,08 ng/ml. Des solutions (dans le tampon de dilution de la trousse) de PGE₁ - AEF à 5 ng/ml, 2,5 ng/ml et 0,5 ng/ml ont été utilisées pour les essais.

Tous les réactifs sont équilibrés à température ambiante avant d'être utilisés.

Il est possible de séparer la fraction de PGE₁ ³H liée à l'anticorps de la fraction libre après addition de charbon-dextran grâce à une unité de séparation magnétique ou par centrifugation.

Afin d'éliminer tout risque de quenching dû à la fluorescéine lors du comptage de la radioactivité, des mesures de la radioactivité totale en présence du traceur aux mêmes concentrations que les essais sont effectuées.

Le protocole opératoire est résumé dans le tableau XVI.

TABLEAU XVI
PROTOCOLE OPERATOIRE DU DOSAGE RADIOIMMUNOLOGIQUE DE
LA PROSTAGLANDINE E₁ UTILISANT UN TRACEUR TRITIE

Tube	Radioactivité Totale (T)	Liaison non spécifique (LNS)	Etalon "0" (B ₀)	Etalons ou PGE ₁ -AEF
Tampon (μl)	900	200	100	-
PGE ₁ ³ H (μl)	100	100	100	100
PGE ₁ étalon ou fluorescent (μl)	-	-	-	100
Anticorps (μl)	-	-	100	100
Incuber 16 h à 4 °C				
Charbon- Dextran (μl)	-	750	750	750
- Mélanger au vortex. Centrifuger à 1000 g pendant 10 min à 4 °C - Prélèver 525 μl de surnageant dans les tubes à scintillation sauf pour le tube contenant la radioactivité totale (500 μl) - Ajouter 5 ml de liquide de scintillation (Ready Safe, Beckman) - Compter la radioactivité dans un compteur à scintillation liquide Beckman (Gagny, France) jusqu'à accumulation de 10000 coups ou pendant 10 minutes selon l'échantillon				

I.1.3. Expression des résultats

La représentation traditionnelle des résultats exprime le pourcentage de liaison normalisé B/B₀ du traceur tritié en fonction de la concentration en étalon ou en traceur fluorescent.

Les calculs sont effectués à partir de la relation suivante :

$$\frac{B}{B_0} = \frac{\text{cpm essai} - \text{cpm "LNS"}}{\text{cpm étalon "0"} - \text{cpm "LNS"}}$$

Il est cependant intéressant de prévoir par le calcul les caractéristiques d'un dosage à partir de certaines conditions expérimentales. La représentation de Scatchard (Cohen et Bizollon, 1993) permet de déterminer la constante d'affinité K_a ainsi que la concentration d'une catégorie de sites de liaison de l'anticorps $[Ac]_0$. Celle-ci envisage la variation du rapport de la fraction d'antigène liée à l'anticorps à celle de la fraction libre $[B/F]$ en fonction de la concentration molaire en antigène lié $[B]$. La représentation de Scatchard correspond à une équation de droite dont la pente correspond à K_a et l'abscisse à l'origine $[Ac]_0$:

$$\frac{B}{F} = K_a [Ac]_0 - K_a B \quad (5)$$

Il est nécessaire de calculer la fraction libre et liée en Ag. Elle est obtenue à partir de la concentration totale en Ag dans le milieu réactionnel et correspond à la somme des concentrations en Ag marqué et non marqué. La concentration en Ag non marqué est dépendante des solutions étalons utilisées.

La concentration en Ag marqué est calculée à partir de l'activité spécifique de l'antigène marqué, de l'activité totale T introduite dans tous les tubes, de la liaison non spécifique et du volume du milieu d'incubation.

Dans le cas d'un traceur tritié, l'utilisation d'un liquide de scintillation diminue l'efficacité du comptage. Ce paramètre doit être pris en compte pour le calcul des concentrations de B et F (efficacité de 0,4 pour cette étude).

La concentration totale en antigène marqué est :

$$\frac{T - \text{LNS}}{As.3,7.10^{10}.60.0,4.V.10^{-3}}$$

As est l'activité spécifique (en Ci/mol) et V le volume d'incubation (en ml).

La concentration B en Ag lié est déterminée à partir de la concentration totale en Ag et du pourcentage de radioactivité spécifiquement lié $\frac{b - \text{LNS}}{T - \text{LNS}}$, b représente la radioactivité de l'étalon ou de l'essai.

F correspond à la différence entre la concentration totale en Ag et la fraction liée B.

La dispersion des points obtenus expérimentalement peut modifier la position de la droite tracée et les estimations de Ka et de [Ac]₀ obtenues par cette méthode ne sont, par conséquent, que des approximations.

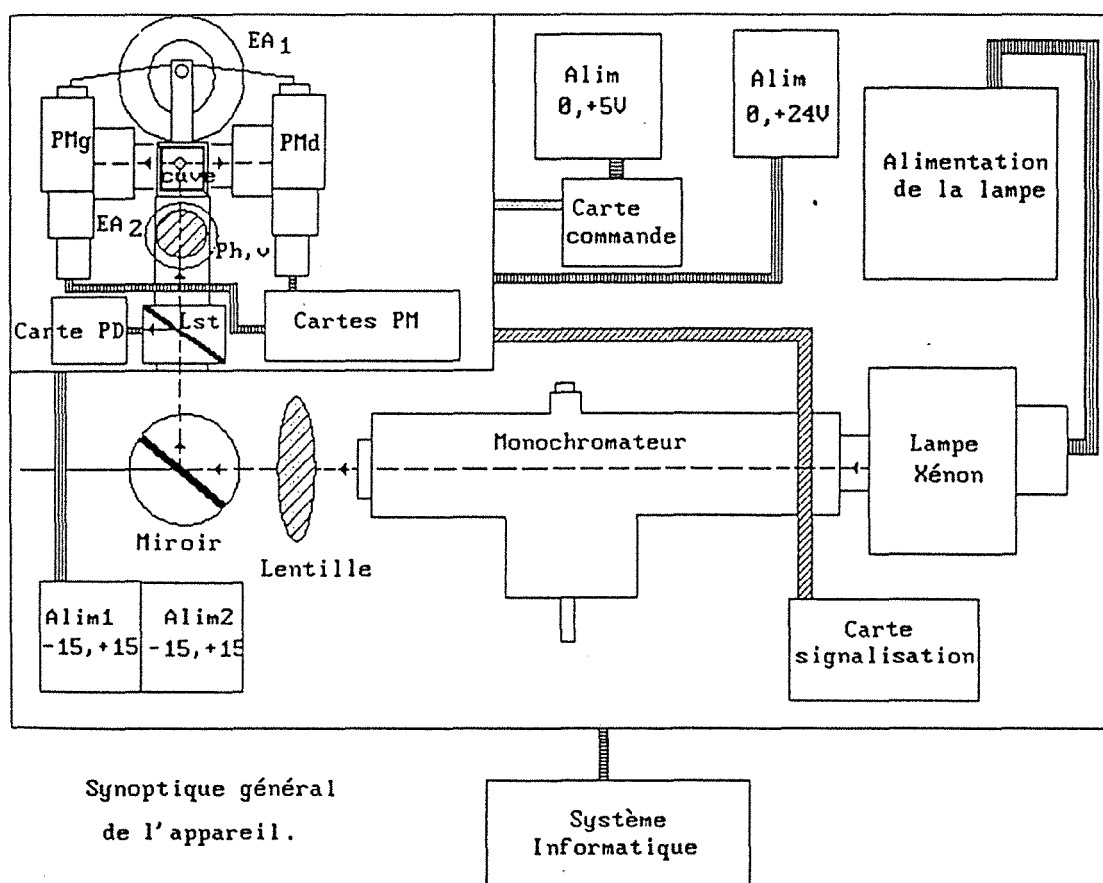
I.2. Etude du dosage par polarisation de fluorescence

I.2.1. Description de l'appareillage

Les études concernant la PGE₁ ont été effectuées sur le premier prototype de fluopolarimètre de l'unité INSERM 284 de Nancy (Sadik, 1992).

La figure 38 représente le synoptique général de l'appareil.

La lumière excitatrice issue de la lampe Xénon traverse un monochromateur qui sélectionne une radiation de longueur d'onde fixe. Celle-ci passe à travers un système de lentilles pour être focalisée sur le miroir. Le rayonnement est ensuite polarisé par l'un des deux polariseurs d'excitation (horizontal, vertical) avant d'atteindre la cuve contenant la solution étudiée. Après avoir traversé un système optique (lentilles, filtre et polariseur), la fluorescence émise est captée par deux photomultiplicateurs placés de part et d'autre du porte cuve à 90° par rapport à l'excitation. Les signaux générés par les photomultiplicateurs sont traités par des cartes électroniques puis sont renvoyés vers le système informatique qui assure le traitement numérique.



- EA1(2) : Electro-Aimant 1 (2);
 PMg(d) : Photomultiplicateurs gauche (droite);
 Ph,v : Polariseur horizontal, vertical;
 Lst : Lame Semi-Transparente;
 Alim : Alimentation.

Figure 38 : Schéma technique du fluopolarimètre

I.2.2. Principe des mesures

Les mesures sont effectuées à la longueur d'onde maximale d'excitation de l'AEF (490 nm), un filtre à bande passante (520 nm) est utilisé à l'émission. La cellule de lecture est thermostatée à 25 °C. Les mesures d'anisotropie sont réalisées dans des cuves en polyacryle à usage unique 10 mm x 10 mm x 45 mm (Sarstedt, Molsheim, France). Lorsqu'une étape d'incubation est nécessaire, elle est effectuée directement dans les cuves protégées de la lumière par du papier aluminium.

Le protocole de mesure est le suivant : après la mise en place de la solution fluorescente au niveau du porte cuve, l'appareil adapte le gain d'amplification des photomultiplicateurs et calcule un facteur correctif G qui pallie les différences électroniques de ceux-ci et des deux circuits de mesure. L'appareil demande ensuite la mise en place du "blanc" contenant tous les réactifs sauf la solution fluorescente pour éliminer tout artéfact de lumière parasite.

Le facteur G est défini par : $G = \frac{I_{hv}}{I_{hh}}$

I_{hh} (ou $I_{//}$) : intensité de fluorescence émise horizontalement pour l'excitation horizontale

I_{hv} (ou $I_{\perp}$) : intensité émise verticalement pour l'excitation horizontale.

L'appareil calcule ensuite les valeurs d'anisotropie statique $\langle r \rangle$ en tenant compte des intensités de fluorescence de la solution fluorescente et du blanc. L'équation théorique de l'expression de $\langle r \rangle = \frac{I_{vv} - I_{vh}}{I_{vv} + 2 I_{vh}}$ devient alors :

$$\langle r \rangle = \frac{(I_{vvc} - I_{vvc}^0) - G (I_{vhc} - I_{vhc}^0)}{(I_{vvc} - I_{vvc}^0) + 2 G (I_{vhc} - I_{vhc}^0)}$$

avec pour convention : $I_{vvc} = vv/vL$ $I_{vvc}^0 = vv_0/vL_0$
 $I_{vhc} = vh/vL$ et $I_{vhc}^0 = vh_0/vL_0$

Où pour une excitation verticale en présence de solution marquée :

vv : acquisition relative à l'émission verticale

vh : acquisition relative à l'émission horizontale

vL : acquisition relative à l'émission de la lampe

et vv_0 , vh_0 et vL_0 sont les acquisitions en présence de la solution non marquée.

Avant chaque série de mesures, il est nécessaire d'effectuer un étalonnage de l'appareil : la mesure d'un point correspond à la détermination des paramètres correcteurs, puis à la série de mesures demandées durant le temps imposé (de 5 à 20 secondes). L'appareil effectue un certain nombre de

lectures en fonction de la durée choisie, le résultat final d'anisotropie correspondant à la moyenne de ces lectures.

Il est possible entre chaque point de conserver ou non la valeur du gain et de l'intensité du "blanc". En conservant ces paramètres, les variations sur les mesures dues aux artéfacts de l'appareil sont diminuées, mais ce n'est cependant pas représentatif des conditions normales de mesures lors d'un immunodosage. Pour des raisons de variabilité de la valeur d'anisotropie liées à l'appareillage, les résultats de ces études peuvent être exprimés en anisotropie de fluorescence pour des résultats obtenus le même jour et en variation d'anisotropie ($r_{\text{essai}} - r_{\text{témoin}}$) ou pourcentage de diminution d'anisotropie $\frac{(r_{\text{essai}} - r_{\text{témoin}})}{(r_{\text{point 0 ng}} - r_{\text{témoin}})}$ pour des résultats obtenus sur plusieurs jours.

I.2.3. Détermination de la concentration minimale de PGE₁-AEF

Les études en polarisation de fluorescence sont faites dans du tampon phosphate (0,1 M pH 7,2) salin (NaCl 0,4 M) contenant 0,1 % de sérum albumine bovine (tampon PBS/BSA).

Pour que le domaine de concentration de la PGE₁ soit le plus bas possible, il faut également que la concentration en antigène fluorescent en compétition avec l'antigène non marqué soit la plus faible possible, tout en conservant une valeur d'anisotropie de fluorescence reproductible. Des séries de dilution du traceur sont effectuées dans le tampon PBS/BSA tant que l'intensité de fluorescence du blanc n'est pas égale à 30 % de l'intensité de la solution de PGE₁-AEF. Cette valeur est déjà très importante étant donné que l'ajout de protéines, en l'occurrence d'anticorps, augmente la diffusion de la lumière lors du dosage.

Cette étude va permettre de déterminer la concentration en traceur qui peut être utilisée pour le dosage. Par la suite il a été choisi de travailler dans des conditions "extrêmes" de façon à s'approcher au maximum de la plus petite concentration en PGE₁ mesurable.

I.2.4. Détermination de la concentration en anticorps

L'antisérum de mouton anti-PGE₁ lyophilisé provient de ERIA Diagnostics Pasteur (Marnes la Coquette, France).

Les paramètres de liaison fournis par la société sont :

- B₀ : 0,1 ml d'un flacon reconstitué à 11 ml lient 50 % de 42 pg de PGE₁ tritié ayant une activité spécifique de 58,1 Ci/mmele.
- IC₅₀ (concentration donnant 50 % d'inhibition) : 24 pg/tube
- constante d'affinité : K_a = 1,9.10¹⁰ M⁻¹
- spécificité : réactions croisées (%) pour B/B₀ = 0,5

Prostaglandines :

A₁	0,1	A₂	0,1
B₁	0,1	B₂	0,1
D₁	0,1	D₂	0,1
E₁	100,0	E₂	15,0
F₁ α	0,2	F₂ α	0,1

Les flacons d'antisérum sont reconstitués dans 0,6 ml de tampon PBS/BSA du fait de la concentration en traceur fluorescent par tube (soit 410 pg de PGE₁). Des volumes variables d'antisérum (de 0,01 à 0,4 ml) sont incubés avec une concentration constante en traceur fluorescent (0,1 ml d'une solution à 1,16.10⁻⁸ M). Après 30 minutes à 25 °C, les tubes sont complétés à 1,3 ml avec le tampon PBS/BSA juste avant la mesure d'anisotropie.

I.2.5. Optimisation du temps d'incubation et de la température

Une cinétique d'incubation a été effectuée pour deux températures, 25 °C et 37 °C.

A 100 µl d'une solution de PGE₁-AEF à 5,2 ng/ml en fluorescéine (1,16 10⁻⁸ M) ont été ajoutés 150 µl d'antisérum. Après une incubation à 25 °C et 37 °C durant respectivement 30 minutes, 1 heure, 2 heures, 3 heures et 24 heures les tubes sont complétés à 1,3 ml juste avant la lecture.

I.2.6. Courbes d'étalonnages du dosage de la prostaglandine E₁

Le volume de lecture final est réduit : les tubes sont complétés à 0,9 ml afin de diminuer la quantité en antigène marqué et ainsi le volume d'anticorps consommé.

70 µl d'une solution à 5,2 ng/ml en AEF ($1,16 \cdot 10^{-8}$ M de PGE₁ - AEF) et 100 µl d'antisérum sont incubés pendant 1 heure à 25 °C. Différentes dilutions de solution étalon de PGE₁ (100 µl de solutions à $2,8 \cdot 10^{-9}$ M, $8,5 \cdot 10^{-9}$ M, $2,8 \cdot 10^{-8}$ M, $2,8 \cdot 10^{-7}$ M, $2,8 \cdot 10^{-6}$ M, $1,4 \cdot 10^{-6}$ M) sont ajoutées. Après 2 heures d'incubation à 25 °C, les tubes sont complétés à 0,9 ml par le tampon PBS / BSA juste avant la série de mesures. Les lectures sont effectuées contre un blanc constitué de tampon PBS / BSA.

II. RÉSULTATS ET DISCUSSION

II.1. Immunoréactivité vis à vis du traceur radioactif tritié (PGE₁ ³H)

Cette première étude est primordiale : elle permet de s'assurer de la conservation de la reconnaissance des anticorps pour la molécule de prostaglandine modifiée au niveau de sa fonction carboxyle. Le site antigénique principal étant situé au niveau de la partie cyclique de la PGE₁, on peut penser que le greffage de la fluorescéine modifiée n'influera pas de façon significative sur la fixation à l'anticorps. Une gêne allostérique est cependant possible.

L'utilisation d'une méthode de dosage radio-immunologique parfaitement connue tant au niveau méthodologique qu'au niveau des constantes de la réaction permet d'étudier les caractéristiques immunologiques du traceur PGE₁ - AEF.

La comparaison des courbes obtenues avec la PGE₁ fluorescente et non marquée indique l'état du système.

Les courbes obtenues doivent être :

- superposables lorsque le comportement du traceur et de l'étalon sont identiques
- décalées mais parallèles lorsque le traceur est contaminé par des composés non immunoréactifs
- décalées et non parallèles lorsque l'antigène a subi des modifications de son immunoréactivité au cours du marquage.

Les résultats obtenus pour le traceur fluorescent (PGE₁ - AEF) et la PGE₁ sont représentés sous la forme du pourcentage de PGE₁ ³H fixé en fonction de la concentration en compétiteur froid (figure 39).

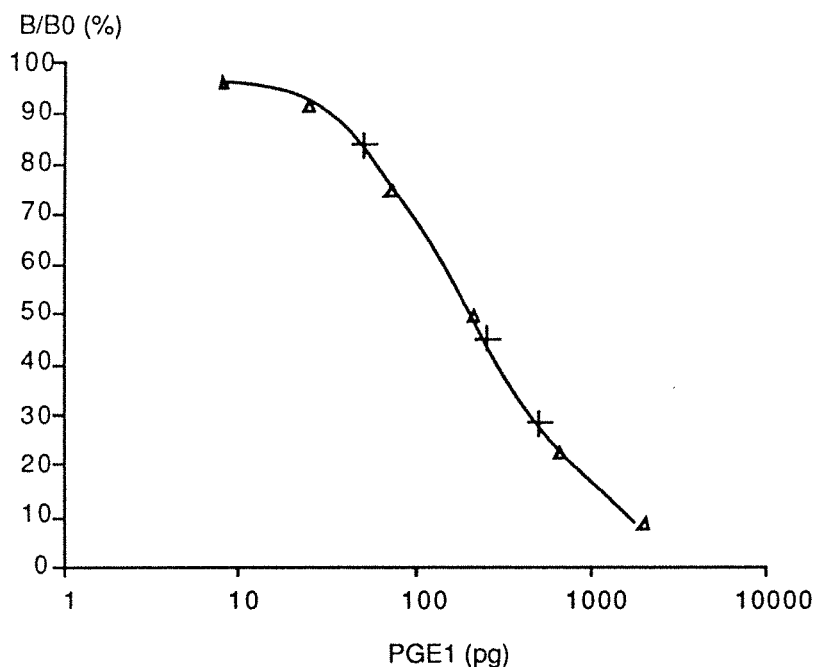


Figure 39 : Courbe d'étalonnage de la prostaglandine E₁ et de son dérivé fluorescent par RIA

Δ : PGE₁

+ : PGE₁ - AEF

La première constatation qui peut être faite concerne la superposition de la courbe d'étalonnage obtenue pour la PGE₁ et des trois concentrations de PGE₁ - AEF. Il y a une parfaite homogénéité dans la reconnaissance antigénique.

La présence du traceur provoque un déplacement de la PGE₁ ³H : lorsque sa concentration augmente, le pourcentage de traceur radioactif fixé à l'antisérum diminue.

La PGE₁ ³H est considérée comme étant totalement identique au niveau immunoréactivité par rapport à la PGE₁. Il n'y a pas eu de "greffage" chimique modifiant sa structure puisque le marquage s'effectue par un échange entre le tritium et l'hydrogène.

Selon les premiers résultats, le couplage de l'AEF ne semble pas affecter la reconnaissance immunologique du dérivé PGE₁ - AEF par les anticorps.

La présence de la molécule de fluorescéine ne provoque pas de gêne au niveau de la structure tridimensionnelle de la prostaglandine.

Une analyse des données obtenues dans cette étude par la méthode de Scatchard va permettre de déterminer de façon plus précise les paramètres de la réaction.

La représentation de Scatchard est théoriquement une droite si la population d'anticorps ne présentent qu'une valeur de constante d'affinité (Bourdon et Bourdon-Ranistenao, 1983).

Les calculs qui ont mené à la représentation de la figure 40 sont regroupés dans l'annexe I.

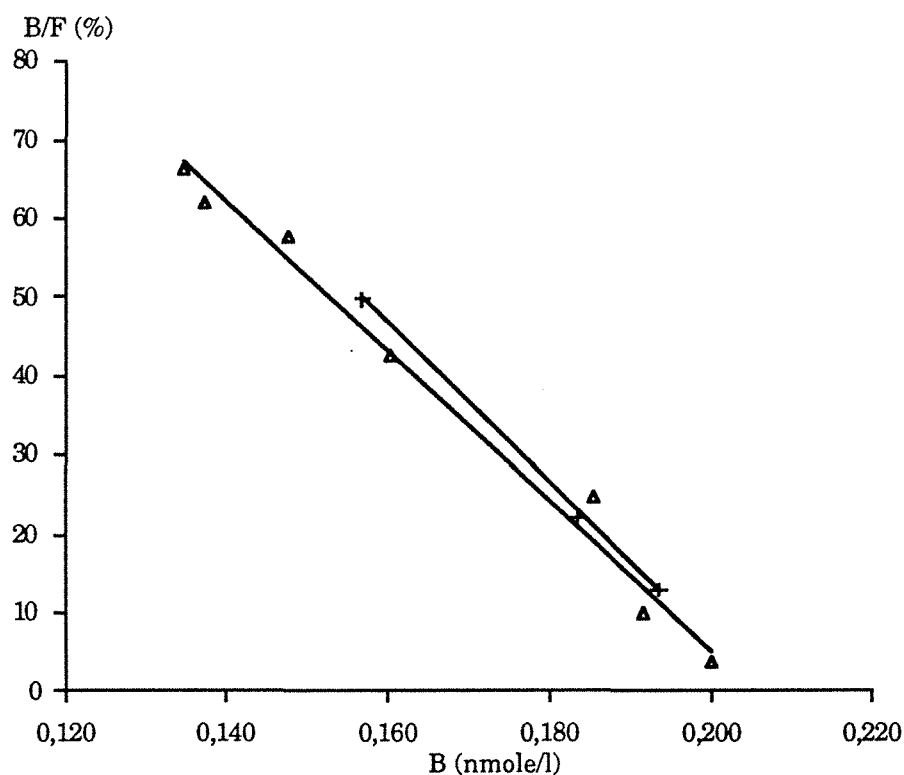


Figure 40 : Représentation de Scatchard des courbes de dosage par RIA de la prostaglandine E₁

Δ : PGE₁

+ : PGE₁ - AEF

La représentation monolinéaire indique la présence d'une classe de sites anticorps.

Comme le laissait prévoir la représentation de la figure 39, les deux droites sont superposables. Ceci confirme l'identité de reconnaissance. Le calcul des constantes de la réaction, regroupées dans le tableau XVII, donne une estimation similaire de la constante d'affinité pour la PGE₁ et pour le traceur fluorescent, PGE₁ - AEF.

TABLEAU XVII
ANALYSE SELON SCATCHARD DU RADIOIMMUNODOSAGE
DE LA PROSTAGLANDINE E₁

	Equation	Coefficient de corrélation	Ka	Concentration en sites Ac
Droite d'étalonnage	$Y = -9,42.10^9 X + 1,94$	$r = 0,9925$	$9,42.10^9 M^{-1}$	$2,06.10^{-10} M$
Droite en présence de TxB ₂ -AEF	$Y = -9,98.10^9 X + 2,06$	$r = 0,9998$	$9,98.10^9 M^{-1}$	$2,07.10^{-10} M$

Il est important de voir que le rapport des constantes d'affinités entre l'étalon et la PGE₁-AEF est proche de 1. Comme le montrait l'évolution de la concentration minimale détectable en fonction de ce rapport (Ekins, 1974), il semblerait que les limitations possibles (concernant le paramètre concentration minimale détectable) pour la mise au point d'un immunodosage en polarisation de fluorescence ne seront pas dues à un problème d'affinité du traceur fluorescent.

Une autre constatation pouvant être faite concerne le nombre de moles de fluorescéine fixées par mole de PGE₁. Alors que le greffage ne concerne théoriquement que la fonction carboxyle de l'écicosanoïde, on aurait pu considérer que le couplage chimique entraîne une modification d'une autre fonction chimique (fonction alcool par exemple). Cependant la concordance existant entre la concentration estimée par spectrométrie d'absorption du traceur et celle déterminée par RIA confirme la présence d'une mole de marqueur fluorescent par mole de prostaglandine.

La réaction de dérivation de la PGE₁ n'excluant pas la possibilité d'exploiter ce traceur au niveau immunologique, il va s'agir maintenant de définir le "cadre" possible du développement du dosage par polarisation de fluorescence.

II.2. Etude du dosage par polarisation de fluorescence

La mise au point du dosage par cette technique requiert en premier lieu de fixer certains paramètres afin de s'assurer de la reproductibilité maximale des données observées avant de réaliser des réactions de compétition

Les paramètres sont :

- la concentration optimale en traceur fluorescent
- le volume d'anticorps nécessaire pour une augmentation du signal d'anisotropie.

Une optimisation des conditions opératoires est menée afin d'aboutir à la construction d'une courbe d'étalonnage du dosage de la PGE₁.

II.2.1. Optimisation de la concentration en PGE₁ - AEF

Comme le montre la loi de Perrin, l'anisotropie de fluorescence est indépendante de la concentration en traceur fluorescent (puisqu'elle correspond à un rapport d'intensité de fluorescence) sauf dans des conditions extrêmes de dilution où d'autres paramètres interviennent.

Il est nécessaire d'optimiser la concentration en traceur afin de se trouver dans un domaine de concentration le plus bas possible sans qu'il y ait interférences dues aux variations de manipulation. Dans le domaine de concentration où l'anisotropie est fonction de la dilution, une faible erreur de manipulation aurait une grande incidence sur les résultats, et il ne serait pas possible d'imputer les variations d'anisotropie à la seule réaction de compétition.

La détermination de la concentration optimale est effectuée sur une série de dilutions du traceur allant de 5 à 0,05 ng/ml. Pour des raisons de facilité de comparaison des résultats, cette concentration est uniquement exprimée par rapport à l'AEF et ne tient pas compte de la masse molaire de la PGE₁.

Une première étude montre l'évolution des valeurs d'anisotropie (figure 41).

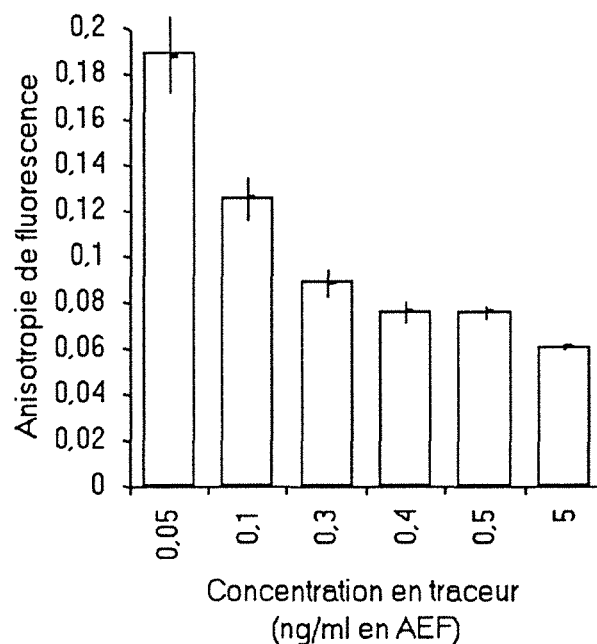


Figure 41 : Evolution de l'anisotropie de fluorescence en fonction de la dilution du traceur

(moyenne de trois essais de 5 mesures chacun)

A partir d'une concentration en AEF inférieure à 0,3 ng/ml l'anisotropie augmente. Cependant, il est possible de maintenir des valeurs constantes pour un domaine de concentration plus important. Afin de déterminer la concentration optimale, il est utile de visualiser l'évolution du rapport des intensités du blanc (tube contenant uniquement du tampon PBS/BSA) par rapport à la solution fluorescente. L'influence de la dilution du traceur sur l'évolution de ce rapport ainsi que sur l'anisotropie de fluorescence sont représentées conjointement sur le graphique 42.

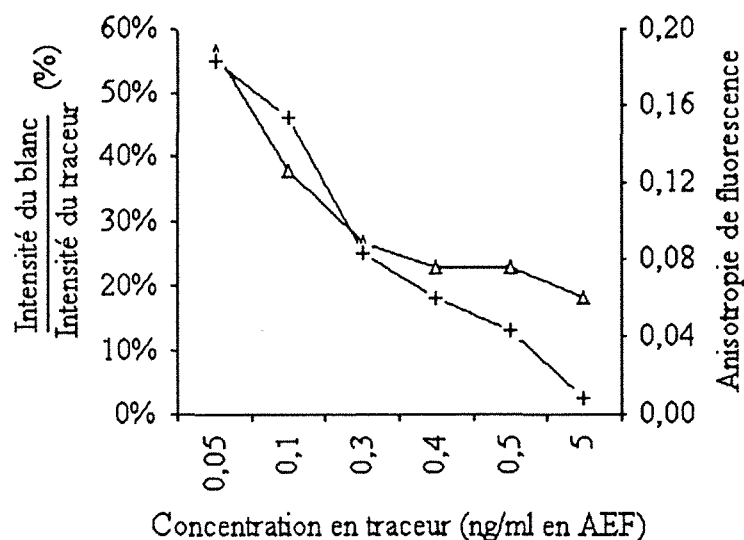


Figure 42 : Influence de la dilution sur l'évolution de l'intensité de fluorescence

+ : I_b / I_f (%)

Δ : Anisotropie de fluorescence

Les variations obtenues tant pour l'anisotropie que pour les rapports d'intensité évoluent de la même façon. Il se produit également une rupture dans la courbe pour une concentration inférieure à 0,3 ng/ml et l'intensité du blanc devient très importante. Etant donné que l'apport de protéines (telle que la BSA et les anticorps) risquent d'augmenter le pourcentage de cette intensité, il est nécessaire de se situer dans un domaine de concentration qui permet une marge de mesure sans changement de gain, car l'expérience montre une mauvaise corrélation des valeurs d'anisotropie d'un gain d'amplification à l'autre lorsque l'appareil se place sur des gains élevés. Une concentration de **0,4 ng/ml en AEF** est choisie afin d'éviter au maximum les interférences possibles.

II.2.2. Détermination de la concentration en anticorps

La détermination de la concentration en anticorps nécessaire pour obtenir d'une part, une augmentation d'anisotropie mesurable avec précision et d'autre part, une concentration optimale en sites anticorps en défaut par rapport aux molécules antigéniques, se fait classiquement par la construction d'une courbe représentant l'évolution du signal en fonction de

la dilution de l'antisérum. Cependant ne disposant que d'anticorps commerciaux utilisés pour le dosage de la PGE_1 en RIA, l'étude est menée sur une augmentation du volume d'antisérum mis à incuber avec le traceur. Une analogie est faite dans ce cas entre les termes "concentration" et "volume".

Les informations du fabricant concernant les paramètres de fixation de l'anticorps font apparaître qu'un volume de 0,1 ml d'anticorps anti- PGE_1 d'un flacon reconstitué à 11 ml lie 50 % de 42 pg de traceur tritié. La quantité de PGE_1 correspondant à une concentration en AEF de 0,4 ng/ml pour un volume final de 1,3 ml est de 410 pg. Etant donnée la quantité de traceur fluorescent, il est nécessaire de diminuer la dilution de l'antisérum d'un facteur 20 environ. Ce calcul a servi de base pour la détermination des volumes en antisérum requis dans cette étude (figure 43).

Une augmentation du signal d'anisotropie est observable en fonction du volume d'antisérum présent. Ceci montre l'aptitude du traceur à répondre dans ce système pour ce qui concerne la diminution des mouvements browniens rotationnels de l'AEF.

L'ajout de 400 μl d'antisérum permet d'atteindre pratiquement un plateau dans la réponse. Une augmentation de 50 % du signal est obtenue pour un volume de 150 μl d'antisérum.

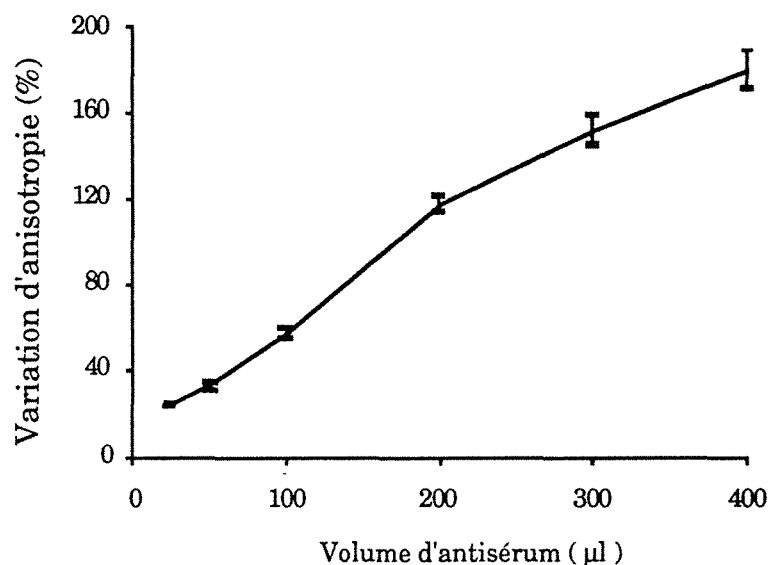


Figure 43 : Variation de l'anisotropie de fluorescence en fonction du volume d'antisérum anti-prostaglandine E_1

Ce volume représente une consommation importante en antisérum pour la construction d'une gamme d'étalonnage entraînant un coût élevé de l'étude. Une modification est apportée en ce qui concerne le volume final de lecture. En conservant une concentration finale identique en traceur mais en diminuant le volume de mesure de 1,3 à 0,9 ml (volume suffisant pour le passage du faisceau de lumière polarisée), il est possible de diminuer d'un tiers la consommation d'antisérum. Cette modification n'entraîne pas de variation du signal maximal d'anisotropie de fluorescence sous réserve d'adapter les quantités respectives en traceur et antisérum.

Les conditions expérimentales pour l'étude des courbes d'étalonnages sont fixées ainsi :

- concentration finale en traceur de 9.10^{-10} M
- volume d'antisérum de 100 μ l par essai pour un flacon reconstitué à 0,6 ml

II.2.3. Détermination de la durée et de la température optimales de la réaction de compétition

Les temps d'incubation des immunodosages est adapté suivant la température : pour une incubation à 25 °C la durée est d'une à trois heures alors qu'elle doit être prolongée de 20 à 24 heures pour une incubation à 4 °C. Dans le but de minimiser la durée de cette étape, le traceur est mis en présence de l'anticorps pendant différents temps allant de 30 minutes à 24 heures à 25 °C et 37 °C. Les variations des valeurs d'anisotropie en fonction du temps d'incubation sont représentées sur la figure 44.

Une augmentation progressive du signal, relativement indépendante de la température est observable jusqu'à 3 heures d'incubation. Cependant une prolongation du temps à 24 heures provoque une baisse des valeurs d'anisotropie. Elle est également plus importante pour une incubation à 37 °C. Cette baisse peut être due à une dégradation du marqueur en solution.

Une durée d'incubation de 3 heures à 25 °C est choisie pour la suite de l'étude

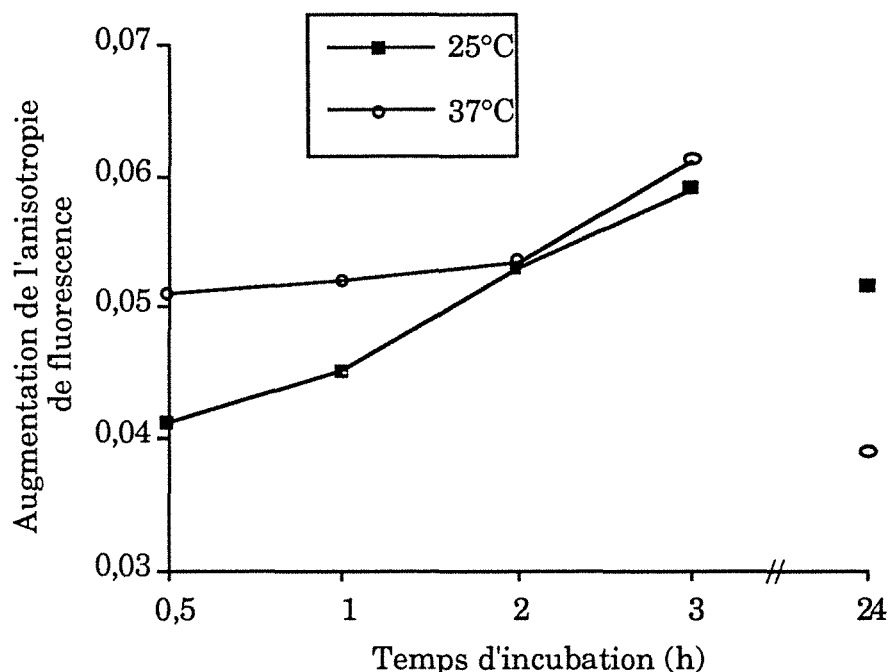


Figure 44 : Cinétique de la fixation du traceur sur l'anticorps en fonction de la température d'incubation

(moyenne de deux expériences reproductibles)

II.2.4. Etude des courbes d'étalonnage par polarisation de fluorescence

Après avoir vérifié les capacités d'immunoreconnaissance du traceur PGE_1 - AEF, déterminé la concentration en anticorps ainsi que les conditions d'incubation, il est possible de construire une courbe "dose-réponse" pour des concentrations croissantes en compétiteur. Les résultats sont ensuite interprétés selon le modèle mathématique développé par Dandliker et coll. (1973) pour la polarisation de fluorescence.

II.2.4.1. Courbes de compétition entre la prostaglandine E_1 et le traceur PGE_1 - AEF

Des concentrations croissantes en PGE_1 entrent en compétition avec le traceur pour les sites anticorps en défaut. Il en résulte une diminution du signal d'anisotropie proportionnelle à la quantité de PGE_1 présente, comme le montre la courbe d'étalonnage de la figure 45.

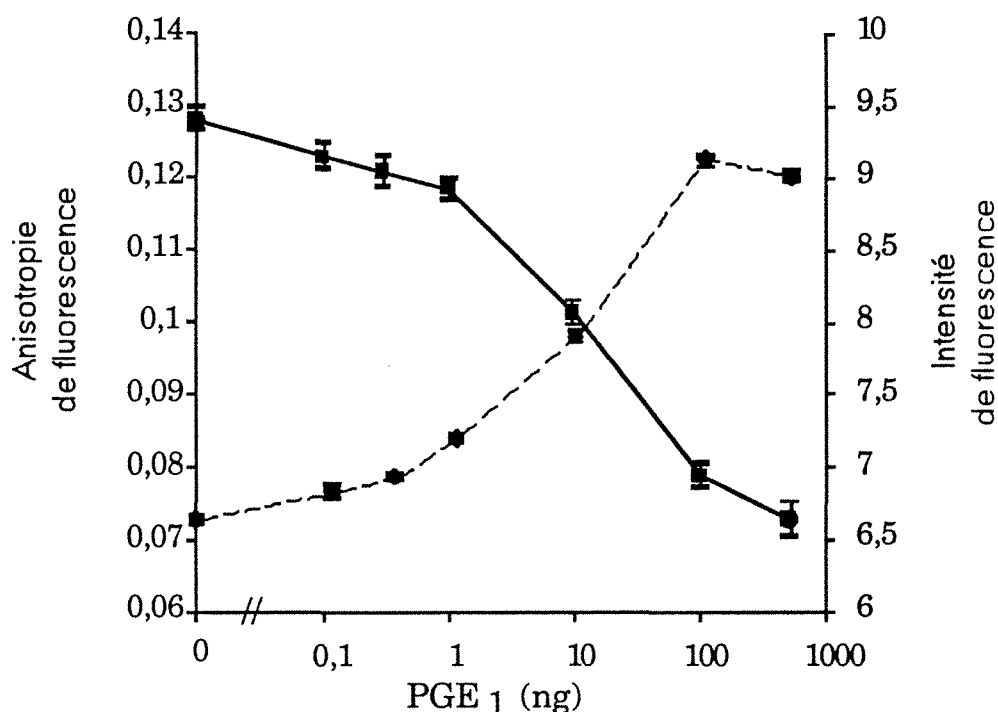


Figure 45 : Courbe d'étalonnage de la prostaglandine E₁. Evolution de l'anisotropie et de l'intensité de fluorescence ($n = 5$)

—■— : anisotropie de fluorescence
 -●-- : intensité de fluorescence

La courbe d'étalonnage permet une détermination de PGE₁ avec un maximum de précision dans un domaine de concentration compris entre 1 et 100 ng par essai, domaine où la pente est la plus importante. Du fait de la concentration limitante en traceur, la plus petite concentration en PGE₁ du zéro est voisine de 0,1 ng/tube.

Cependant il n'est pas envisageable actuellement de diminuer la concentration en traceur : une comparaison des résultats effectuée sur le spectrofluorimètre SLM donne des résultats similaires. Les résultats obtenus dans le cadre de l'étude de la PGE₁ sont réalisés dans les conditions limites d'utilisation de l'appareil : l'ajout de BSA, protéine nécessaire pour stabiliser les anticorps en solution, provoque une augmentation importante du pourcentage de l'intensité du blanc.

Le deuxième paramètre étudié sur la figure 45 concerne l'évolution de l'intensité de fluorescence. Sa variation est inversement proportionnelle à

celle de l'anisotropie de fluorescence. Cette représentation pourrait être également utilisée pour réaliser une courbe de dosage : la pente maximale concerne le même domaine de concentration que celui observable pour les valeurs d'anisotropie.

Une représentation des résultats moyens obtenus à partir de 5 courbes traitées dans les mêmes conditions opératoires est décrite sur la figure 46. Les résultats sont exprimés en augmentation d'anisotropie. Les concentrations de PGE₁ pouvant être déterminés ne font que confirmer ce qui est observable pour une courbe obtenue en "intra-jour".

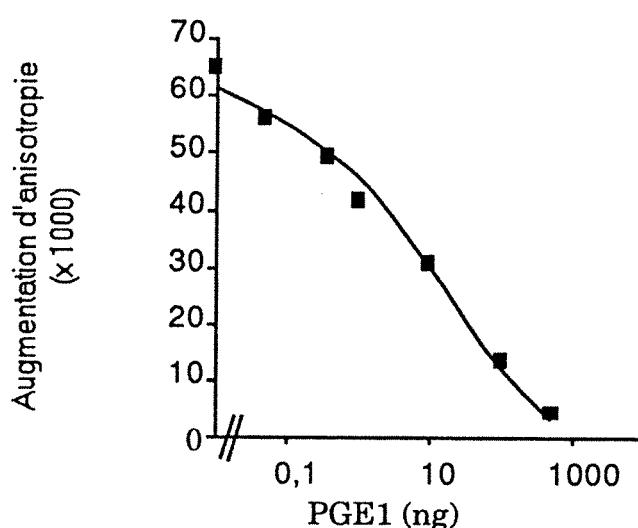


Figure 46 : Courbe d'étalonnage cumulée
(moyenne de 5 courbes)

A la suite de cette étude, la praticabilité d'un immunodosage de PGE₁ par polarisation de fluorescence à l'aide du traceur PGE₁ - AEF, d'une molécule de la famille des éicosanoïdes est montrée. Etant données les limitations technologiques actuelles de l'appareillage, les domaines de concentrations pouvant être déterminés ne couvrent pas les domaines de concentration couramment mesurés pour les métabolites de l'acide dihomoylinoléinique (précurseur des prostaglandines de la première série) et qui plus est de l'acide arachidonique. Il manque un facteur 50 pour atteindre les domaines physiologiques.

II.2.4.2. Analyse des résultats selon le modèle de Scatchard

En utilisant le modèle mathématique décrit par Dandliker (Dandliker et coll., 1973), la relation exprimant le rapport B/F aux résultats obtenus lors des mesures par polarisation de fluorescence est :

$$\frac{F_b}{F_f} = \frac{Q_f}{Q_b} \cdot \frac{p - p_f}{p_b - p}$$

Les calculs qui ont conduit à établir la courbe de la figure 47 sont développés en annexe II.

Il est possible de dégager plusieurs constatations au regard de cette courbe : il y a absence de linéarité sur l'ensemble de la courbe et deux portions de droites peuvent être tracées. Ces résultats pourraient être en relation avec l'utilisation d'anticorps polyclonaux provenant d'une autre société que les anticorps utilisés en RIA. Ils présentent une hétérogénéité au niveau de leurs sites anticorps.

L'existence de deux classes de sites indépendants, portés ou non par le même anticorps, pour un ligand unique apparaît clairement. Il s'ensuit la formation d'un double équilibre caractérisé par des constantes différentes. Le tracé d'une asymptote au niveau de chacune des parties de la courbe permet au mieux d'apprécier les constantes d'équilibre (Pontet et Tresca, 1990) :

$$\begin{aligned} B/F &= K_{a1} ([Ac_0_1] - [B]) \text{ quand } B/F \text{ tend vers l'infini} \\ \text{et } B/F &= K_{a2} ([Ac_0_2] - [B]) \text{ quand } B/F \text{ tend vers zéro.} \end{aligned}$$

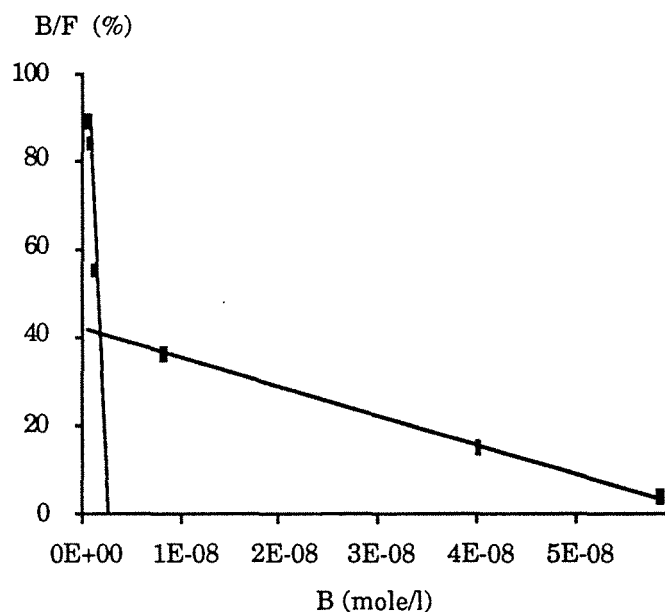


Figure 47 : Représentation de Scatchard des résultats cumulés des courbes d'étalonnage de la prostaglandine E₁ par polarisation de fluorescence

Le calcul de la pente de chaque droite ainsi que la valeur de l'intercept pour un rapport B/F nul permet de dégager les constantes du dosage (Tableau XVIII).

TABLEAU XVIII
ANALYSE SELON SCATCHARD DE LA COURBE D'ETALONNAGE DE LA PROSTAGLANDINE E₁ PAR POLARISATION DE FLUORESCENCE

	Equation	Coefficient de corrélation	K _a	Concentration en sites Ac
Première partie de la courbe	$Y = -0,376 \cdot 10^9 X + 1,110$	$r = 0,9747$	$0,376 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$	$2,9 \cdot 10^{-9} \text{ M}$
Deuxième partie de la courbe	$Y = -6,489 \cdot 10^6 X + 0,416$	$r = 0,9993$	$6,489 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$	$6,4 \cdot 10^{-8} \text{ M}$

Deux populations de sites anticorps avec des constantes d'affinités distinctes sont mises en évidence. Une purification sélective de ces deux classes de sites par chromatographie d'affinité pourrait permettre une légère amélioration des domaines de concentration du dosage. Cependant cette technique nécessite de grandes quantités d'anticorps, avec des risques de dégradation possibles. Le progrès qui pourrait en résulter ne serait pas vraiment intéressant, la quantité de traceur nécessaire pour une mesure fiable de l'anisotropie étant le facteur limitant.

III. Conclusions

La possibilité de réaliser un dosage par polarisation de fluorescence d'une biomolécule à fonction carboxyle est montrée. Cependant, en l'état actuel des possibilités techniques de l'appareillage et des propriétés spectrales du traceur, il n'est pas possible de "concurrencer" un dosage radioimmunologique, le domaine de concentration recherché n'est pas atteint.

Néanmoins, les capacités démontrées ici correspondent à un progrès au regard des dosages de même type : la facilité de mise en oeuvre du dosage ainsi que sa rapidité en sont les atouts principaux. Un facteur 10 à 100 est gagné par rapport aux immunodosages par polarisation de fluorescence commercialisés ou décrits dans la bibliographie.

Son domaine d'application pourrait concerner le dosage de la PGE₁ employée en tant que médicament dans certaines pathologies néonatales (Zoutendam et coll., 1984). Elle a un rôle d'inhibition de l'agrégation plaquettaire (Gerrard, 1982), son dosage est préconisé dans les problèmes de stérilité masculine.

Ce modèle peut également être transposé à d'autres biomolécules.

Le développement du dosage du TxB₂ peut être envisagé. Il sera mené sur la même démarche avec cependant la connaissance des limitations de la méthode.

3ème partie : Développement du dosage du thromboxane B₂**I. MATÉRIEL ET MÉTHODES****I.1. Vérification de l'immunoréactivité du traceur TxB₂ - AEF****I.1.1. Réactifs et mode opératoire**

Afin de vérifier la conservation de la reconnaissance du traceur par les anticorps, 3 trousse de dosage mettant en oeuvre des traceurs radioactifs ou enzymatiques ont été utilisés :

- une trousse utilisant le TxB₂ marqué à l'iode 125 (Amersham, Les Ulis, France), la molécule étant estérifiée au niveau de son carboxyle par l'iodotyrosine [¹²⁵I]
- une trousse utilisant le TxB₂ marqué au tritium (Amersham, Les Ulis, France), dans ce cas la modification de la molécule consiste en l'échange d'hydrogène par du tritium
- une trousse utilisant le thromboxane marqué au niveau de son carboxyle par une enzyme, l'acétylcholinestérase (Cayman Chemical, Ann Arbor, USA).

I.1.1.1. Compétition vis à vis du traceur iodé

Tous les réactifs de la trousse sont conservés à - 20 °C.

La structure chimique du traceur est représentée sur la figure 48.

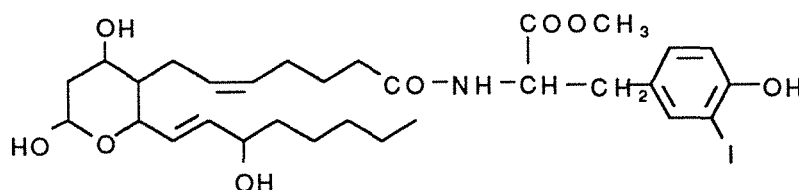


Figure 48 : Structure du thromboxane B₂ iodé

La trousse comporte les réactifs suivants :

- **tampon phosphate 50 mM à pH 7,3**
contenant 0,1 % de gélatine et 0,01 % de
thimérosal
- **TxB₂ ¹²⁵I** 2000 Ci/mmmole, 2 µCi
en solution dans un mélange
éthanol/eau (1 : 1), dilué dans
10 ml de tampon
- **anticorps anti-TxB₂** sous forme lyophilisée, reconstitué
dans 10 ml de tampon
- **anticorps anti-lapin sur support**
polymérique (Amerlex M)
- **étalon de TxB₂** 8 ng sous forme lyophilisée
reconstitué dans 1 ml de tampon

La gamme étalon est réalisée par une série de dilutions au demi de 4 ng/ml à 31 pg/ml, soit 400 à 3 pg/tube. Le TxB₂ fluorescent est dilué dans les mêmes concentrations que la gamme étalon. Tous les réactifs sont équilibrés à température ambiante avant d'être utilisés. Le protocole opératoire est résumé dans le tableau XIX.

TABLEAU XIX
PROTOCOLE OPERATOIRE DU DOSAGE RADIO-IMMUNOLOGIQUE DU
THROMBOXANE B₂ UTILISANT LE TRACEUR IODE

Tube	Radioactivité totale (T)	Liaison non spécifique (LNS)	Etalon "0" (B ₀)	TxB ₂ étalon ou TxB ₂ - AEF
Tampon (μl)	-	400	300	200
TxB ₂ ¹²⁵ I (μl)	100	100	100	100
TxB ₂ étalon ou fluorescent (μl)	-	-	-	100
Anticorps (μl)	-	-	100	100
Incuber 16 h à 4 °C				
Deuxième anticorps précipitant (μl)	-	500	500	500
- Mélanger au vortex et centrifuger à 1500 g pendant 10 min à 4 °C - Eliminer le surnageant - Déterminer la radioactivité dans un compteur gamma jusqu'à accumulation de 10000 coups				

I.1.1.2. Compétition vis à vis du traceur tritié

Tous les réactifs de la trousse sont conservés à - 20 °C dans un tampon phosphate 50 mM à pH 7,3 contenant 0,1 % de gélatine et 0,01 % de thimérosal. Aucune reconstitution de réactifs ni étapes de dilution sont nécessaires. Après décongélation, les réactifs sont stables 15 jours à 4 °C.

La gamme étalon couvre les concentrations de 5 à 300 pg/ tube.

La trousse comporte les réactifs suivants :

- tampon phosphate 50 mM à pH 7,3
 contenant 0,1 % de gélatine et
 0,01 % de thimérosal
- TxB₂ tritié 120 Ci/mmole, 1 μCi
- anticorps anti-TxB₂

- solution de charbon-dextran dans le tampon phosphate
- étalons de TxB₂

5 solutions : A 3 ng/ml
 B 1,1 ng/ml
 C 0,4 ng/ml
 D 0,13 ng/ml
 E 0,05 ng/ml

Le TxB₂ fluorescent est dilué dans les mêmes concentrations que la gamme étalon avec le tampon de la trousse. Tous les réactifs sont équilibrés à température ambiante avant d'être utilisés. Le protocole opératoire est résumé dans le tableau XX.

TABLEAU XX
PROTOCOLE OPERATOIRE DU DOSAGE RADIO-IMMUNOLOGIQUE DU
THROMBOXANE B₂ UTILISANT LE TRACEUR TRITIE

Tube	Radioactivité totale (T)	Liaison non spécifique (LNS)	Etalon "0" (B ₀)	TxB ₂ étalon ou TxB ₂ -AEF
Tampon (μl)	200	200	100	-
TxB ₂ ³ H (μl)	100	100	100	100
TxB ₂ étalon ou fluorescent (μl)	-	-	-	100
Anticorps (μl)	-	-	100	100
Incuber 16 h à 4 °C				
Charbon-Dextran (ml)	-	1	1	1
Tampon (ml)	1	-	-	-
- Mélanger au vortex et centrifuger à 1000 g pendant 10 min à 4 °C - Prélèver 650 μL de surnageant dans des tubes à scintillation - Ajouter 5 ml de liquide de scintillation (Ready Safe, Beckman) - Compter la radioactivité dans un compteur à scintillation liquide jusqu'à accumulation de 10000 coups ou pendant 10 minutes				

L'addition de charbon permet l'adsorption du TxB₂ libre. Les mesures de radioactivité concernent la partie de TxB₂ liée aux anticorps.

I.1.1.3. Compétition vis à vis du traceur enzymatique

Le traceur est constitué d'une molécule de TxB₂ liée à une molécule d'acétylcholinestérase. La quantification de la réaction de compétition est effectuée par une mesure de l'activité de l'enzyme en présence du réactif d'Ellman. Il en résulte la formation d'acide 5-thio 2-nitro benzoïque qui a une absorbance élevée à 412 nm ($\epsilon = 13600 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$).

La composition du tampon n'est pas donnée par le fabricant.

La trousse comporte les réactifs suivants :

- **tampon d'incubation** reconstitué à 500 ml avec de l'eau bidistillée
- **tampon de lavage** reconstitué à 500 ml avec de l'eau bidistillée et addition de 0,25 ml de Tween 20
- **TxB₂ marqué par l'enzyme** sous forme lyophilisée, reconstitué dans 6 ml de tampon
- **anticorps anti-TxB₂** sous forme lyophilisée, reconstitué dans 6 ml de tampon
- **étalon de TxB₂** 10 ng sous forme lyophilisée reconstitué dans 1 ml de tampon
- **réactif d'Ellman** reconstitué à 20 ml avec de l'eau bidistillée.

Une plaque de 96 puits revêtue d'anticorps monoclonaux de souris sert au développement du dosage. La gamme étalon est réalisée par une série de dilutions de 1000 pg/ml à 7,8 pg/ml. Le TxB₂ fluorescent est dilué dans les mêmes concentrations que la gamme étalon. Tous les réactifs sont équilibrés à température ambiante avant d'être utilisés. Le protocole opératoire est résumé dans le tableau XXI.

TABLEAU XXI
PROTOCOLE OPERATOIRE DU DOSAGE DU THROMBOXANE B₂
UTILISANT LE TRACEUR ENZYMATIQUE

Tube	Blanc	Activité totale (T)	Liaison non spécifique (LNS)	Etalon "0" (B ₀)	TxB ₂ étalon ou TxB ₂ -AEF
Tampon (μl)	-	-	100	50	-
TxB ₂ - Acétylcholinestérase (μl)	-	-	50	50	50
TxB ₂ étalon ou fluorescent (μl)	-	-	-	-	50
Anticorps (μl)	-	-	-	50	50
- Incuber 16 h à 25 °C					
- Laver 5 fois avec 0,35 ml de tampon					
TxB ₂ - Acétylcholinestérase (μl)	-	5	-	-	-
Réactif d'Ellman (μl)	200	200	200	200	200
- Incuber 1 heure à 25 °C					
- Mesurer l'absorbance à 412 nm					

I.1.2. Expression des résultats

Pour les déterminations par radioimmunos dosage, les calculs sont effectués comme pour la PGE₁ (chapitre I.1.3., page 117).

Pour l'enzymo-immunos dosage la relation est la suivante :

$$\frac{B}{B_0} = \frac{[A_{\text{TxB}_2 \text{ étalon ou fluorescent}} - A_{\text{blanc}}] - [A_{\text{LNS}} - A_{\text{blanc}}]}{[A_{\text{étalon "0"}} - A_{\text{blanc}}]}$$

A représente la valeur de l'absorbance.

Il n'a pas été possible d'obtenir du fournisseur des informations quant à l'activité du traceur enzymatique. L'exploitation des résultats par le modèle de Scatchard n'a pas pu être effectuée. Cependant une estimation de la concentration de TxB₂ donnant un rapport B/B₀ de 50 % permet d'appréhender la possibilité de réactions croisées. En faisant le rapport des concentrations $\frac{\text{TxB}_2}{\text{TxB}_2 - \text{AEF}}$ observées, une valeur proche de 100 % est caractéristique d'une immunoréactivité identique, et inversement une faible valeur est significative d'une modification de la reconnaissance immunologique.

L2. Analyse du thromboxane B₂ par polarisation de fluorescence

I.2.1. Description de l'appareillage et du matériel

Toutes les analyses concernant le TxB₂ ont été réalisées sur le deuxième prototype de fluopolarimètre de l'unité INSERM 284. Les modifications apportées par rapport à l'ancien appareil concernent principalement l'alimentation qui est stabilisée ainsi que le programme informatique de traitement des données. Une adaptation du programme d'analyse permet d'effectuer également des mesures de cinétique de réaction.

Le principe des mesures est identique à l'analyse de la PGE₁ (chapitre I.2.1., page 119).

I.2.2. Détermination de la concentration minimale en TxB₂-AEF

Les contraintes techniques de l'appareil ne permettent pas des mesures reproductibles avec des intensités de blanc supérieures à 20 % de l'intensité de la solution fluorescente (ce qui correspond à un gain d'amplification 32 du signal). Pour des raisons de souplesse d'utilisation, il a été choisi de travailler à une concentration en fluorescéine correspondant à un gain 16, l'ajout de protéines plasmatiques pouvant modifier la fluorescence.

I.2.3. Influence de la viscosité sur l'anisotropie de fluorescence du dérivé

Les mesures concernant l'évolution de l'anisotropie de fluorescence en fonction de la viscosité du milieu ont été effectuées dans le tampon phosphate 0,1 M à pH 7,5 en présence de quantités croissantes de glycérol. La cellule de lecture est thermostatée à 20 °C. La concentration en traceur est de $2,2 \cdot 10^{-9}$ M.

Le tableau XXII décrit la composition des solutions ainsi que les viscosités relatives (η/η_0) par rapport à l'eau à 20 °C. La viscosité absolue de la solution de glycérol a été déterminée grâce à la valeur de la viscosité de l'eau qui est de 1,002 cP.

TABLEAU XXII
VISCOSITE RELATIVE EN FONCTION DU POURCENTAGE DE
GLYCEROL

% de glycérol dans le tampon phosphate 0,1M pH 7,5 (m/V)	0,5	16	28	48	60	72	80
Viscosité relative η/η_0	1,009	1,530	2,274	5,402	10,660	27,570	59,780
Viscosité absolue η (cP)	1,011	1,533	2,279	5,413	10,681	27,625	59,900

I.2.4. Détermination de la concentration en anticorps

I.2.4.1. Réactifs

Les anticorps testés proviennent de Sigma Immuno Chemicals (St Quentin Fallavier, France).

Les caractéristiques immunologiques des anticorps sont :

- B₀ : 0,5 ml d'un flacon reconstitué à 50 ml lie 40 % de 10 pg de TxB₂ tritié d'activité spécifique de 140 Ci/mme, soit 4 pg
- la sensibilité définie comme étant la quantité de TxB₂ donnant un rapport B/B₀ de 90 % : 4 pg/tube

- la constante d'affinité déterminée par la méthode de Scatchard :
 $K_a = 4,3 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$
- la spécificité : réactions croisées (%) pour $B/B_0 = 50 \%$

Prostaglandines

A₁	<0,1	A₂	<0,1
B₁	<0,1	B₂	<0,1
D₂	<0,1	E₁	<0,1
E₂	<0,1	F₁ α	<0,1
F₂ α	0,5	céto-6-F₁ α	<0,1

Aucune information concernant les réactions croisées avec les métabolites du TxB₂ ne sont données.

I.2.4.2. Tampon

Les résultats exposés concernant les mesures en présence d'anticorps ont été faites dans le tampon préconisé par la société Sigma : tampon PBS constitué de phosphate de sodium 0,01 M à pH 7,4, de NaCl 0,4 M et contenant 0,1 % de BSA (m/V). Il n'a pas été nécessaire d'ajouter de l'azide de sodium, la solution d'anticorps étant utilisée extemporanément.

I.2.4.3. Mode opératoire

A 120 µl d'une solution à 20 ng/ml en AEF ($4,4 \cdot 10^{-8} \text{ M}$) ont été ajoutés des volumes croissants d'anticorps (chaque flacon est reconstitué à un volume de 0,6 ml de tampon PBS/BSA). Après 1 heure d'incubation à 25 °C, les tubes sont complétés à 1,5 ml juste avant la série de mesures. Les lectures sont effectuées contre un blanc (tampon PBS/BSA, 1425 µl contenant 75 µl d'anticorps). La cellule du fluopolarimètre est thermostatée à 25 °C. Le tableau XXIII résume le protocole opératoire.

TABLEAU XXIII
PROTOCOLE OPERATOIRE DE DETERMINATION DU VOLUME
D'ANTISERUM

Volume de TxB₂-AEF (4,4.10⁻⁸ M) (μl)	Volume d'anticorps (μl)	I N C	Volume de tampon phosphate 0,01M pH 7,4 / BSA 0,1 % (m/V)
120	0	U	1380
120	15	B	1365
120	30	A	1350
120	60	T	1320
120	75	I	1305
120	90	O	1290
120	112	N	1268
120	150	1 h à 25 °C	1230

I.2.5. Courbe de compétition

Pour des raisons de coût de l'antisérum, une adaptation des conditions de mesure a permis de les effectuer dans un volume final de 1 ml pour un volume d'anticorps de 50 μl (le flacon est reconstitué à 0,6 ml).

I.2.5.1. Courbe de compétition en milieu tampon

A 80 μl d'une solution à 20 ng/ml en AEF (4,4.10⁻⁸ M de TxB₂ - AEF) ont été ajoutés 50 μl d'anticorps. Après 1 heure d'incubation à 25 °C, 50 μl de solution de TxB₂ à différentes concentrations (de 2 ng/ml à 10 μg/ml) sont ajoutés. Après une nouvelle incubation d'une heure à 25 °C, les tubes sont complétés à 1 ml avec le tampon PBS/BSA juste avant la mesure d'anisotropie. Les lectures sont effectuées contre un blanc (tampon PBS/BSA, 950 μl et 50 μl d'anticorps).

I.2.5.2. Comparaison de la compétition en milieu tampon et plasmatique

Des fractions de 1 ml de plasma provenant de sang prélevé sur héparine ont été surchargées par du TxB₂ afin d'obtenir des concentrations de 20 ng/ml, 40 ng/ml, 100 ng/ml, 200 ng/ml, 400 ng/ml.

Des dilutions de TxB₂ dans le tampon PBS/BSA sont réalisées aux même concentrations.

Le plasma surchargé ainsi que le plasma non surchargé sont centrifugés sur Centrisart (Sartorius, Göttingen, Allemagne) pendant 15 minutes à 2500 g à 20 °C. Cette étape permet d'éliminer toutes les molécules de masse molaire supérieure à 5000.

Le plasma ultrafiltré par cette technique est utilisé directement pour les essais de compétition en polarisation de fluorescence. Des essais identiques sont effectués en parallèle en milieu PBS/BSA. Le tableau XXIV rassemble les conditions opératoires.

TABLEAU XXIV
PROTOCOLE OPERATOIRE DU DOSAGE DU THROMBOXANE B₂ DANS
DU PLASMA SURCHARGE ET EN MILIEU TAMPON PBS/BSA

Tube	TxB ₂ -AEF (4,4.10 ⁻⁸ M) (μl)	Anticorps (μl)	I N C U B A T I O N 1 h à 25 °C	Plasma ou tampon surchargé (μl)	I N C U B A T I O N 1 h à 25 °C	Tampon phosphate 0,01M pH7,4 / BSA 0,1 % (M/V) (μl)
0 ng	80	50	B	50	B	820
1 ng	80	50	A	50	A	820
2 ng	80	50	T	50	T	820
5 ng	80	50	I	50	I	820
10 ng	80	50	O	50	O	820
20 ng	80	50	N	50	N	820
Blanc	-	50	1 h	50	1 h	900
Témoin	80	-	à 25 °C	50	à 25 °C	870

1.2.6. Cinétique de la réaction antigène-anticorps

Le programme cinétique du fluopolarimètre a permis de suivre la réaction de fixation du TxB₂-AEF sur l'anticorps. Des mesures ont été effectuées pendant dix minutes toutes les 15 secondes sur une solution contenant le traceur et les anticorps à la même concentration que l'étude précédente. La cinétique est prolongée pendant 1 heure après addition de 20 µg de TxB₂.

1.2.7. Dosage du thromboxane B₂ libéré par les plaquettes

1.2.7.1. Obtention du plasma riche en plaquettes (PRP) et isolement des plaquettes

Cinq ml de sang total sont prélevés en tube plastique sur citrate (3,8 %, m/V). Le sang total est centrifugé à 140 g pendant 15 minutes à 20 °C. Le plasma riche en plaquettes (PRP) est prélevé en évitant d'entraîner les hématies et les leucocytes. Un aliquot du PRP est utilisé pour une numération plaquettaire. Le reste est centrifugé à 1200 g pendant 15 minutes à 20 °C. Le surnageant est éliminé, le culot plaquettaire est remis en suspension dans le tampon phosphate 0,15 M à pH 7,4 afin d'obtenir une concentration voisine de $5 \cdot 10^8$ plaquettes/ml.

1.2.7.2. Stimulation de la libération du thromboxane B₂

- Réactif

Le composé proagrégant, la thrombine (Sigma, St Louis, USA), est préparé à une concentration de 10 UI/ml dans le tampon phosphate 0,15 M.

- Méthode

La suspension plaquettaire est mise à incuber à 37 °C sous agitation pendant 60 minutes en présence de thrombine (0,5 UI/ml en concentration finale). Après incubation, les cellules sont éliminées par centrifugation à 1200 g pendant 15 minutes.

I.2.7.3. Dosage par polarisation de fluorescence du thromboxane B₂ libéré par les plaquettes

Le dosage est effectué dans le tampon PBS/BSA . La gamme d'étalonnage du TxB₂ (tableau XXIV) est réalisée dans le même tampon. Trois déterminations de la concentration en TxB₂ libéré par les plaquettes sont effectuées après une dilution du surnageant du PRP au 1/10, 1/5 et 1/3 dans le tampon PBS/BSA.

Le traceur (80 µl d'une solution à $4,4 \cdot 10^{-8}$ M) est incubé 10 minutes en présence des anticorps à 25 °C. Puis le TxB₂ compétiteur issu des plaquettes ou de la gamme d'étalonnage est ajouté, l'incubation est prolongée 1 heure à 25 °C.

II. RESULTATS ET DISCUSSION

II.1. Immunoréactivité du traceur

Une étude a été menée afin de mesurer qualitativement (à l'aide d'une courbe dose-réponse et de la mesure des réactions croisées) et quantitativement (par le traitement des résultats selon Scatchard) les paramètres régissant la réaction antigène - anticorps.

L'aptitude du traceur a été testée pour les immunodosages actuellement commercialisés :

- en compétition avec un traceur iodé
- en compétition avec un traceur tritié
- en compétition avec un traceur enzymatique.

II.1.1. Immunoréactivité vis à vis des traceurs radioactifs

II.1.1.1. Compétition vis à vis du traceur iodé

Le traceur iodé résultant d'une modification chimique proche de celle du traceur fluorescent et conduisant à des masses moléculaires proches pour les deux traceurs, il est intéressant de comparer l'immunoréactivité du traceur fluorescent à celle du traceur iodé.

Le TxB₂ étalon ou le TxB₂ - AEF ont été mis en compétition avec le TxB₂ ¹²⁵I. Les résultats donnant le pourcentage B/B₀ en fonction de la quantité croissante en TxB₂ sont représentés sur la figure 49.

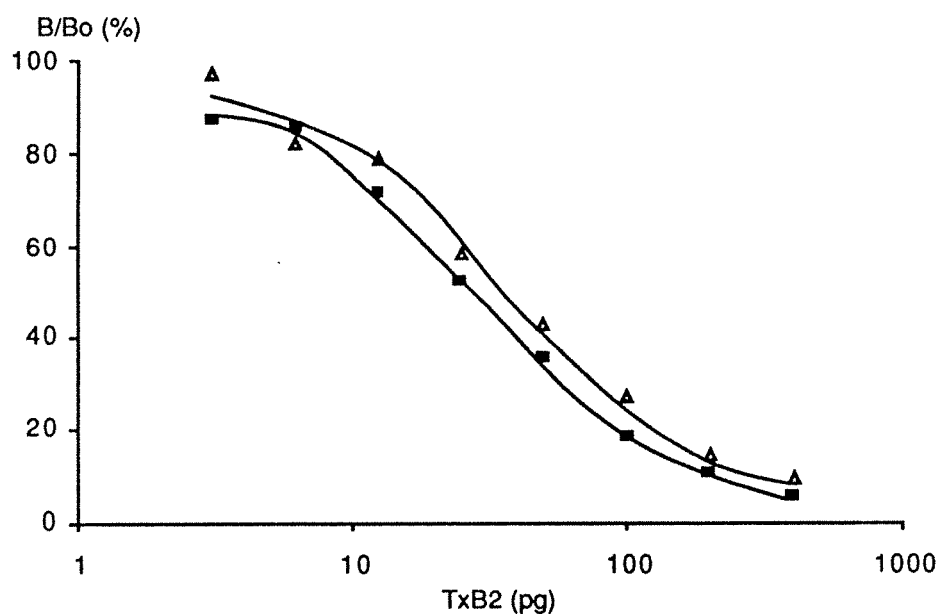


Figure 49 : Courbe de dosage utilisant le traceur iodé en compétition avec du thromboxane B₂ froid et fluorescent

■ : TxB₂ - AEF

Δ : TxB₂

Lorsque la quantité de TxB₂-AEF augmente, il y a diminution de la radioactivité enregistrée. Ceci reflète la reconnaissance effective du traceur par les anticorps. D'autre part la comparaison entre la courbe d'étalonnage et la courbe de dosage du traceur montre qu'il y a pratiquement superposition des deux courbes. Le TxB₂ fluorescent se fixe sur les anticorps dans les mêmes proportions que le TxB₂ étalon.

Le traitement des résultats par la méthode de Scatchard est représenté sur la figure 50.

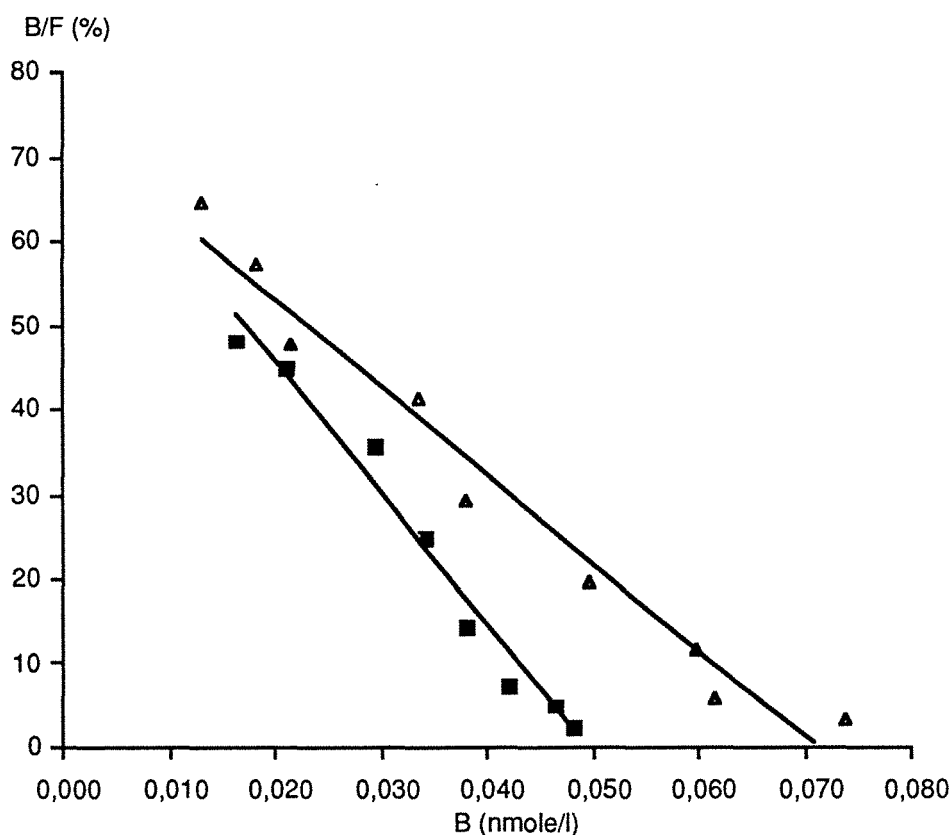


Figure 50 : Représentation de Scatchard du dosage utilisant le traceur iodé

■ : $TxB_2 - AEF$

Δ : TxB_2

Les données obtenues par le système de Scatchard sont regroupées dans le tableau XXV. Les calculs sont présentés dans l'annexe III.

Les constantes d'affinité ainsi que les concentrations en sites anticorps sont proches et confirment la conservation de l'immuno-reconnaissance de l'anticorps pour le traceur fluorescent malgré l'étape de modification de la structure du TxB_2 . La valeur du rapport des constantes d'affinité est de 1,52 ($\frac{K_a}{K_a \text{ réf}}$). Il n'y aura pas de modification notable du comportement de l'immunoréactivité du traceur (Ekins, 1974).

Ces résultats permettent également de confirmer l'estimation spectrophotométrique de la concentration en traceur fluorescent purifié puisque le pourcentage de traceur iodé déplacé correspond à celui estimé. Il y a bien une molécule de fluorescéine fixée par molécule de TxB_2 .

TABLEAU XXV
ANALYSE DE SCATCHARD DES DONNEES DU DOSAGE UTILISANT
LE TRACEUR IODE

	Equation	Coefficient de corrélacion	Ka	Concentration en sites Ac
Droite d'étalonnage	$Y = -1,04.10^{10} X + 0,74$	$r = 0,9847$	$1,04.10^{10} M^{-1}$	$7,1.10^{-11} M$
Droite en présence de TxB ₂ -AEF	$Y = -1,56.10^{10} X + 0,77$	$r = 0,9856$	$1,56.10^{10} M^{-1}$	$4,9.10^{-11} M$

II.1.1.2. Compétition en présence du traceur tritié

La molécule de TxB₂ marquée par du tritium n'a théoriquement pas subi de modification au niveau de la réaction de reconnaissance immunologique. Les sites reconnus par les anticorps ne sont pas masqués.

Le TxB₂ étalon ou le TxB₂ - AEF ont été mis en compétition avec le TxB₂ ³H. Les résultats donnant le pourcentage B/B₀ en fonction de la quantité croissante en TxB₂ sont représentés sur la figure 51.

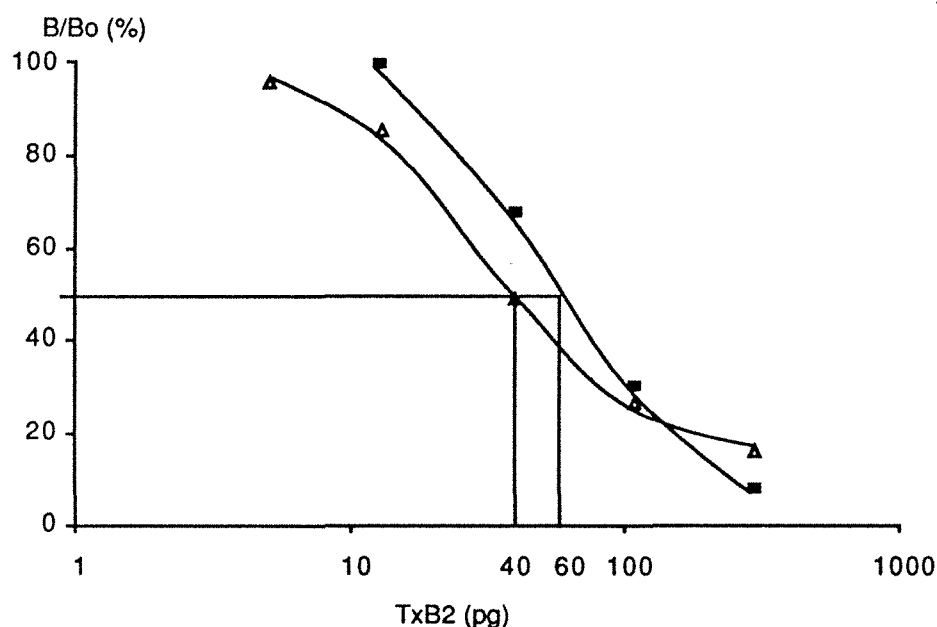


Figure 51 : Courbe de dosage utilisant le traceur tritié en compétition avec du thromboxane B₂ froid et fluorescent

■ : TxB₂ - AEF

Δ : TxB₂

Dans le cas étudié, le rapport des concentrations pour un B/B₀ de 50 % est proche de 70 %. Cependant les deux courbes sont parallèles, ceci pourrait être dû à la présence d'impuretés de la fluorescéine en faible quantité qui aurait conduit à une légère surestimation de la concentration en TxB₂ marqué. Cependant il est intéressant de voir que l'immunoréactivité du traceur fluorescent est peu différente de celle du traceur tritié.

Les courbes issues de la modélisation par la méthode de Scatchard sont représentées sur la figure 52. Les calculs sont regroupés dans l'annexe IV.

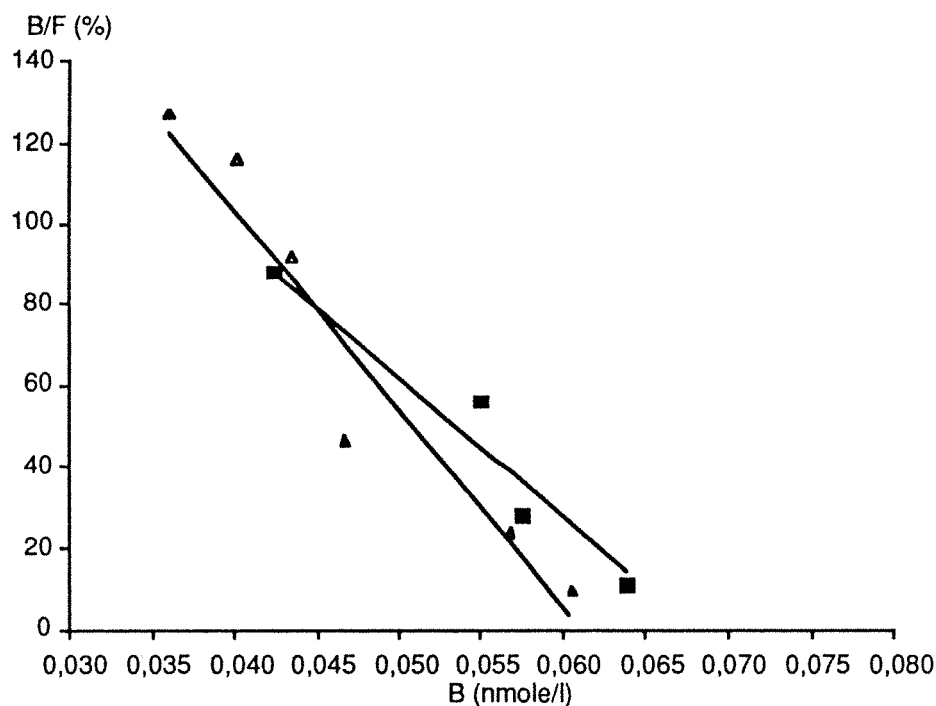


Figure 52 : Représentation de Scatchard du dosage utilisant le traceur tritié

■ : TxB_2 - AEF

Δ : TxB_2

Les valeurs obtenues pour la droite d'étalonnage ou pour le traceur fluorescent sont proches (tableau XXVI), ce qui confirme les résultats observés avec la trousse iodée. Les valeurs obtenues pour les deux trousse sont du même ordre de grandeur, ce qui laisse présager un comportement intéressant pour la mise au point du dosage par polarisation de fluorescence. Le rapport des constantes d'affinité (de 0,7) montre qu'il n'y a pas totale conservation de l'immunoréactivité, mais cette faible différence n'affectera pas la mise au point de l'immunodosage par polarisation de fluorescence : un rapport proche de 10^{-2} entrainerait une forte diminution de la sensibilité du dosage (Ekins, 1974).

TABLEAU XXVI
ANALYSE DE SCATCHARD DES DONNEES DU DOSAGE UTILISANT
LE TRACEUR TRITIE

	Equation	Coefficient de corrélacion	Ka	Concentration en sites Ac
Droite d'étalonnage	$Y = -4,89.10^{10} X + 2,99$	$r = 0,9377$	$4,89.10^{10} M^{-1}$	$6,1.10^{-11} M$
Droite en présence de TxB ₂ -AEF	$Y = -3,44.10^{10} X + 2,34$	$r = 0,9142$	$3,44.10^{10} M^{-1}$	$6,8.10^{-11} M$

II.1.2. Immunoréactivité vis à vis du traceur enzymatique

Le principe reste identique à celui des immunodosages utilisant des radio-isotopes. Le signal mesuré, l'absorbance à 412 nm, est inversement proportionnel à la quantité d'analyte présent. La figure 53 montre les résultats obtenus selon la représentation classique.

Alors que les anticorps utilisés dans les dosages par radio-immunologie étaient les mêmes que ce soit avec le traceur iodé ou tritié, une courbe dose-réponse est également obtenue pour la trousse immunoenzymologique comportant des anticorps provenant d'une autre société.

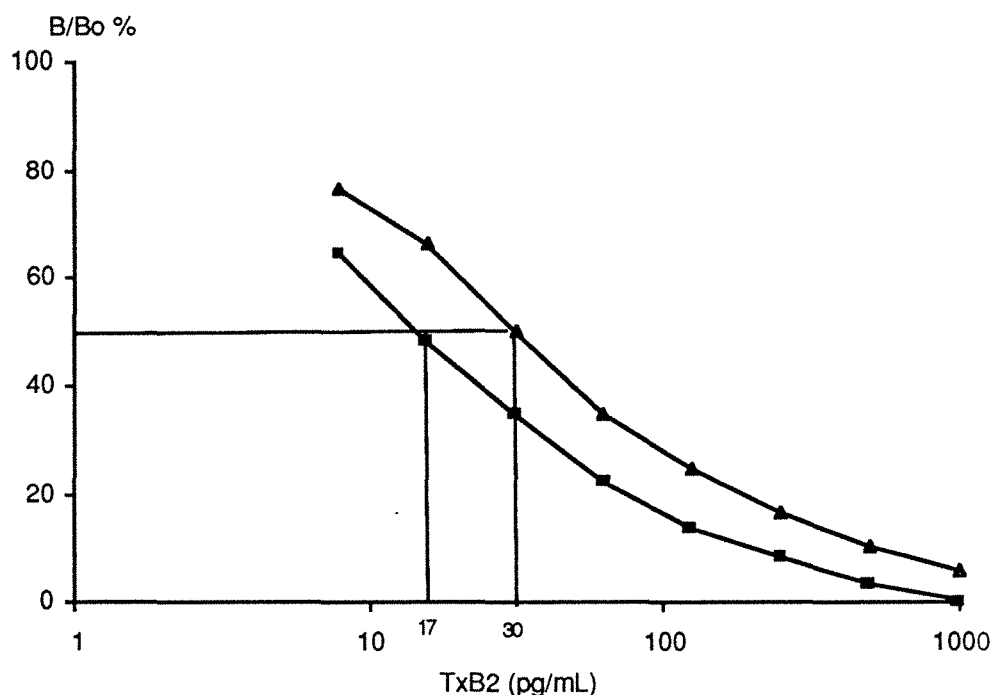


Figure 53 : Dosage du TxB₂-AEF par immunoenzymologie

■ : TxB₂ - AEF

Δ : TxB₂

Le pourcentage de croisement est voisin de 200 %. Le décalage des courbes peut correspondre à une meilleure affinité de l'anticorps pour le traceur fluorescent que pour l'antigène marqué par l'enzyme ou à une légère dégradation de la solution étalon ou à une faible sous estimation de la concentration en traceur fluorescent.

Il est possible que l'affinité des anticorps soit plus grande pour une molécule de thromboxane dérivée par l'AEF étant donné le mode d'obtention des anticorps. En effet, pour être immunogène, l'haptène doit être fixé sur une protéine porteuse. Ceci peut provoquer la formation d'une population d'anticorps dirigée contre le bras de liaison à cette molécule.

En conclusion, cette étude a permis de vérifier qu'il y avait bien une molécule d'AEF fixée par molécule de TxB₂. La méthode spectrophotométrique de quantification peut être utilisée comme indice de stabilité du dérivé purifié. D'autre part la conservation de l'immunoreconnaissance de la molécule de TxB₂ - AEF est mise en évidence, et ce avec une affinité proche de celle de

l'anticorps pour l'antigène non modifié. La dérivation n'a pas touché le site antigénique principal correspondant au cycle hémi-acétalique.

De par ses qualités spectrales et immunologiques le traceur paraît être intéressant pour la mise au point d'un dosage par polarisation de fluorescence.

II.2. Analyse du thromboxane B₂ par polarisation de fluorescence

Les études ayant été menées sur le second prototype de fluopolarimètre, il a fallu définir les conditions optimales de travail telles que la concentration en traceur fluorescent et le volume final de mesure.

L'étude identique à celle menée sur la PGE₁, a été complétée par une évaluation de la variation du signal d'anisotropie de fluorescence en milieu visqueux.

La concentration optimale en anticorps est déterminée par polarisation de fluorescence afin de procéder à la faisabilité de l'immunodosage.

II.2.1. Détermination de la concentration minimale de TxB₂-AEF détectable par polarisation de fluorescence

La figure 54 met en évidence l'influence de la dilution sur l'évolution de l'intensité du blanc témoin. Alors que l'anisotropie de fluorescence reste constante (0,08) le rapport I_b/I_f (I_b correspondant à l'intensité de fluorescence du blanc, I_f à l'intensité de la solution fluorescente) augmente pour atteindre 12 % pour la solution à 1 ng/ml. Cependant cette concentration ne peut pas être conservée pour la suite des études : l'intensité de fluorescence est telle que l'appareil ne "sait" pas choisir entre 2 gains d'amplification et l'ordinateur quitte le programme dans la majorité des mesures. Une concentration intermédiaire à 1,6 ng/ml est un bon compromis entre la stabilité du signal d'anisotropie et une concentration minimale.

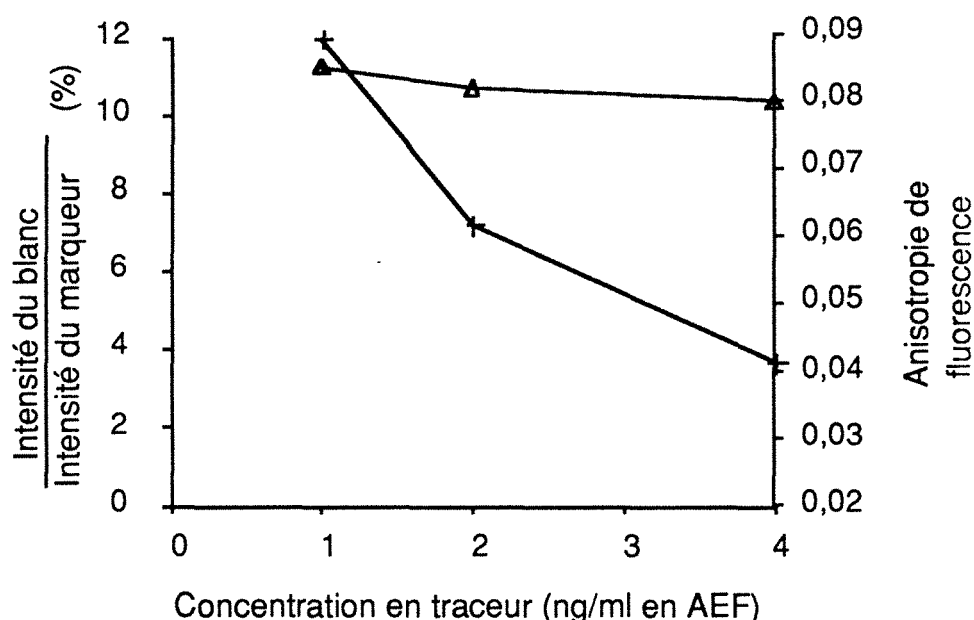


Figure 54 : Evolution de l'anisotropie de fluorescence et de l'intensité de fluorescence du blanc en fonction de la concentration du traceur

+ : I_b / I_f (%)

Δ : Anisotropie de fluorescence

Cette concentration choisie laisse supposer qu'une limite de détection de l'ordre du pg/ml sera difficilement atteinte. Etant données les limites de détection de l'appareil, il n'est doré et déjà pas envisageable de doser le TxB₂ dans le domaine de concentration plasmatique physiologique. Cependant la mise au point du test reste intéressante pour des analyses pharmacologiques d'activation plaquettaire.

II.2.2. Influence de la viscosité du milieu de mesure

L'équation de la loi de Perrin montre que l'inverse de l'anisotropie évolue dans le même sens que l'inverse de la viscosité du milieu de mesure, et ce de façon linéaire pour des molécules totalement sphériques. Cependant cette situation se rencontre rarement. Des entorses à la loi sont fréquemment observées et en particulier pour des dérivés de la fluorescéine dans des solutions glycérol / eau à différentes concentrations (Dandliker et de Saussure, 1970).

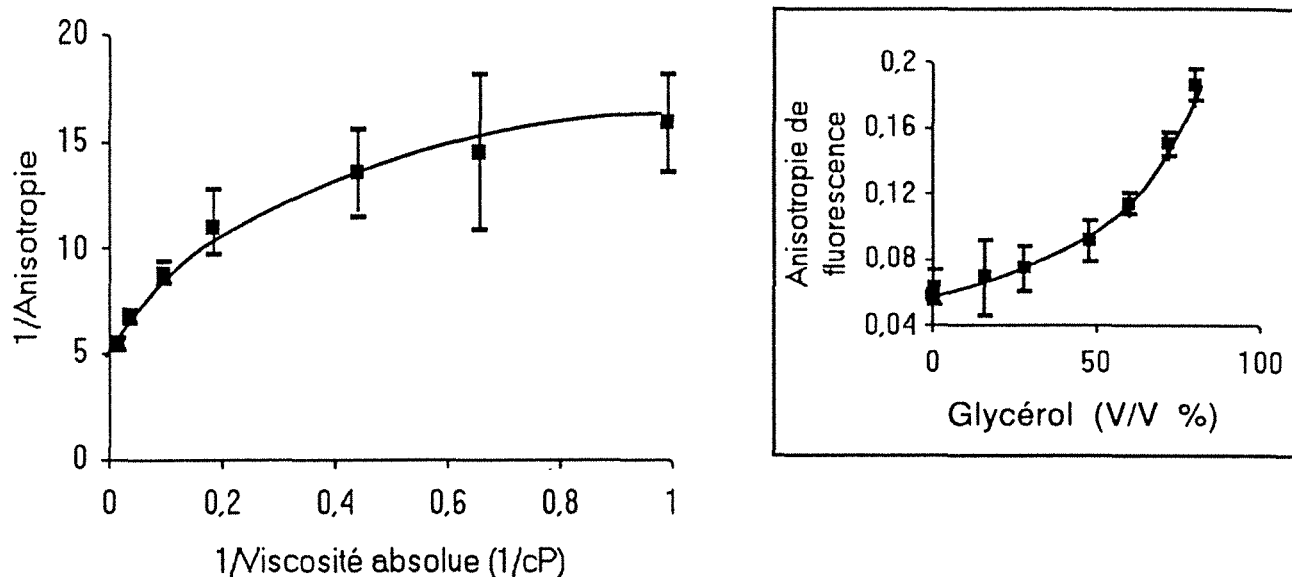


Figure 55 : Influence de la viscosité du milieu sur l'anisotropie de fluorescence (n = 3)

Lorsque la viscosité du solvant contenant le fluorophore augmente, la polarisation de fluorescence émise augmente également (encart de la figure 55). La représentation de l'inverse de l'anisotropie en fonction de l'inverse de la viscosité permet de vérifier l'évolution du système par rapport à l'équation de Perrin.

Il est possible d'exprimer cette équation selon le modèle suivant :

$$\frac{1}{r} = \frac{1}{r_0} + \frac{RT\tau}{Vr_0} \times \frac{1}{\eta}$$

L'anisotropie limite r_0 de l'équation de Perrin est une valeur empirique obtenue en l'absence de tout mouvement brownien. Elle est normalement calculée grâce à l'intercept de l'axe des ordonnées (pour $1/\eta = 0$).

La représentation de Perrin est linéaire sauf dans certaines conditions :

- lorsque la durée de vie est dépendante de la température ou lorsque la viscosité du milieu est modifiée. Une diminution de la durée de vie avec une augmentation du rapport T/η produit une courbure concave par rapport à l'axe des abscisses
- l'apparence de nouveaux temps de relaxation rotationnelles lorsque T/η varie provoque une courbure convexe par rapport à l'axe des abscisses. Ce phénomène peut provenir par exemple de la dissociation des sous unités d'une macromolécule, de l'asymétrie formée par l'association du marqueur à l'analyte ou de mouvements de rotation supplémentaires provoqués par une activation thermique.

La non linéarité de la représentation de Perrin des résultats obtenus relève de la deuxième hypothèse. Elle pourrait être due à une variation de la flexibilité du TxB₂ - AEF liée à la présence de glycérol modifiant la viscosité (Dandliker 1970). Toutefois, il n'est pas exclu qu'une variation de la durée de vie de l'AEF intervienne également.

La courbe de la figure 55 peut être divisée en deux parties fonctions de la viscosité, ce qui permet de calculer la valeur de l'anisotropie limite sous différentes conditions :

- dans le cas d'une viscosité faible (<10 cP) la droite de régression est :

$$Y = 5,87 X + 10,39, r = 0,9717. \text{ L'anisotropie limite est de } 0,096 (1/10,39).$$

- la droite de régression pour les viscosités élevées (> 10 cP) est :

$$Y = 42,07 X + 4,89, r = 0,9876. \text{ La valeur de } r_0 \text{ obtenue est alors } 0,205 (1/4,89).$$

Cette dernière valeur est plus en accord avec la valeur maximale de polarisation de fluorescence que peut prendre un fluorochrome ayant son dipôle d'excitation et d'émission parallèles (cas de la fluorescéine) qui est de 0,333, soit une anisotropie limite de 0,250 (Entwistle et Noble, 1992).

Un infléchissement de la courbe a également été observé par Perrin pour la fluorescéine et pour d'autres fluorophores dans des mélanges glycérol-eau à différentes viscosités inférieures à 10 centipoises.

Néanmoins, au vu de ces résultats, l'obtention d'une restriction de la rotation de la fluorescéine par le biais de l'augmentation de la viscosité peut laisser penser que ce phénomène se produira lorsque le traceur sera mis en présence d'anticorps reconnaissant la biomolécule.

II.2.3. Détermination de la concentration en anticorps

L'utilisation d'anticorps commercialisés pour des dosages radioimmunologiques nécessite une adaptation de leur concentration pour une utilisation en polarisation de fluorescence. Aucune donnée concernant la concentration en anticorps étant fournie, un volume de reconstitution des flacons a été estimé par rapport aux caractéristiques du système RIA décrit sur la fiche technique : 500 μ l d'un flacon reconstitué à 50 ml permet de lier 40 % de 10 picogrammes du thromboxane tritié, soit 4 picogrammes. La concentration de TxB₂ marqué par la fluorescéine étant de 1,6 ng/ml dans chaque tube, il faut utiliser des quantités plus importantes en anticorps pour observer une augmentation d'anisotropie.

Une reconstitution des flacons avec un volume plus faible (0,6 ml) a été pratiquée.

La figure 56 représente les résultats obtenus pour la variation d'anisotropie en fonction du volume d'antisérums ajouté.

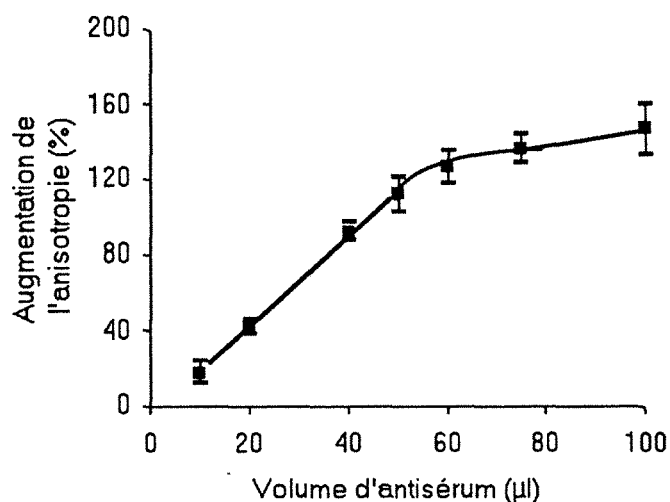


Figure 56 : Variation de l'anisotropie en fonction du volume d'antisérum
(n=3)

Une augmentation de l'anisotropie est observée en fonction de la quantité d'antisérum. Ceci permet de montrer que la reconnaissance des anticorps pour le TxB₂ provoque effectivement une diminution des mouvements browniens de rotation, entraînant une variation du signal d'anisotropie. La différence existant entre l'anisotropie maximale (traceur totalement lié) et l'anisotropie minimale (traceur totalement libre) est représentative de la qualité de l'immunodosage. Cette différence voisine de 0,130 est fonction de la molécule fluorescente et de la nature de l'antisérum (Jolley, 1981).

Un volume de 50 µl d'antisérum provoque une variation d'anisotropie correspondant à 50 % de la valeur de l'anisotropie maximale. Cette concentration est un bon compromis entre la nécessité de doser la plus petite concentration possible en TxB₂, la reproductibilité du signal et la gamme de variation d'anisotropie permettant une meilleure "sensibilité" du dosage.

**Les conditions expérimentales pour l'étude des courbes d'étalonnages
sont fixées ainsi :**

- concentration finale en traceur de $3,5 \cdot 10^{-9}$ M
- volume d'antisérum de 50 µl par essai pour un flacon reconstitué à 0,6 ml

II.2.4. Courbes d'étalonnages en milieu tampon et en milieu plasmatique

Afin de vérifier la validité du dosage du TxB₂, différentes courbes d'étalonnages sont effectuées tant en milieu synthétique (tampon PBS/BSA) qu'en présence de plasma d'origine humaine.

Les mesures d'anisotropie sont effectuées contre un blanc contenant la même quantité d'antisérum que dans l'essai. Il n'y a pas de variation d'anisotropie mais l'intensité du blanc est légèrement augmentée (0,41 au lieu de 0,36 UA).

II.2.4.1. Milieu tampon

Une courbe d'étalonnage classique obtenue est représentée sur la figure 57. Elle correspond à la représentation des variations d'anisotropie en fonction de la concentration en analyte. Chaque point est la moyenne de 5 mesures

effectuées pendant 20 secondes. Les écarts types correspondent aux variations du signal des mesures.

Le fait de compléter à 1 ml le volume des cuves juste avant la mesure d'anisotropie ne modifie pas l'équilibre pendant la durée de la lecture : aucune variation notable du signal n'est observée entre le début et la fin de la mesure.

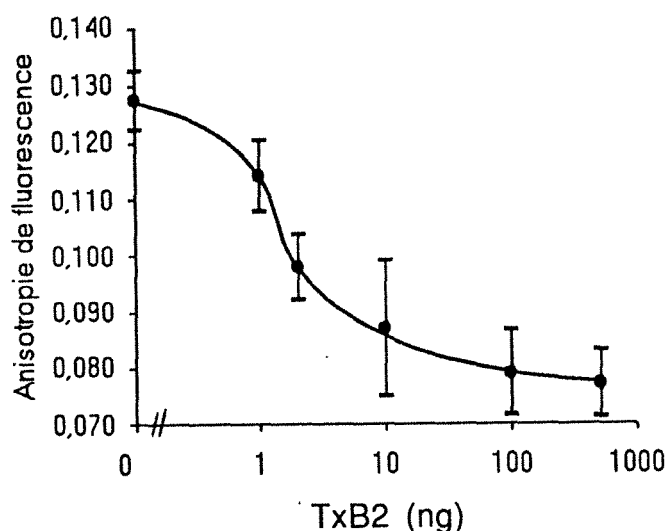


Figure 57: Courbe d'étalonnage d'un dosage par polarisation de fluorescence du thromboxane B₂

Les écarts types correspondent aux variations du signal sur les 5 mesures effectuées

Une courbe dose réponse peut être facilement obtenue, elle ne nécessite pas de séparation des complexes des formes libres ni de longues étapes d'incubation. Elle est de 2 heures au lieu de 24 heures pour un dosage en RIA.

Une diminution d'anisotropie est obtenue pour des concentrations croissantes en TxB₂. Le dosage permet de déterminer des quantités de TxB₂ comprises entre 0,5 et 100 ng avec un maximum de précision : c'est entre ces deux concentrations que la pente de la courbe est maximale. Cependant des mesures supplémentaires sont nécessaires afin d'affiner les résultats.

Plusieurs courbes étalons ont été effectuées en "inter-jours". La figure 58 montre la courbe correspondant à la moyenne des résultats. Ils sont

exprimés en terme de variation d'anisotropie étant donné la variabilité du signal observée dans les conditions de travail. Les coefficients de variation n'apparaissent pas sur le graphique : le nombre de mesures n'est pas identique pour tous les points. Il ne faut retenir de la courbe que l'allure générale : pour avoir un maximum de précision lors d'un dosage, il faut systématiquement effectuer une courbe étalon du fait de la variabilité des mesures.

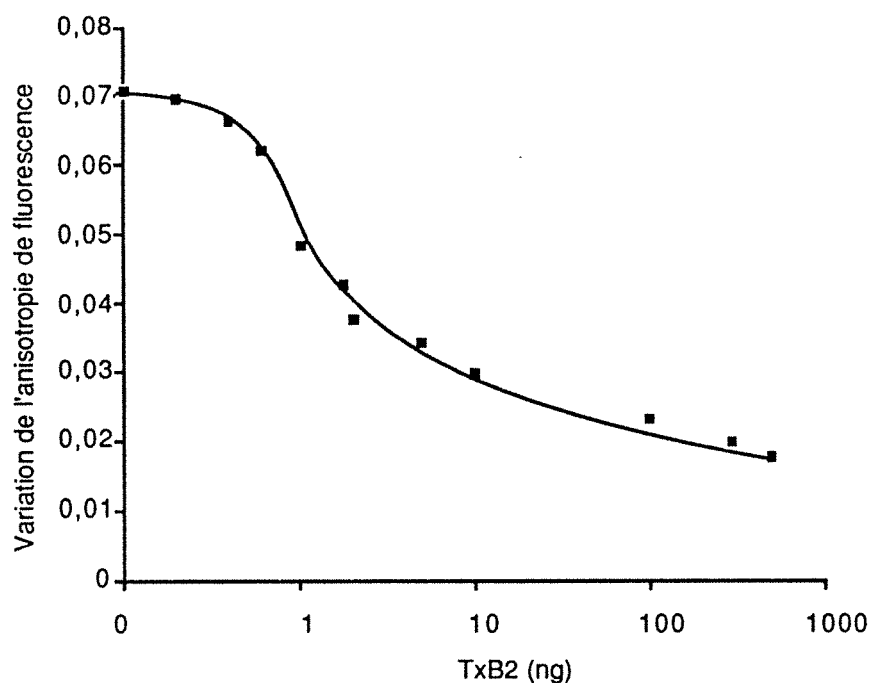


Figure 58 : Courbe étalon du dosage par polarisation de fluorescence du thromboxane B₂. Moyenne des résultats cumulés (n≥3)

La forme sigmoïde de la courbe rappelle celle obtenue pour un dosage en RIA ou par immunoenzymologie. Le maximum de précision peut en être obtenu pour des concentrations se situant entre 500 pg et 10 ng par tube. Bien que les écarts sur les mesures soient importants d'une journée sur l'autre (20 à 30 % de différence sur l'ensemble des points de la courbe), les résultats cumulés confirment les résultats obtenus en "intra-jour". La plus grande variation d'anisotropie est obtenue pour des domaines de concentration similaires.

Il est également possible d'exprimer les résultats par la méthode de Scatchard. Les calculs qui ont conduit à établir les courbes de la figure 59 sont décrits en annexe V.

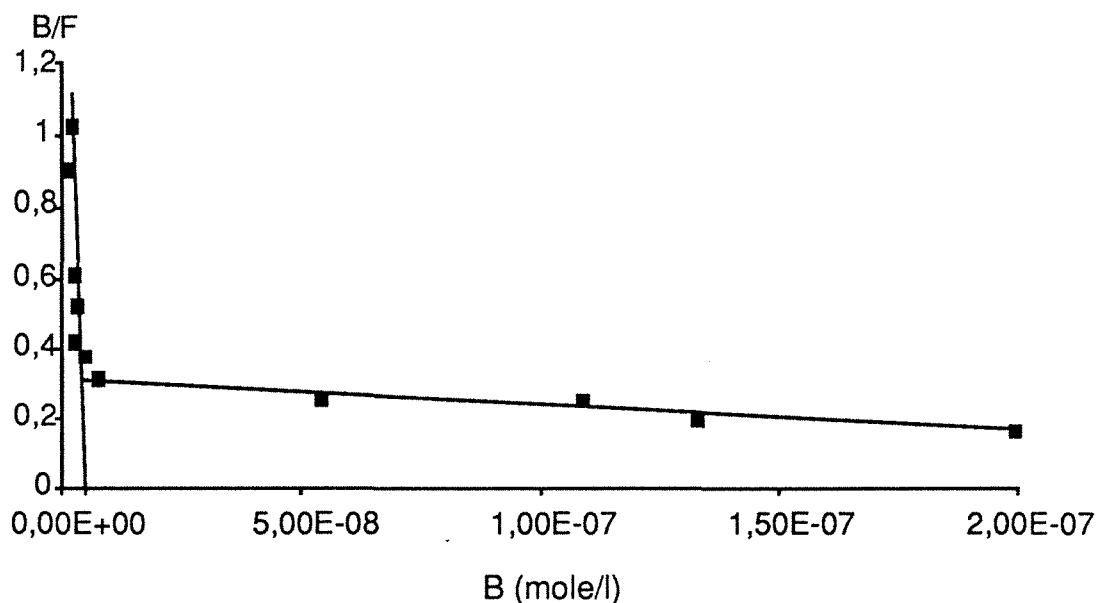


Figure 59 : Représentation de Scatchard de la courbe d'étalonnage

La première analyse qui peut être faite concerne l'absence de linéarité dans la représentation de Scatchard. Ce phénomène est observé également en RIA lorsque les anticorps présentent une forte hétérogénéité quant à l'affinité des sites de reconnaissance.

Il est possible de distinguer deux parties dans la courbe :

- une partie correspondant à des sites anticorps de "forte" affinité (pente de la courbe importante)
- une partie correspondant à des sites anticorps de "faible" affinité (faible pente de la courbe)

Les résultats obtenus concernant les paramètres de la réaction sont rassemblés dans le tableau XXVII.

TABLEAU XXVII
ANALYSE DE SCATCHARD DE LA COURBE D'ÉTALONNAGE
PAR POLARISATION DE FLUORESCENCE

	Equation	Coefficient de corrélation	Ka	Concentration en sites Ac
1 ^{ère} partie de la droite d'étalonnage	$Y = -0,9 \cdot 10^9 X + 3,2$	$r = 0,9881$	$0,9 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$	$3,6 \cdot 10^{-9} \text{ M}$
2 ^{ème} partie de la droite d'étalonnage	$Y = -0,7 \cdot 10^6 X + 0,31$	$r = 0,9441$	$0,7 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$	$4,3 \cdot 10^{-7} \text{ M}$

Les deux populations de site ont des constantes d'affinité bien distinctes : elles diffèrent d'un rapport d'environ 1000. Cette situation est souvent rencontrée lors de l'utilisation d'anticorps polyclonaux non purifiés. Ceci a pour effet une légère diminution de la sensibilité et de la limite de détection du dosage mais n'influence pas vraiment l'immunodosage par polarisation de fluorescence, son domaine de concentration s'écartant de celui qui était recherché.

II.2.4.2. Comparaison de la courbe d'étalonnage obtenue en milieu tampon et plasmatique

Afin de limiter la quantité d'anticorps utilisée, il a été choisi de travailler sur un nombre restreint de points : 0, 1, 2, 5, 10, 20 ng de TxB₂ en solution dans du tampon PBS ou dans le plasma. Ces points correspondent à la partie de la courbe où la variation d'anisotropie est la plus importante.

Afin de travailler dans des conditions les plus proches d'un dosage plasmatique, du plasma a été surchargé par le TxB₂. Le tableau XXVIII regroupe les valeurs d'anisotropie de fluorescence obtenues sur un essai d'inhibition en présence de plasma surchargé.

TABLEAU XXVIII
INFLUENCE DU PLASMA SUR LES VALEURS D'ANISOTROPIE
ET D'INTENSITE DE FLUORESCENCE

Quantité en TxB ₂ (ng)	Anisotropie dans le tampon	$\frac{\text{Intensité du blanc}}{\text{Intensité essai}}$ (%)	Anisotropie dans le plasma	$\frac{\text{Intensité du blanc}}{\text{Intensité essai}}$ (%)
0	0,127	14,7	0,128	25,8
2	0,109	13,8	0,113	26,0
5	0,101	13,0	0,134	24,0
10	0,098	14,0	0,121	24,0
20	0,093	13,4	0,131	24,0
Témoin	0,055	10,7	0,090	24,0

Alors qu'en milieu tampon une diminution de l'anisotropie est obtenue en fonction de la quantité en TxB₂ en compétition avec le traceur, il est impossible d'exploiter les résultats dès que l'ajout du compétiteur se fait dans le plasma. L'augmentation de l'intensité de fluorescence du blanc contenant du plasma montre l'influence des protéines plasmatiques sur la mesure. La présence de ces protéines ainsi que de la bilirubine, augmentent la diffusion de la lumière parasite. L'ultrafiltration éliminant les molécules dont la masse moléculaire est supérieure à 5000 permet d'obtenir un ultrafiltrat parfaitement limpide et incolore.

Cette étape permet de retrouver des intensités de blanc comparables au dosage en milieu tampon (de l'ordre de 14 %). Ces résultats confirment également qu'il n'est pas possible de travailler lorsque l'intensité de fluorescence du blanc est trop importante par rapport à l'essai donc pour des concentrations trop faibles en traceur.

Les courbes d'étalonnage obtenues, après surcharge du plasma ultrafiltré et en milieu tampon, sont représentées sur la figure 60.

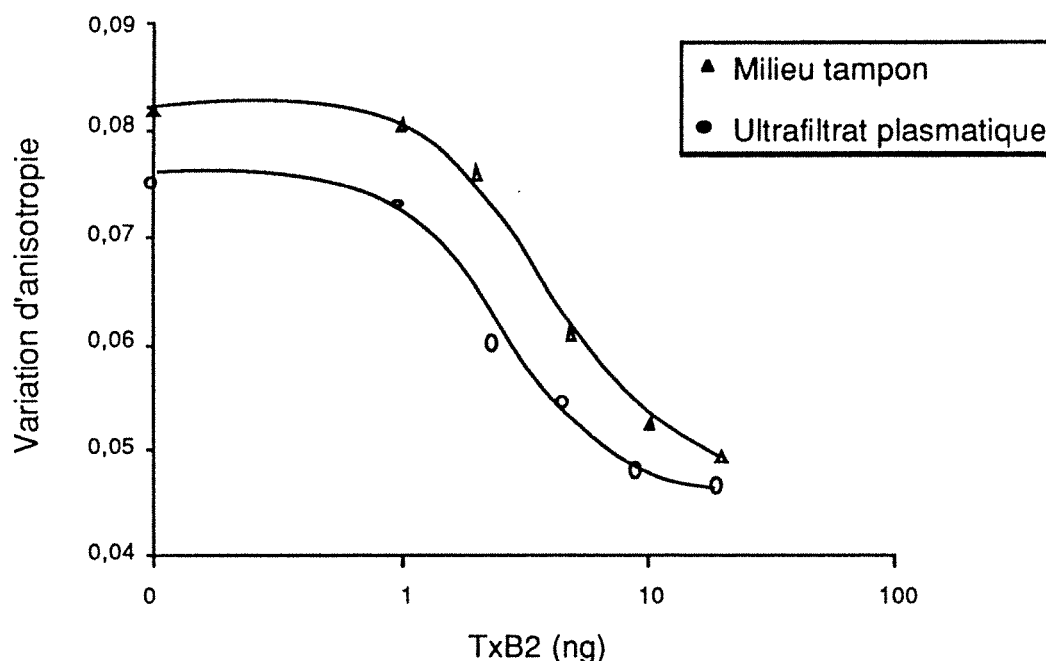


Figure 60 : Comparaison de la courbe d'étalonnage en milieu plasmatique ultrafiltré et dans le tampon PBS/BSA
(moyenne de deux expériences)

Grâce à la présence de plasma déplété en protéines de masse molaire élevée, il est possible d'observer une courbe de compétition : la présence des autres composants du plasma n'empêche pas les mesures du signal d'anisotropie. Cependant les courbes ne sont pas totalement superposables. Le déplacement observé peut être dû soit à des composants du plasma purifié qui influeraient sur la mesure, soit à la présence de TxB₂ en quantité non négligeable dans le plasma suite au prélèvement sanguin. En fait seule la deuxième possibilité semble être plausible, l'adjonction de plasma dans le tube témoin contenant le traceur ne modifiant pas la valeur d'anisotropie. Il aurait fallu disposer de plasma dépourvu en TxB₂ pour pouvoir confirmer cette hypothèse.

II.2.5. Cinétique de la réaction

La polarisation de fluorescence permettant de donner directement le rapport B/F sans devoir séparer ces deux formes pour la mesure du signal, la mesure directe de l'anisotropie de fluorescence en fonction du temps informe sur l'état d'avancement de la réaction antigène - anticorps. La vitesse de formation du complexe, à température déterminée, est fonction de l'affinité

de l'antisérum. Elle va conditionner la durée d'incubation : elle doit être la plus courte possible.

Dans un premier temps le traceur est mis à incuber en présence de l'antisérum, des mesures d'anisotropie étant effectuées à intervalle régulier. La figure 61 montre la cinétique de formation du complexe Tx_B₂-AEF / anticorps. La variation de l'intensité de fluorescence en fonction du temps y est également représentée.

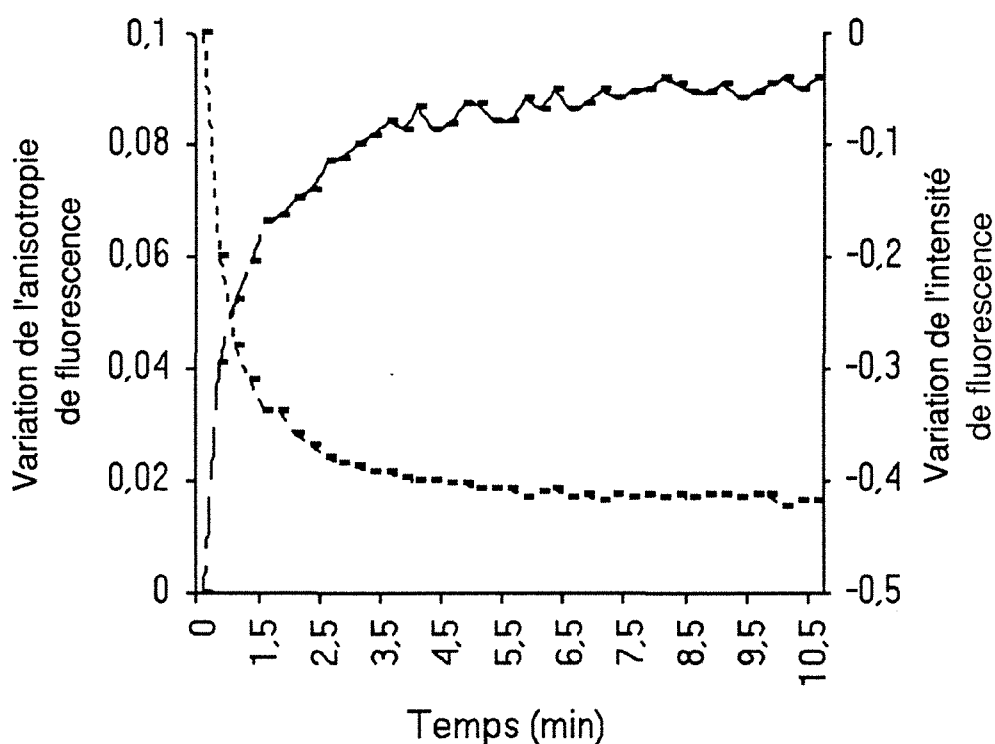


Figure 61 : Cinétique de la réaction antigène-anticorps par polarisation de fluorescence

— — — : Anisotropie de fluorescence
 - - - - : Intensité de fluorescence

Au bout de 5 minutes la variation d'anisotropie atteint un plateau maximal. Ce temps pourrait suffir lors de l'étape d'incubation de l'antigène marqué par la fluorescéine. Il est cependant préférable de la prolonger à une heure lors d'un dosage sinon il peut en résulter une diminution importante de la spécificité.

L'évolution de l'intensité de fluorescence est inverse de celle de l'anisotropie : au fur et à mesure de l'avancement de la réaction l'intensité de fluorescence diminue. Ceci n'est pas dû à une éventuelle photo-dégradation de la fluorescéine comme cela pourrait le laisser supposer, l'échantillon étant exposé un long moment sous le faisceau lumineux. Le déplacement du traceur par l'analyte augmente l'intensité de fluorescence (figure 62). Tout comme il avait été observé lors du dosage de la PGE_1 , ce processus est provoqué par un quenching de fluorescence dû à la liaison du traceur à l'anticorps. Cette constatation a également été faite par Dandliker (Dandliker et Feigen, 1961) lors de l'étude de la réaction Ag-Ac par polarisation de fluorescence. Il l'explique comme étant dû à la juxtaposition de la molécule de fluorescéine avec l'anticorps. Ceci permet de créer des conditions favorables à une perte d'énergie lors du processus d'excitation avant que n'ait lieu le phénomène de fluorescence.

Cependant ce processus n'est pas à généraliser à tous les immunodosages. Selon le fluorophore, une augmentation de l'intensité peut être observée ou aucune variation du signal (Jolley, 1981).

La vitesse d'association ou de dissociation peut être exprimée par une constante : $t_{1/2}$ (temps de demi association ou dissociation) indépendante de la concentration en analyte (Bourdon et Bourdon Ranisténao, 1983). Elle est de 2,5 minutes environ pour la vitesse d'association de l'anticorps pour le traceur TxB_2 - AEF.

Une deuxième étape a concerné le suivi de la cinétique de compétition après ajout de TxB_2 non marqué (figure 62).

Une incubation séquentielle permet d'abaisser la limite de détection de l'immunodosage.

L'anisotropie diminue rapidement en présence du compétiteur pour atteindre une vitesse de décroissance plus stable au bout de 20 minutes.

Cependant l'équilibre est plus long à atteindre que pour la première étape.

Une période d'incubation d'une heure après ajout de l'analyte est nécessaire étant donné la stabilité du complexe TxB_2 -AEF/Ac.

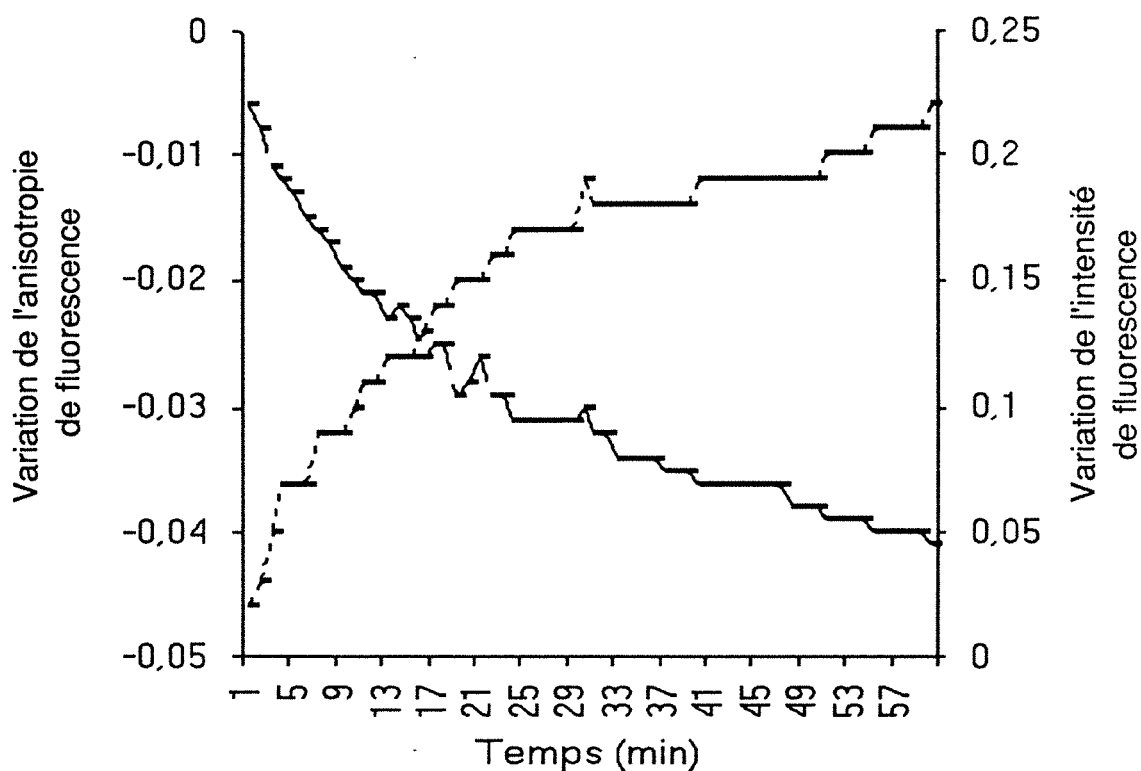


Figure 62 : Suivi de la cinétique de compétition par polarisation de fluorescence

— — — : *Anisotropie de fluorescence*
 - - - - - : *Intensité de fluorescence*

Il n'est pas utile de prolonger l'incubation, la faible dérive du signal observée au bout de ce temps ne modifiant pas le dosage. Cette situation permet difficilement de déterminer avec précision la valeur de $t_{1/2}$ de dissociation, l'affinité de l'anticorps étant identique pour le traceur et l'analyte.

Les conditions expérimentales pour un dosage par polarisation de fluorescence du TxB₂ sont fixées ainsi :

- concentration finale en traceur de $3,5 \cdot 10^{-9}$ M
- volume d'antisérum de 50 μ l par essai pour un flacon reconstitué à 0,6 ml
- incubation 1 heure avant et après l'ajout de l'étalon ou de l'essai

II.2.6. Dosage du thromboxane B₂ après stimulation du plasma riche en plaquettes

Après avoir déterminé les conditions optimales pour la réalisation d'un dosage de TxB₂ par polarisation de fluorescence, la méthodologie est appliquée à la détermination de la concentration en TxB₂ libéré par un PRP sous l'action d'un agent proagrégant. La courbe d'étalonnage ainsi que les points correspondant au dosage sont représentés sur la figure ci-dessous.

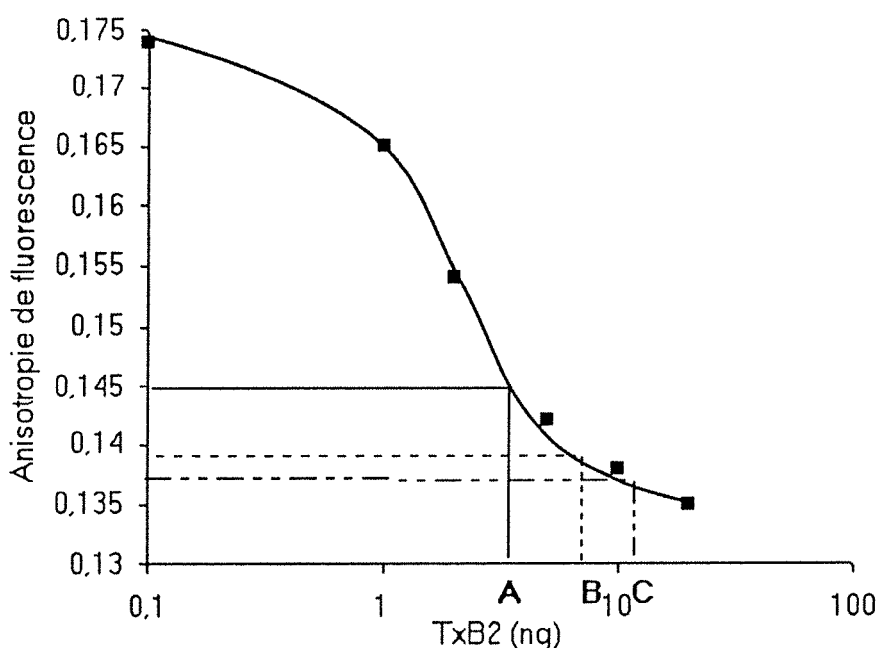


Figure 63 : Dosage du thromboxane B₂ plaquettaire par polarisation de fluorescence

A : 50 µl de PRP dilué au 1/10 dans le tampon PBS/BSA

B : 50 µl de PRP dilué au 1/5 dans le tampon PBS/BSA

C : 50 µl de PRP dilué au 1/3 dans le tampon PBS/BSA

La quantité de TxB₂ déterminée par polarisation de fluorescence à partir des trois dilutions est de **670 ± 26 ng / 5.10⁸ plaquettes / heure** en présence de thrombine. Cette valeur correspond à la moyenne des 3 points A, B, C. La quantité de TxB₂ libérée par les cellules dépend de l'agent proagrégant (thrombine, acide arachidonique, collagène) ainsi que du donneur de sang

(effet des médicaments...). Les valeurs de TxB_2 estimées par le dosage par polarisation de fluorescence ne s'écartent pas de celles données dans la littérature : environ $500 \text{ ng} / 5.10^8$ plaquettes / heure ont été estimées par RIA dans des conditions similaires d'incubation (Best et coll., 1980).

III. CONCLUSIONS

Après avoir étudié l'immunoréactivité du TxB_2 dérivé par l'AEF, la praticabilité du dosage par polarisation de fluorescence est montrée. Cependant des limites apparaissent. Il n'est pas possible d'appliquer le dosage à la détermination de la concentration physiologique de TxB_2 circulant étant donné les limites du dosage. Le dosage est malgré tout possible directement sur des ultrafiltrats plasmatiques après élimination des protéines endogènes.

Bien que ne présentant pas les caractéristiques de seuil de détection des radio-immunodosages, le dosage du TxB_2 par polarisation de fluorescence reste intéressant en raison de sa rapidité et sa facilité de mise en oeuvre. Il peut être appliqué à la détermination des taux plasmatiques pathologiques ainsi qu'au suivi de l'influence de médicaments sur les plaquettes et ainsi sur la synthèse de TxA_2 . Une amélioration du système actuel (protocole, reproductibilité de l'appareillage) permettrait d'abaisser encore les limites du dosage.

Pour une utilisation en routine du dosage, il serait utile de s'orienter vers un réactif unique se composant du mélange d'anticorps et du traceur. Il est possible ainsi d'améliorer les résultats grâce à la facilité de manipulation et à la simplicité du protocole.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

caractéristiques spectrales du traceur. Les performances du dosage ne pourront être évaluées que dans cette limite puisqu'il n'est pas possible de "jouer" sur les caractéristiques de l'affinité des anticorps commerciaux. Il serait nécessaire d'envisager la production et la purification d'anticorps.

Le marqueur présentant les meilleures potentialités d'application est la fluorescéine. Cependant son utilisation pour le greffage d'acides carboxyliques a nécessité une modification de sa structure étant donné la faible réactivité des marqueurs actuellement commercialisés. Il a fallu fonctionnaliser la fluorescéine de telle façon qu'elle présente une amine primaire réactive dans le but de réaliser une amidification. La réactivité de la fonction isothiocyanate de la molécule de FITC pour la fonction amine a permis d'obtenir un marqueur avec un grand rendement en la fixant sur une molécule d'éthylène diamine.

Cependant, il n'était pas possible de réaliser directement la dérivation sur la molécule de TxB_2 du fait de sa fragilité et de son coût : la réaction a dû être optimisée pour une dérivation de l'ordre du mg de substrats.

Différents systèmes de catalyse ont été étudiés pour la dérivation d'un acide gras modèle, l'acide palmitique. L'emploi d'un catalyseur couramment appliqué à la synthèse peptidique, l'EDC-HCl, couplé à un inhibiteur des réactions de racémisation, l'HOBt, a conduit au meilleur rendement. Après une optimisation des conditions de dérivation, le couplage a été confirmé sur l'acide stéarique.

Avant d'envisager l'application de la dérivation ainsi que le développement de l'immunodosage au TxB_2 , un pré-développement de la méthodologie a été évalué sur une prostaglandine, la PGE_1 , son origine commune et sa stabilité en faisant un bon modèle. La conservation de l'immunoréactivité du traceur PGE_1 - AEF a été montrée par le traitement des résultats obtenus en RIA par la méthode de Scatchard.

Il a ensuite été possible de développer l'immunodosage par polarisation de fluorescence. Afin de déterminer les capacités de la technique et de l'appareillage, une étude dans des conditions "limites" d'utilisation a permis de montrer qu'il était possible de mesurer avec précision une

quantité de PGE₁ de l'ordre du ng dans un milieu artificiel. Cette valeur s'éloigne du domaine de détermination recherché. Mais dans l'état actuel de la technologie, il n'est pas possible d'abaisser cette limite. Cependant, il apparaît qu'un facteur de 10 à 100 a été gagné par comparaison aux immunodosages développés par cette même technique.

Tout en connaissant les limitations du dosage, l'optimisation a été poursuivie pour le TxB₂. Il est possible d'envisager l'application de ce dosage à la détermination de l'activité d'inhibiteurs de synthèse du TxA₂. Dans ce cas, la concentration en TxB₂ libéré par les plaquettes est comprise entre le ng/ml et plusieurs centaines de ng/ml.

Après l'obtention du dérivé fluorescent du TxB₂, l'immunoréactivité du traceur a été comparée aux traceurs radioactifs et enzymatique. Les conditions de dérivation n'ont pas modifié la reconnaissance par les anticorps, il y a eu conservation du site immunoréactif du TxB₂ puisque les constantes d'affinité déterminées pour les droites d'étalonnages et le traceur fluorescent étaient du même ordre de grandeur.

Il a ensuite été procédé à la mise au point de l'immunodosage par polarisation de fluorescence. L'établissement de courbes de dosage en milieu "synthétique" a pu être effectué. L'application au milieu plasmatique après élimination des protéines endogènes laisse présager diverses applications du dosage telles que la détermination des concentrations plasmatiques pathologiques ou le dosage du TxB₂ après stimulation plaquettaire. Cette dernière application a été vérifiée. Les résultats obtenus ont montré une bonne corrélation avec les résultats décrits dans la littérature.

La praticabilité de l'immunodosage a été montrée. Il serait possible d'abaisser la limite de détection (actuellement de l'ordre de 0,5 ng) en optimisant la quantité de traceur par une diminution du volume final de la cuve de lecture, et par là même, une diminution du volume d'antisérum anti-TxB₂. L'évaluation d'anticorps provenant d'autres sociétés ainsi que leur purification permettraient de gagner un facteur 2 à 5 mais ce ne serait pas sans conséquence sur la reproductibilité des mesures. Une possible amélioration du système de traitement du signal du fluopolarimètre pourrait minimiser cet inconvénient.

Il serait également possible de transposer le dosage du TxB₂ à ses métabolites urinaires : le 11-déhydro TxB₂ ou le 2,3-dinor TxB₂. Dans ce cas La limite de détection obtenue serait suffisante pour la mesure des concentrations physiologiques (de 250 à 1500 pg/ml selon le métabolite).

Une amélioration des résultats pourrait être également obtenue en diminuant les variabilités liées à la manipulation : une automatisation des étapes de dilution et de préparation des échantillons comme il est fait sur l'appareil commercialisé par la société Abbott réduirait les écarts. Le passage à un réactif unique composé du mélange d'anticorps et du traceur conforterait également cette perspective.

ANNEXES

ANNEXE I

Analyse selon Scatchard des résultats de l'immunoréactivité du traceur PGE₁ - AEF par RIA (³H)

V (en ml) du Total =	1
V (en ml) du standard=	1,05
V de PGE1 =	0,1
[Ag*] ₀ (en mol/l)=	3,37.10 ⁻¹⁰
Activité de Ag* (Ci/mol) =	40000
Rendement du comptage =	0,4

Tube	CPM	[PGE1] (pg/ml)	[PGE1] Total	b-N/T-N	B	B/F (%)
TOTAL	12200					
NSB	220					
Bo	5000	0	0,337	0,399	0,135	66,39
S1	4800	82	0,359	0,382	0,137	61,89
S2	4600	248	0,404	0,366	0,148	57,63
S3	3800	740	0,536	0,299	0,160	42,62
S4	2600	2220	0,934	0,199	0,185	24,79
S5	1300	6670	2,129	0,090	0,192	9,91
S6	640	20000	5,710	0,035	0,200	3,63
E1	4200	500	0,472	0,332	0,157	49,75
E2	2400	2500	1,009	0,182	0,184	22,24
E3	1600	5000	1,681	0,115	0,194	13,02

B : concentration (nmole/l) en analyte fixé à l'anticorps

F : concentration (nmole/l) en analyte libre

T : radioactivité totale

b : radioactivité de l'échantillon

ANNEXE II

Analyse selon Dandliker de la courbe d'étalonnage de la prostaglandine E₁ par polarisation de fluorescence

Paramètres constants :

r ₀	0,065
I ₀	6,5
r _T	0,2025
I _T	5
I ₀ /I _T	1,3

[PGE ₁] (ng)	[PGE ₁]t (M)	r	I _b	F _b /F _f	
Témoin		0,065			
0	9,00 10 ⁻¹⁰	0,130			
0,05	1,57 10 ⁻¹⁰	0,121	4,99 10 ⁻¹⁰	0,893	Y = -0,376.10 ⁹ X + 1,110 r = 0,9747 Ac ₀ = 2,9 10 ⁻⁹ M
0,1	9,4 10 ⁻¹⁰	0,119	8,41 10 ⁻¹⁰	0,841	
1	3,13 10 ⁻⁰⁹	0,106	1,44 10 ⁻⁰⁹	0,552	
10	3,13 10 ⁻⁰⁸	0,095	8,58 10 ⁻⁰⁹	0,363	
100	3,13 10 ⁻⁰⁷	0,079	4,04 10 ⁻⁰⁸	0,147	Y = -6,489 10 ⁶ X + 0,416 r = 0,9993 Ac ₀ = 6,4 10 ⁻⁸ M
500	1,57 10 ⁻⁰⁶	0,069	5,88 10 ⁻⁰⁸	0,039	

r : anisotropie

r₀ : anisotropie du traceur totalement libre

r_T : anisotropie du traceur totalement lié

I₀ : intensité de fluorescence du traceur totalement libre

I_T : intensité de fluorescence du traceur totalement lié

ANNEXE III

Analyse selon Scatchard des résultats de l'immunoréactivité du traceur TxB_2 - AEF par RIA (^{125}I)

V (en ml) du Total =	0,1
V (en ml) du standard=	0,5
V de TxB_2 =	0,1
$[\text{Ag}^*]_0$ (en mol/l)=	$3,34 \cdot 10^{-11}$
Activité de Ag^* (Ci/mol) =	2000000
Rendement du comptage =	1

Tube	CPM	$[\text{TxB}_2]$ (pg/ml)	$[\text{TxB}_2]$ Total	b-N/T-N	B	B/F (%)
TOTAL	15444					
NSB	612					
B ₀	6434	0	0,0334	0,3925	0,013	64,62
S1	6023	31	0,0501	0,3648	0,018	57,44
S2	5405	62	0,0668	0,3232	0,022	47,74
S3	4953	150	0,1143	0,2927	0,033	41,38
S4	3958	250	0,1682	0,2256	0,038	29,13
S5	3044	500	0,3029	0,1640	0,050	19,61
S6	2162	1000	0,5725	0,1045	0,060	11,67
S7	1431	2000	1,1116	0,0552	0,061	5,84
S8	1111	4000	2,1897	0,0336	0,074	3,48
E1	5426	31	0,0501	0,3246	0,016	48,05
E2	5266	62	0,0668	0,3138	0,021	45,73
E3	4522	150	0,1143	0,2636	0,030	35,80
E4	3624	250	0,1682	0,2031	0,034	25,48
E5	2498	500	0,3029	0,1272	0,039	14,57
E6	1698	1000	0,5725	0,0732	0,042	7,90
E7	1233	2000	1,1116	0,0419	0,047	4,37
E8	938	4000	2,1897	0,0220	0,048	2,25

B : concentration (nmole/l) en analyte fixé à l'anticorps

F : concentration (nmole/l) en analyte libre

T : radioactivité totale

b : radioactivité de l'échantillon

ANNEXE IV

Analyse selon Scatchard des résultats de l'immunoréactivité du traceur TXB_2 - AEF par RIA (^3H)

V (en ml) du Total =	1,3
V (en ml) du standard =	1,3
V de TxB_2 =	0,1
$[\text{Ag}^*]_0$ (en mol/l) =	$6,42 \cdot 10^{-11}$
Activité de Ag^* (Ci/mol) =	120000
Rendement du comptage =	0,4

Tube	CPM	$[\text{TxB}_2]$ (pg/ml)	$[\text{TxB}_2]$ Total	b-N/T-N	B	B/F (%)
TOTAL	9576					
NSB	672					
B ₀	5660	0	0,064	0,560	0,036	127,37
S1	5464	50	0,075	0,538	0,040	116,54
S2	4924	130	0,091	0,478	0,044	91,40
S3	3400	400	0,147	0,306	0,045	44,17
S4	2400	1100	0,292	0,194	0,057	24,08
S5	1456	3000	0,686	0,088	0,060	9,66
E1	4800	130	0,091	0,464	0,042	86,43
E2	4040	400	0,147	0,378	0,056	60,84
E3	2400	1100	0,292	0,194	0,057	24,08
E4	1500	3000	0,686	0,093	0,064	10,25

B : concentration (nmole/l) en analyte fixé à l'anticorps

F : concentration (nmole/l) en analyte libre

T : radioactivité totale

b : radioactivité de l'échantillon

ANNEXE V

Analyse selon Dandliker de la courbe d'étalonnage du thromboxane B₂
par polarisation de fluorescence

Paramètres constants :

r ₀	0,053
I ₀	2,48
r _T	0,2
I _T	2
I ₀ /I _T	1,24

[TxB ₂] (ng)	[TxB ₂]t (M)	r	I _b	F _b /F _f	
Témoin		0,053			
0	3,78 10 ⁻⁰⁹	0,124			
0,2	4,32 10 ⁻⁰⁹	0,122	1,097	2,26 10 ⁻⁰⁹	Y = -0,9.10 ⁹ X + 3,2 r = 0,9881 Ac ₀ = 3,6 10 ⁻⁹ M
0,4	4,86 10 ⁻⁰⁹	0,119	1,010	2,44 10 ⁻⁰⁹	
0,6	5,4 10 ⁻⁰⁹	0,115	0,904	2,56 10 ⁻⁰⁹	
1	6,48 10 ⁻⁰⁹	0,101	0,601	2,43 10 ⁻⁰⁹	
1,8	8,64 10 ⁻⁰⁹	0,096	0,513	2,93 10 ⁻⁰⁹	
2	9,18 10 ⁻⁰⁹	0,09	0,417	2,7 10 ⁻⁰⁹	
5	1,73 10 ⁻⁰⁸	0,088	0,380	4,76 10 ⁻⁰⁹	Y = -0,7.10 ⁶ X + 0,31 r = 0,9441 Ac ₀ = 4,3.10 ⁻⁷ M
10	3,08 10 ⁻⁰⁸	0,083	0,318	7,42 10 ⁻⁰⁹	
100	2,74 10 ⁻⁰⁷	0,078	0,249	5,46 10 ⁻⁰⁸	
200	5,44 10 ⁻⁰⁷	0,078	0,250	1,09 10 ⁻⁰⁷	
300	8,13 10 ⁻⁰⁷	0,073	0,195	1,33 10 ⁻⁰⁷	
500	1,35 10 ⁻⁰⁶	0,071	0,173	2 10 ⁻⁰⁷	

r : anisotropie

r₀ : anisotropie du traceur totalement librer_T : anisotropie du traceur totalement liéI₀ : intensité de fluorescence du traceur totalement libreI_T : intensité de fluorescence du traceur totalement lié

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ABDEL-LATIF A.A.

Release and effects of prostaglandins in ocular tissues.

Prostaglandins, Leukotrienes Essential Fatty Acids. 1991, 44(2), 71-82

ADISSON L., BOLTE J., DEMUYNCK C., MANI J.C.

Enzymatic synthesis of aspartyl containing dipeptides.

Tetrahedron, 1988, 44(8), 2185-2191.

AL-ANSARI A.A.K., SMITH D.S., LANDON J.

Polarisation fluoroimmunoassay of serum and salivary cortisol.

J. Steroid. Biochem., 1983, 19(4), 1475-1480.

ALESSANDRINI P., SALVATI P., PUGLIESE F., CIABATTONI G., PATRONO C.

Inhibition by FCE 22178 of platelet and glomerular thromboxane synthase in animal and human kidney disease.

Advances in Prostaglandin, Thromboxane, and Leukotriene Research

Samuelsson B., Paoletti R., Ramwell P., Folco G., Granström E. eds

Raven Press, New York, 1990, 21, 707-710.

AMICI C., SISTONEN L., SANTORO M.G., MORITOMO R.I.

Antiproliferative prostaglandins activate heat shock transcription factor.

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1992, 89(14), 6227-6231.

BABCOCK D., KRAMP D.

Spectral properties of fluorescein and carboxyfluorescein.

J. Biol. Chem., 1983, 258(10), 6389.

BANNWARTH W., KNORR R.

Formation of carboxamides with N,N,N',N'-tetramethyl(succinimido) uronium tetrafluoroborate in aqueous/organic solvent system.

Tetrahedron Letters, 1991, 32(9), 1157-1160.

BAXENDALE P.M., MARTIN R.C., HUGHES K.T., LEE D.Y., WATERS N.M.

Development of scintillation proximity assays for prostaglandins and related compounds.

Advances in Prostaglandin, Thromboxane, and Leukotriene Research

Samuelsson B., Paoletti R., Ramwell P., Folco G., Granström E. eds

Raven Press, New York, 1990, 21, 303-306.

BECK G.M., ROSTON D.A., JASELSKIS B.

Derivatization procedures for detection of prostaglandins in biological matrices by liquid chromatography/electrochemistry.

Talanta, 1989, 36(3), 373-377.

BEN GUEDDOUR R.

Préparation de dérivés fluorescents en vue de l'analyse du thromboxane B₂ par chromatographie liquide haute performance ou par immunodosage.

Thèse d'Université de NANCY I, 1987.

BEN GUEDDOUR R., MATT M., NICOLAS A., DONNER M., STOLTZ J.F.
Measurement of Thromboxane B₂ by normal-phase high performance liquid chromatography after pre-column derivatization with fluorescent reagents.
Anal. Lett., 1993, **26**(3), 429-445.

BERSON S.A., YALOW R.S.
General principles of radioimmunoassay.
Clin. Chim. Acta, 1968, **22**, 51-69

BEST L.C., HOLLAND T.K., JONES P.B.B., RUSSEL R.G.G.
The interrelationship between thromboxane biosynthesis, aggregation and 5-hydroxytryptamine secretion in human platelets in vitro.
Thromb. Haemost., 1980, **43**, 38-40.

BLAKESLEE D., BAINES M.G.
Immunofluorescence using dichlorotriazinyl aminofluorescein. Preparation and fractionation of labelled IgG.
J. Immunol. Methods, 1976, **13**, 305-320.

BOHR B.F., WEBB R.C.
Vascular smooth muscle function and its changes in hypertension.
Am. J. Med., 1984, **77**, 3-16.

BOSSHARD H.R., SCHECHTER I., BERGER A.
A new method for the detection of racemization during peptide synthesis : stereoselective hydrolysis of diastereomeric peptides by leucine aminopeptidase.
Helv. Chim. Acta, 1973, **56**(2), 717-723.

BOSWORTH N., TOWERS P.
Scintillation proximity assay.
Nature, 1989, **341**, 167-168.

BOURDON R., BOURDON-RANISTEANO S.
Les fondements analytiques de l'immunologie quantitative.
Analisis, 1983, **11**(7), 309-326.

BOUTTEN B., DRAY F., LAURENT L., VINCENTELLI M.H., MAMAS S.
Dosage radio-immunologique de la prostaglandine D₂ utilisant un traceur iodé hétérologue et un anticorps monoclonal.
Immunoanal. Bio. Spéc., 1993, **8**, 17-22.

BRONNER-FRASER M.
An antibody to a receptor for fibronectin and laminin perturbs cranial neural crest development in vivo.
Dev. Biol., 1986, **117**(2), 528-36.

BUSSE W.D., SEUTER F.

Influence on thromboxane and malondialdehyde synthesis in human thrombocytes by various inhibitors of platelet function.

Arachidonic acid metabolism in inflammation and thrombosis

Agents and actions : supplements 4

Brune K., Baggiolini M. eds

Birkhäuser, Basel, 1979, **supp. 4**, 127-135.

CAMPBELL W.B., OJEDA S.R.

Measurement of prostaglandins by radioimmunoassay.

Methods in enzymology

Conn P.M., Means A.R. eds

Academic Press, N.Y., 1987, **141**, 323-341.

CARTER A.J., HANLEY S.P.

The effect of platelet number and haematocrit on whole blood thromboxane synthesis.

Thromb. Haemost., 1985, **54**, 225-227.

CASTRO B., DORMOY J.R., EVIN G., SELVE C.

Réactifs de couplage peptidique IV(1)-l'hexafluorophosphate de benzotriazolyl N-oxytrisdiméthylamino phosphonium (BOP)

Tetrahedron Letters, 1975, **14**, 1219-1222.

CATELLA F., FITZGERALD G.A.

Measurement of thromboxane metabolites by gas chromatography-mass spectrometry.

Methods in Enzymology

Murphy R.C., Fitzpatrick F.A. eds

Academic Press, N.Y., 1990, **187**, 42-50.

CHALLIS B.C., CHALLIS J.A.

Amides and related compounds.

Dans : Comprehensive organic chemistry. The synthesis and reactions of organic compounds.

Sutherland I.O. Ed. Oxford Pergamon Press. 1979, **2**, 958-1051.

CHEN R.F., BOWMAN R.L.

Measurement of fluorescence polarization.

Science, 1965, **147**, 729-732.

CHIABRANDO C., PINCIROLI V., CAMPOLEONI A., BENIGNI A.,
PICCINELLI A., FANELLI R.

Quantitative profiling of 6-ketoprostaglandin F_{1α}, 2,3-dinor-6-ketoprostaglandin F_{1α}, thromboxane B₂, and 2,3-dinor-thromboxane B₂ in human and rat urine by immunoaffinity extraction with gas chromatography-mass spectrometry.

J. Chromatogr., 1989, **495**, 1-11.

CHIABRANDO C., RIVOLTELLA L., MARTELLI L., VALZACCHI S., FANELLI R.

Urinary excretion of thromboxane and prostacyclin metabolites during chronic low-dose aspirin : evidence for an extrarenal origin of urinary thromboxane B₂ and 6-keto-prostaglandin F₁ in healthy subjects.
Biochim. Biophys. Acta, 1992, **1133(3)**, 247-254.

CIABATTONI G., PATRIGNANI P., PAZTRONO C.

Radioimmunoassay of 11-déhydrothromboxane B₂

Methods in Enzymology

Murphy R.C., Fitzpatrick F.A. eds

Academic Press, N.Y., 1990, **187**, 35-42.

COHEN R.M., BIZOLLON C.A.

Méthodes radio-immunologiques

Techniques de l'ingénieur, 1993, **P3 335**, 1-21

COLBERT D.L., GALLACHER G., SIDKI A.M. MAINWARING-BURTON R.W.

Development of a single reagent polarisation fluoroimmunoassay for the detection of opiates in urine.

J. Immunoassay, 1988, **9(3-4)**, 367-383.

COLEMAN R.

Methods in prostanoid receptor classification.

Prostaglandins and related substances : a practical approach

Benedetto C., McDonald-Gibson R.G., Nigam s., Slater T. F. eds

IRL Press, Washington, 1987, 267-303.

COONS A.H., CREECH H.J., JONES R.N., BERLINER E.

The demonstration of pneumococcal antigen in tissues by the use of fluorescent antibody.

J. Immunol., 1942, **45**, 159-170.

CORDIS G.A., DAS D.K.

High performance liquid chromatographic detection of myocardial prostaglandins and thromboxanes.

J. Chromatogr., 1991, **536**, 309-317.

COSSY J., PALE-GROSDEMANGE C.

A convenient synthesis of amides from carboxylic acids and primary amines.

Tetrahedron Letters, 1989, **30(21)**, 2771-2774.

COSTE J., LE-NGUYEN D., CASTRO B.

PyBOP : a new peptide coupling reagent devoid of toxic by-product.

Tetrahedron Letters, 1990, **31(2)**, 205-208.

- DANDLIKER W.B., FEIGEN G.A.
Quantification of the antigen-antibody reaction by the polarisation of fluorescence.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1961, **5**, 299-305.
- DANDLIKER W.B., HSU M.L., LEVIN J., RAO B.R.
Equilibrium and kinetic inhibition assays based upon fluorescence polarization
Langone J.J., Van Vunakis H. eds
Methods in Enzymology, 1981, **74**, 3-28.
- DANDLIKER W.B., KELLY R.J., DANDLIKER J., FARQUHAR J., LEVIN J.
Fluorescence polarisation immunoassay. Theory and experimental method.
Immunochem., 1973, **10**, 219-227.
- DANDLIKER W.B., SCHAPIRO H.C., MEDUSKI J.W., ALONSO R.,
FEIGEN G.A., HAMRICK J.R.
Application of fluorescence polarization to the antigen-antibody reaction. Theory
and experimental method.
Immunochem., 1964, **1**, 165-191.
- DANDLIKER W.B., de SAUSSURE V.A.
Fluorescence polarisation in immunochemistry.
Immunochem., 1970, **7**, 799-828.
- DAVIES M., JONES R.L.
Infrared absorption and molecular structure of phenol, phenolphthalein,
fluorescein, and some alkali derivatives
J. Chem. Soc., 1954, 120-125.
- DEMAS J.N., ROSKY G.A.
The measurement of photoluminescence quantum yields.
J. Phys. Chem., 1971, **75**, 991-1024.
- DESBUQUOIS B., AURBACH G.
Use of polyethylene glycol to separate free and antibody bound peptide hormones
in radioimmunoassays.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 1971, **33**, 732-738.
- DIEHL H., HORCHAK-MORRIS N.
The absorbance of fluorescein in the ultraviolet as a function of pH.
Talanta, 1987, **34(8)**, 739-741.
- DIEHL H., HORCHAK-MORRIS N., HEFLEY A.J., MUNSON L.F.,
MARKUSZEWSKI R.
The acid strengths of fluorescein as shown by potentiometric titration.
Talanta, 1986, **33(11)**, 901-905.
- DIEHL H., MARKUSZEWSKI R.
The solubility and acid dissociation constants of fluorescein in water solution.
Talanta, 1985, **32(2)**, 159-165.

DIEHL H., MARKUSZEWSKI R.

The fluorescence of fluorescein as a function of pH.

Talanta, 1989, **36(3)**, 416-418.

DRAY F., MAMAS S. BIZZINI B.

Problems of PGE antisera specificity.

Lands W.E.M., Smith W.L. eds

Methods in enzymology, 1982, **86**, 258-269.

DRVOTA V., VESTERQVIST O., GREEN K.

Effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on the in vivo synthesis of thromboxane and prostacyclin in humans.

Advances in Prostaglandin, Thromboxane, and Leukotriene Research

Samuelsson B., Paoletti R., Ramwell P., Folco G., Granström E. eds

Raven Press, New York, 1990, **21**, 153-156.

EARL M., SOBESKI L., TIMKO D. and MARKIN R.

Pentobarbital quantification in the presence of phenobarbital by fluorescence polarization immunoassay.

Clin. Chem, 1991, **37(10)**, 1774-1777.

EKINS R.P.

Radioimmunoassay : basic principles and theory.

Brit. Med. Bull., 1974, **30(1)**, 3-7.

ELLIS E.F., OELZ O., ROBERTS J.L., PAYNE N.A., SWEETMAN NIES A.S., OATES J.A.

Coronary artery smooth muscle contraction by a substance released from platelets : evidence that it is thromboxane A.

Science, 1975, **193**, 1135-1137.

ENGELS W., KAMPS M.A.F., LEMMENS P.J.M.R., VAN DER VUSSE G.J., RENEMAN R.S.

Determination of prostaglandins and thromboxane in whole blood by high performance liquid chromatography with fluorimetric detection.

J. Chromatogr., 1988, **427**, 209-218.

ENTWISTLE A., NOBLE M.

The use of polarization analysis in the quantification of fluorescent emission : general principles.

J. of Microscopy, 1992, **165(3)**, 331-346.

EREMIN S.A., SCHIAVETTA D.E., LOTEY H., SMITH D.S. and LANDON J.

Design and development of a single-reagent polarization fluoroimmunoassay for methamphetamine.

Therap. Drug Monitoring, 1988, **10**, 327-332.

FEUERSTEIN D.L., SELLECK R.E.

Fluorescent tracers for dispersion measurements

J. Sanit. Engineering Div., 1963, **SA 4**, 1-21.

FITZGERALD G.A., MURRAY R., MORAN N., FUNK C., CHARMAN W.,
CLARKE R., FURCI L., FITZGERALD D.J.

Mechanisms of eicosanoid action.

Advances in Prostaglandin, Thromboxane, and Leukotriene Research

Samuelsson B., Paoletti R., Ramwell P., Folco G., Granström E. eds

Raven Press, New York, 1990, **21**, 577-581.

FITZGERALD G.A., OATES J.A., HAWIGER J., MAAS R.L., ROBERTS L.J.,
LAWSON J.A., BRASH A.R.

Endogenous biosynthesis of prostacyclin and thromboxane and platelet function
during chronic aspirin administration in man.

J. Clin. Invest., 1983, **71**, 676-688.

FITZGERALD G.A., PEDERSEN A.K., PATRONO C.

Analysis of prostacyclin and thromboxane biosynthesis in cardiovascular
disease.

Circulation, 1983, **67(6)**, 1174-1177.

FITZPATRICK F.A.

A radioimmunoassay for thromboxane B₂.

Methods in enzymology

Lands W., Smith W. eds

Academic Press, N.Y., 1982, **86**, 286-297.

FOLCO G.C., SALA A.

Bioassay of eicosanoids.

Biologie des eicosanoides

Lagarde M. ed

Colloque INSERM, 1987, **152**, 217-226.

GELPI E., ABIAN J.

Comparative evaluation of combined high performance liquid chromatography-
mass spectrometry and GC-mass spectrometry methods for the study of
eicosanoid metabolism.

LC-GC Intl., 1990, **3(12)**, 30-38.

GELPI E., RAMIS I., HOTTER G., BIOQUE G., BULBENA O., ROSELLO J.

Modern high-performance liquid chromatographic-radioimmunoassay
strategies for the study of eicosanoids in biological samples.

J. Chromatogr., 1989, **492**, 223-250.

GERRARD J.M.

Platelet aggregation and the influence of prostaglandins.

Methods in enzymology

Lands W., Smith W. eds

Academic Press, New York, 1982, **86**, 642-654.

GISSLER C., PANSE M., MENTZ P., HELLTHALER G.

Enzyme-linked immunoassay for thromboxane B₂ and 6-oxoprostaglandin F_{1α} using peroxidase as label.

Biomed. Biochim. Acta, 1988, **47 (10-11)**, S137-S139.

GORMAN J.J.

Fluorescent labeling of cysteinyl residues to facilitate electrophoretic isolation of proteins suitable for amino-terminal sequence analysis.

Anal. Biochem., 1987, **160(2)**, 376-387.

GRANSTROM E., KINDAHL H.

Radioimmunoassay of prostaglandins.

Advances in Prostaglandin and Thromboxane Research.

Frohlich J. ed.,

Raven Press, New-York, 1978, **5**, 119-210.

GUTIERREZ M.C., GOMEZ-HENS A., PEREZ-BENDITO D.

Immunoassay methods based on fluorescence polarization.

Talanta, 1989, **36(12)**, 1187-1201.

HAIDUKEWYCH D.

Fluorescence polarization immunoassay and enzyme immunoassay compared for free valproic acid in serum ultrafiltrates from epileptic patients.

Clin. Chem., 1985, **31(1)**, 156.

HAIDUKEWYCH D.

Therapeutic drug monitoring by automated fluorescence polarization immunoassay.

Immunoassay Technology, 1986, **2**, 71-103.

HAMBERG M., SAMUELSSON B.

Novel transformation of arachidonic acid in human platelets.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1974, **71**, 3400-3404.

HAMBERG M., SVENSSON J., SAMUELSSON B.

Thromboxanes : a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1975, **72**, 2994-2998.

Handbook of Chemistry and Physics. 1984, 65th edn, CRC Publishing Co.

WEAST R.C., ed.

HANSEL M.C., ROWELL F.J. and SIDKI A.M.

Single-reagent polarisation fluoroimmunoassay for cotinine (a nicotine metabolite) in urine.

Ann. Clin. Biochem., 1986, **23**, 596-602.

HATSUMI M., KIMATA S.I., HIROSAWA K.
9-Anthryldiazomethane derivatives of prostaglandins for high performance liquid chromatographic analysis.
J. Chromatogr. 1982, **253**, 271-275.

HEMMILA I.
Fluoroimmunoassay and immunofluorometric assays
Clin. Chem., 1985, **31(3)**, 359-370.

HENDRICKSON J.B., HUSSOIN M.S.,
Reactions of carboxylic acids with "phosphonium anhydrides.
J. Org. Chem., 1989, **54**, 1144-1149.

HENRY J.C.
Les prostaglandines.
ISB 1988, **14(2)**, 121-131.

HIROSHI K., HODETOSHI K., NAOMICHI T.
A convenient synthesis of amides with 2-halo-2-3-dihydro-1,3,4,2-oxadiazaphospholes as new condensing agents.
Bull. Chem. Soc. Jpn., 1993, **66(1)**, 327-329.

HUBBARD A.R., MILLER J.N., LAW B., MASON P. and MOFFAT A.C.
Polarisation fluoroimmunoassay for LSD.
Anal. Proc., 1983, **20**, 606-608.

HUBBARD H.L., ELLER T.D., MAIS D.E., HALUSHKA P.V., BAKER R.H., BLAIR I.A., VRBANAC J.J., KNAPP D.R.
Extraction of thromboxane B₂ from urine using an immobilized antibody column for subsequent analysis by gas chromatography-mass spectrometry.
Prostaglandins, 1987, **33(2)**, 149-160.

HUDSON D.
Methodological implications of simultaneous solid-phase peptide synthesis, comparison of different coupling procedures.
J. Org. Chem., 1988, **53**, 617-624.

IKEDA M., KUSAKA T.
Liquid chromatography-mass spectrometry of hydroxy and non-hydroxy fatty acids as amide derivatives.
J. Chromatogr. 1992, **575**, 197-205.

IKENOYA S., HIROSHIMA O., OHMAE M.
Electrochemical detector for high-performance liquid chromatography analysis of fatty acids, biles acids, and prostaglandins by derivatization to an electrochemically active form.
Chem. Pharm. Bull., 1980, **28**, 2941-2947.

IRTH H., OOSTERKAMP A.J., VANDERWELLE W., TJADEN U.R., VANDERGREEF J.

On line immunochemical detection in liquid chromatography using fluorescein-labelled antibodies.

J. Chromatogr., 1993, **633** (1-2), 65-72.

ISHIBASHI M., OHYAMA Y., MIZUGAKI M., HARIMA N.

Identification of 11-dehydrothromboxane B₃ in human urine after administration of eicosapentaenoic acid.

Biomed. Environ. Mass Spectrom., 1990, **19**, 387-389.

JABLONSKI A

Decay phenomena of polarized photoluminescence.

Z. Naturf. 1961, **16a**, 1-4

JISKOOT W., HOOGERHOUT P., BEUVERY E.C., HERRON J.N. CROMMELIN D.J.A.

Preparation and application of a fluorescein-labeled peptide for determining the affinity constant of a monoclonal antibody-hapten complex by fluorescence polarization.

Anal. Biochem., 1991, **96**, 421-426.

JOLLEY M.E.

Fluorescence polarization immunoassay for the determination of therapeutic drug levels in human plasma.

J. Anal. Toxicol., 1981, **5**, 236-240.

JOONDEPH B.C., TESSLER H.H.

Clinical course of multifocal choroiditis : photographic and angiographic evidence of disease recurrence.

Annals of ophthalmology, 1991, **23**(11), 424-429.

KITA Y., AKAI S., AJIMURA N., YOSHIGI M., TAUGOSHI T., YASUDA H., TAMURA Y.

Facile and efficient syntheses of carboxylic anhydrides and amides using (trimethylsilyl)ethoxyacetylene.

J. Org. Chem., 1986, **51**, 4150-4158.

KELLY R. A., O'HARA D. S., KELLEY V.

High-performance liquid chromatographic separation of femtomolar quantities of endogenous carboxylic acids, including arachidonic acid metabolites, as 4-bromomethyl-7-acetoxycoumarin derivatives.

J. Chromatogr, 1987, **416**, 247-254.

KLOEZE J.

Relationship between chemical structure and platelet aggregation activity of prostaglandins.

Biochim. Biophys. Acta , 1969, **187**, 285-292.

KNORR R., TRZECIAK A., BANNWARTH W., GILLESSEN D.
New coupling reagents in peptide chemistry.
Tetrahedron Letters, 1989, **30(15)**, 1927-1930.

KNOSPE J., STEINHILBER D., HERRMANN T., ROTH H.J.
Picomole determination of 2,4-dimethoxyanilides of prostaglandins by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection.
J. Chromatogr., 1988, **442**, 444-450.

KOLLER E.
Fluorescent protein labels and labeling protocols. 1. Fluorescein derivatives.
App. Fluoresc. Technol. 1991, **3**, 26-31.

KRAFFT G.A., SUTTON W.R., CUMMINGS R.T.
Photoactivable fluorophores. Synthesis of photoactivation of fluorogenic difunctionalized fluoresceins.
J. Am. Chem. Soc. 1988, **110(1)**, 301-303.

KRAMER D.N., GUILBAULT G.G.
Resorufin acetate as substrate for determination of hydrolytic enzymes at low enzyme and substrate concentrations.
Anal. Chem., 1964, **36(8)**, 1662-1663.

KUMLIN M., GRANSTROM E.
Radioimmunoassay for 11-dehydro-TxB₂ : a method for monitoring thromboxane production in vivo.
Prostaglandins, 1986, **32(5)**, 741-767.

LAWSON J.A., BRASH A.R., DORAN J., FITZGERALD G.A.
Measurement of urinary 2,3-dinor-thromboxane B₂ and thromboxane B₂ using bonded-phase phenylboronic acid columns and capillary gas chromatography-negative-ion chemical ionization mass spectrometry.
Anal. Biochem., 1985, **150**, 463-470.

LEE Y.M., NAKAMURA H., NAKAJIMA T.
Fluorometric determination of carboxylic acids by high performance liquid chromatography after derivatization with monodansyl cadaverine.
Anal. Sci. 1989, **5**, 681-685.

LEFER A.M., SMITH E.F., ARAKI H., SMITH J.B., AHARONY D., CLAREMON D.A., MAGOLDA R.L., NICOLAOU, K.C.
Dissociation of vasoconstrictor and platelet aggregatory activities of thromboxane by carbocyclic thromboxane A₂.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1980, **77**, 1706-1710.

LE GUENNEC J.C., LAUZIERE M., BLACK R., SIROIS P.
Effects of indomethacin on prostaglandin E₂ and thromboxane B₂ contents of tracheal lavage fluids in premature infants.
Inflammation, 1991, **15(1)**, 55-59.

LEIS H.J., WELZ W., MALLE E.

Determination of prostaglandins, thromboxanes and related compounds by GC-MS.

Chromatogr. Anal., 1990, **13**, 5-7.

LELLOUCHE F., FRADIN A., FITZGERALD G., MACLOUF J.

Enzyme-immunoassay measurement of the urinary metabolites of thromboxane A₂ and prostacyclin.

Prostaglandins, 1990, **40(3)**, 297-310

LI T.M., BENOVIC J.L., BURD J.F.

Serum theophylline determination by fluorescence polarization immunoassay utilizing an umbelliferone derivative as a fluorescent label.

Anal. Biochem., 1981, **118**, 102-107.

LINDQVIST L.

A flash -photolysis study of fluorescein.

Arkiv. Kemi., 1960, **16**, 79-138.

LINGEMAN H.,

Selective pre-chromatographic derivatization methods for carboxylic acids.

Thèse de l'université d'Utrecht, 1986.

LINGEMAN H., HULSHOFF A., HUNDERBERG J.M.,
OFFERMANN F.B.M.J.

Rapid, sensitive and specific derivatization methods with 9-hydroxymethylanthracene for the fluorimetric detection of carboxylic acids prior to reversed-phase high performance liquid-chromatographic separation.

J. Chromatogr., 1984, **290**, 215-222.

LU-STEFFES M., PITTLUCK G.W., JOLLEY M.E., PANAS H.N., OLIVE D.L.,
WANG C.H.J., NYSTROM D.D., KEEGAN C.L., DAVIS T.P., STROUPE S.D.

Fluorescence polarization immunoassay IV. Determination of phenytoin and phenobarbital in human serum and plasma.

Clin. Chem., 1982, **28**, 2278-2282.

LUKE F.J., SCHLEGEL W.

A time-resolved fluoroimmunoassay for the determination of prostaglandin F_{2α}.

Clin. Chim. Acta, 1990, **189**, 257-266.

LUMLEY P., WHITE B.P., HUMPHREY P.P.A.

GR32191, a highly potent and specific thromboxane A₂ receptor blocking drug on platelets and vascular and airways smooth muscle in vitro.

Br. J. Pharmacol., 1989, **97**, 783-794.

LUO X.D., XIE M.

Subnanogram detection of dihydroartemisin after chemical derivatization with diacetyldihydrofluorescein followed by high performance liquid chromatography and U.V. absorption.
Chromatographia, 1987, **23(2)**, 112-114.

MAAS R.L., TABER D.F., ROBERTS L.J.

Quantitative assay of urinary 2,3-dinor-thromboxane B₂ by GC-MS

Methods in enzymology

Lands W., Smith W. eds

Academic Press, New York, 1982, **86**, 592-603.

MACLOUF J., PRADEL M., PRADELLES P., DRAY F

Iodine 125-labeled derivatives of prostaglandins. A novel approach in prostaglandin analysis by radioimmunoassay.

Biochim. Biophys. Acta, 1976, **431**, 139-146.

MACLOUF J., GRASSI J., PRADELLES P.

Use of acetylcholinesterase as a label for the enzyme immunoassay of icosanoids.

Biologie des icosanoides

Lagarde M. ed

Colloque INSERM, 1987, **152**, 209-216.

MARKUSZEWSKI R., DIEHL H.

The infrared spectra and structures of the three solid forms of fluorescein and related compounds.

Talanta, 1980, **27**, 937-946.

MARTIN D., LINDQVIST L.

The pH dependence of fluorescein fluorescence.

J. Lumin., 1975, **10**, 381-390.

MARTINEAU A., FALARDEAU P.

Purification and quantitative analysis of urinary prostanoids in human and in rat by packed and capillary gas chromatography-negative-ion chemical-ionization mass spectrometry.

J. Chromatogr. 1987, **417**, 1-10.

MASAKI M., KITAHARA T., KURITA H., OHTA M.

A new method for the removal of chloroacetyl groups.

J. Am. Chem. Soc., 1968, **90(16)**, 4508-4509.

MATSUMO H., UEMATSU T., UMEMURA K., TAKIGUCHI Y., WADA K., NAKASHIMA M.

Effects of vapiprost, a novel thromboxane receptor antagonist, on thrombus formation and vascular patency after thrombolysis by tissue-type plasminogen activator.

Br. J. Pharmacol. 1992, **106**, 533-538.

- MATSUMOTO Y., OCHI H., AIHARA K., INUI J., IKEGAMI K.
Effects of Y-20811, a thromboxane A₂ synthetase inhibitor, on experimentally induced coronary thrombosis in anesthetized dogs.
Eur. J. Pharmacol., 1992, **213**, 167-170.
- MAURIN N.
Routine measurement of thromboxane B₂ and the prostacyclin metabolite 6-keto-prostaglandin F_{1α} in plasma.
Arzneim. Forsch., 1986, **36(II)**, 1174-1179.
- MELLOR G.W., GALLACHER G.
Fluorescence polarization immunoassay of urinary vanillylmandelic acid
Clin. Chem., 1990, **36(1)**, 110-112.
- MENCIA-HUERTA J.M., BENVENISTE J.
Platelet activating factor and macrophages. 1. Evidence for the release from rat and mouse peritoneal macrophages and not from mastocytes.
Eur. J. Immunol., 1979, **9(5)**, 409-415.
- MIKOLAJCZYK M., KIELBASINSKY P.,
Recent developments in carbodiimide chemistry.
Tetrahedron, 1981, **37**, 233-284.
- MILLER D.K., SODOWSKI S., DE SOUSA D., MAYCOCK A.L.,
LOMBARDO D.L., YOUNG R.N., HAYES E.C.
Development of enzyme-linked immunosorbent assays for measurement of leukotrienes and prostaglandins.
J. Immunol. Methods, 1985, **81**, 169-185.
- MONCADA S.
An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxydes to an unstable substance that inhibit platelet aggregation.
Nature, 1976, **263**, 663-665.
- MONCADA S., VANE J.R.
The discovery of prostacyclin : a fresh insight into arachidonic acid metabolism.
Biochemical Aspect of Prostaglandins and Thromboxanes
Karasch N., Fried J. eds
Academic Press, New York, 1977, 155-177.
- MOONEN P., KLOK G., KEIRSE M.J.N.C.
An improved method for separation of thromboxane B₂ by reversed phase liquid chromatography.
Prostaglandins, 1983, **26(5)**, 797-803.
- MORELLO A., CHANG S., JACOB A., LAW S.J., STASTNY M., MARTIN L.,
PAMIDI A., KOTAKE A.
Chemiluminescent immunoassay for urinary thromboxane B₂.
Prostaglandins, 1991, **42(1)**, 55-70.

MUNKHOLM C., PARKINSON D.R., WALT D.R.

Intramolecular fluorescence self-quenching of fluoresceinamine.
J. Am. Chem. Soc., 1990, **112**, 2602-2616.

NARITA S., KITAGAWA T.

Application of fluorescent triazoles to analytical chemistry. Fluorescent derivatization of carboxylic acids.

Chem. Pharm. Bull. 1989, **37(3)**, 831-833.

NEEDLEMAN P., BRYAN B., WYCHE A., BRONSON S.D., EAKINS K., FERRENDELLI J.A., MINKES M.

Thromboxane synthetase inhibitors as pharmacological tools : differential biochemical and biological effects on platelet suspensions.

Prostaglandins, 1977, **14(5)**, 897-907.

NIMURA N., KINOSHITA T., YOSHIDA T., UETAKE A., NAKAI C.

1-Pyrenyldiazomethane as a fluorescent labeling reagent for liquid chromatographic determination of carboxylic acids.

Anal. Chem., 1988, **60**, 2067-2070.

NUGTEREN D.H., HAZELHOF E.

Isolation and properties of intermediates in prostaglandin biosynthesis.

Biochim. Biophys. Acta., 1973, **326**, 448-461.

O'NEAL J.S. and SCHULMAN S.G.

Fluorescence polarization immunoassay of kanamycin

Anal. Lett., 1984, **17(b14)**, 1627-1635.

O'NEAL J.S., SCHULMAN S.G.

Fluorescence polarization immunoassay of phenytoin employing a sulfonamido derivative of 2-naphthol-8-sulfonic acid as a label.

Anal. Chem., 1984, **56**, 2888-2891.

ORNDORFF W.R., HEMMER A.J.

Fluorescein and some of its derivatives

J. Am. Chem. Soc., 1927, **49**, 1272-1280.

PATRONO C., CIABATTONI G.

Development and validation of radioimmunoassays for the plasma and urinary metabolites of thromboxane B₂.

Biologie des icosanoides

Lagarde M. ed

Colloque INSERM, 1987, **152**, 227-233.

PATRONO C., CIABATTONI G., DAVI G.

Thromboxane-dependent platelet activation as a transducer of enhanced risk of coronary and cerebral thrombosis.

Advances in Prostaglandin, Thromboxane, and Leukotriene Research

Samuelsson B., Paoletti R., Ramwell P., Folco G., Granström E. eds

Raven Press, New York, 1990, **21**, 619-622.

PATRONO C., CIABATTONI G., PUGLIESE F., PIERUCCI A., BLAIR I.A., FITZGERALD G.A.

Estimated rate of thromboxane secretion into circulation of normal human.
J. Clin. Invest., 1986, **77**, 590-594.

PATRONO C., CIABATTONI G., PUGLIESE F., PINCA E., CASTRUCCI G., DE SALVO A., SATTA M.A., PARACHINI M.

Inhibition of platelet cyclooxygenase by aspirin-like drugs methods for in vitro and ex vivo assessment.

Arachidonic acid metabolism in inflammation and thrombosis

Agents and actions : supplements 4

Brune K., Baggiolini M. eds

Birkhäuser, Basel, 1979, **supp. 4**, 127-135.

PERRIN F.

Polarisation de la lumière de fluorescence. Vies moyenne des molécules dans l'état excité.

J. Phys. Radium, 1926, 390-401.

PESCE A.J., SCHROEDER T.J. and FIRST M.R.

An evaluation of cyclosporine monitoring by nonselective fluorescence polarization immunoassay.

Transplant. Proceed., 1990, **22(3)**, 1171-1174.

PIPER P.J.

Measurement of prostaglandins, thromboxanes and leukotrienes by smooth muscle bioassay.

Prostaglandins and Related Substances : a practical approach.

Benedetto C., McDonald-Gibson R.G., Nigam S., Slater T.F. eds

IRL Press, Oxford Washington DC, 1987, 143-150.

PONTET M., TRESCA J.P.

Principes de caractérisation des liaisons ligand-site récepteur.

Immunoanal. Biol. Spéc., 1990, **21**, 9-16.

POURFARZANEH M., WHITE G.W. and SMITH D.S.

Cortisol directly determined in serum by fluoroimmunoassay with magnetizable solid phase.

Clin. Chem., 1980, **26(6)**, 730-733.

POWELL W.S.

Rapid extraction of arachidonic acid metabolites from biological samples using octadecylsilyl silica.

Methods in enzymology

Lands W., Smith W. eds

Academic Press, N.Y., 1982, **86**, 467-477.

POWELL W.S.

High performance liquid chromatography in the analysis of arachidonic acid metabolites.

Prostaglandins and Related Substances : a practical approach.

Benedetto C., McDonald-Gibson R.G., Nigam S., Slater T.F. eds

IRL Press, Oxford Washington DC, 1987, 75-98.

PRADELLES P., GRASSI J., MACLOUF J.

Enzyme immunoassay of eicosanoids using acetylcholinesterase as label : an alternative to radio-immunoassay.

Anal. Chem., 1985, **57(7)**, 1170-1173.

PRADELLES P., GRASSI J., MACLOUF J.

Enzyme immunoassay of eicosanoids using acetylcholinesterase

Methods in Enzymology

Murphy R.C., Fitzpatrick F.A. eds

Academic Press, N.Y., 1990, **187**, 24-34.

PULLEN R.H., HOWELL J.A., COX J.W.

High performance liquid chromatographic determination of thromboxane B₂ in human serum as a methoxime-panacyl ester derivative.

Prostaglandins, Leukotrienes Med., 1987, **29(2-3)**, 205-219.

REED G.A., GRIFFIN I.O., ELING T.E.

Inactivation of prostaglandin H synthase and prostacyclin synthase by phenylbutazone.

Mol. Pharmacol., 1985, **27(1)**, 109-114.

REINKE M., PILLER M., BRUNE K.

Development of an enzyme-linked immunosorbent assay of thromboxane B₂ using a monoclonal antibody.

Prostaglandins, 1989, **37(5)**, 577-586.

ROBERTS L.J., SWEETMAN B.J., OATES J.A.

Metabolism of thromboxane B₂ in man.

J. Biol. Chem., 1981, **256(16)**, 8384-8393.

ROBERTS L.J., SWEETMAN B.J., PAYNE N.A., OATES J.A.

Metabolism of thromboxane B₂ in man. Identification of the major urinary metabolite.

J. Biol. Chem., 1977, **252(21)**, 7415-7417.

SADIK Mohamed

Développement d'un appareil de fluorescence automatisé et informatisé en vue d'une utilisation pluriméthodologique.

Thèse de l'INPL, 1992, Nancy

SAIGO K., USUI M., KIKUCHI K., SHIMADA E., MUKAIYAMA T.
New method for preparation of carboxylic esters.
Bull. Chem. Soc. Jpn., 1977, **50(7)**, 1863-1866.

SALARI H., YEUNG M., DOUGLAS S., MOROZOWICH W.
Detection of prostaglandins by high-performance liquid chromatography after conversion to p-(9-anthroyloxy)phenacyl esters.
Anal. Biochem., 1987, **165(1)**, 220-229.

SALMON J.A., FLOWER R.J.
Extraction and thin layer chromatography of arachidonic acid metabolites.
Methods in Enzymology
Lands W., Smith W. eds
Academic Press, N.Y., 1982, **86**, 477-493.

SAWADA M., INAGAWA T., FROELICH J.C.
Enzyme immunoassay of thromboxane B₂ at the picogram level.
Prostaglandins, 1985, **29(6)**, 1039-1048.

SCATCHARD G.
The attraction of proteins for small molecules and ions.
Ann. N.Y. Acad. Sci., 1949, **51**, 660-672.

SCHWEER H., MEESE C.O., FUERST O., KUEHL P.G., SEYBERTH H.W.
Tandem mass spectrometry determination of 11-dehydrothromboxane B₂, an index metabolite of thromboxane B₂ in plasma and urine.
Anal. Biochem., 1987, **164(1)**, 156-163.

SELAN F., BLAIR N., EVANS M.A.
High-performance liquid chromatographic analysis for fluorescein and fluorescein monoglucuronide in plasma.
J. Chromatogr. Biomed. Appl., 1985, **338**, 213-218.

SEUTER F., PERZBORN E., FIEDLER V.B.
Effect of BAY U3405, a new thromboxane antagonist, on arachidonic acid induced thrombiembolism.
Advances in prostaglandin, thromboxane and leukotriene research.
Samuelsson B. ed.
Raven Press, New York, 1990, **21**, 355-358

SHIPCHANDLER M.T., FINO J.R.
A revised structure of fluorescein mercuric acetate.
Anal. Biochem., 1986, **154**, 476-477.

SHIPCHANDLER M.T., FINO J.R., KLEIN L.D., KIRKEMO C.L.
4'(aminomethyl)fluorescein and its N-alkyl derivatives : useful reagents in immunodiagnostic techniques.
Anal. Biochem., 1987, **162**, 89-101.

SHIOIRI T., YOKOYAMA Y., KASAI Y., YAMADA S.

Reaction of diethyl-phosphorocyanidate (DEPC) with carboxylic acids. A new synthesis of carboxylic esters and amides.

Tetrahedron, 1976, **32**, 2211-2217.

SINZINGER H., O'GRADY J., DEMERS L.M., GRANSTROM E., KUMLIN M., NELL A., PESKAR B.A., SALMON J.A., WESTLUND P.

Thromboxane in cardiovascular disease.

Eicosanoids, 1990, **3**, 59-64.

SKLYAR Y.E., MIKHAILOV G.I.

Zwitterion structure of fluorescein.

Zh. Org. Khim., 1966, **2(5)**, 899-901.

SLATER T.F., McDONALD-GIBSON R.G.

Introduction to the eicosanoids.

Prostaglandins and Related Substances : a practical approach.

Benedetto C., McDonald-Gibson R.G., Nigam S., Slater T.F. eds

IRL Press, Oxford Washington DC, 1987, 167-195.

SMITH D.S., AL-HAKIEM M.H.H. and LANDON J.

A review of fluoroimmunoassay and immunofluorometric assay

Ann. Clin. Biochem., 1981, **18**, 253-274.

SOINI E. and HEMMILÄ I.

Fluoroimmunoassay : present status and key problems.

Clin. Chem., 1979, **25(3)**, 353-361.

SMITH W.L., DEWITT D.L., SHIMOKAWA T.

The aspirin and heme binding sites of PGG/H synthase.

Advances in Prostaglandin, Thromboxane, and Leukotriene Research

Samuelsson B., Paoletti R., Ramwell P., Folco G., Granström E. eds,

Raven Press, New York, 1990, **21**, 77-80.

STIER C.T., WONG P.Y-K., ITSKOVITZ H.D.

Enhanced thromboxane formation by blood but not whole platelets from spontaneously hypertensive rats.

Prostaglandins, 1992, **43**, 533-544.

TAKASAKI W., NAKAGAWA A., ASAI F., USHIYAMA S., SUGIDACHI A., MATSUDA K., OSHIMA T., TANAKA Y.

Superiority of plasma 11-dehydro-TxB2 to TxB2 as an index of in vivo TX formation in rabbits after dosing of CS-518, a TX synthase inhibitor.

Thromb. Res., 1993, **71(1)**, 69-76.

TAKASAKI W., NAKAGAWA A., TANAKA Y., NAKAMURA K., SHINDO H., HAYASHI Y., YAMAMOTO S.

Enzyme immunoassay of human plasma 11-dehydrothromboxane B2.

Thromb. Res., 1991, **63(3)**, 331-341.

TENGERDY R.P.

Quantitative determination of antibody by fluorescence polarization.
J. Lab. Clin. Med., 1967, **70(4)**, 707-714.

THOMAS J.A., BUCHSBAUM R.N., ZIMNIAK A., RACKER E.

Intracellular pH measurements in Ehrlich ascites tumor cells utilizing spectroscopic probes generated in situ..
Biochem., 1979, **18(11)**, 2210-2218.

THORNGREN M., SHAFI S., BORN G.V.R.

Thromboxane A₂ in skin bleeding-time blood and in clotted venous blood before and after administration of acetylsalicylic acid.
Lancet, 1983, **1**, 1075-1078.

TOD M., PREVOT M., CHALOM J., FARINOTTI R., MAHUZIER G.

Luminarin 4 as a labelling reagent for carboxylic acids in liquid chromatography with peryoxalate chemiluminescence detection.
J. Chromatogr., 1991, **542(2)**, 295-306.

TOHYAMA K., MANABE S., YANAGISAWA H., WADA O., ABE S.

Fluorimetric determination of prostaglandins and thromboxane in plasma by high performance liquid chromatography.
Nippon Eiseigaku Zasshi, 1988, **42(6)**, 1064-1070.

TOYO'OKA T., ISHIBASHI M., TAKEDA Y., NAKASHIMA K., AKIYAMA S., UZU S. IMAI K.

Precolumn fluorescence tagging reagent for carboxylic acids in high-performance liquid chromatography : 4-substituted-7-aminoalkylamino-2,1,3-benzoxadiazoles.
J. Chromatogr., 1991, **588(1-2)**, 61-71.

TURK J., WEISS S.J., DAVIS J.E., NEEDLEMAN P.

Fluorescent derivatives of prostaglandins and thromboxanes for liquid chromatography.
Prostaglandins, 1978, **16(2)**, 291-309.

UDENFRIEND S., GERBER L.D., BRINK L., SPECTOR S.

Scintillation proximity radioimmunoassay utilizing ¹²⁵I-labeled ligands.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1985, **82**, 8672-8676.

UEDELHOVEN W.M., MEESE C.O., WEBER P.C.

Analysis of the major urinary thromboxane metabolites, 2,3-dinorthromboxane B₂ and 11-dehydrothromboxane B₂, by gas chromatography-mass spectrometry and gas chromatography-tandem mass spectrometry.
J. Chromatogr., 1989, **497**, 1-16.

UEMATSU T., SATO R., MIZUNO A., NISHIMOTO M., NAGASHIMA S. and NAKASHIMA M.

A fluorescence polarization immunoassay evaluated for quantifying astromicin, a new aminoglycoside antibiotic.

Clin. Chem., 1988, **34(9)**, 1880-1882.

ULLMAN E.F., KHANNA P.L.

Fluorescence excitation transfer immunoassay (FETI).

Langone J.J., Van Vunakis H. eds

Methods in enzymology, 1981, **74**, 28-60.

URIOS P., CITTANOVA N.

Adaptation of fluorescence polarization immunoassay to the assay of macromolecules.

Anal. Biochem., 1990, **185**, 308-312.

VACAS M.I., DEL ZAR M., DE LAS M., MARTINUZZO M., FALCON C., CARRERAS L.O., CARDINALI D.P.

Inhibition of human platelet aggregation and thromboxane B₂ production by melatonin. Correlation with melatonin levels.

J. Pineal Res., 1991, **11(3-4)**, 135-139.

VAN DEN BELD C.M.B., LINGEMAN H., VAN RINGEN G.J., TJADEN V.R., VAN DER GREEF J.

Laser-induced fluorescence detection in liquid chromatography after preliminary derivatization of carboxylic acid and primary amino groups.

Anal. Chim. Acta, 1988, **205**, 15-27.

VANE J.R.

Adventures and excursions in bioassay : the stepping stones to prostacyclin.

Br. J. Pharm., 1983, **79**, 821-838.

VERMYLEN J., DECKMYN H.

Thromboxane synthase inhibitors and receptor antagonists.

Cardiovascular Drugs and Therapy, 1992, **6**, 29-33.

VESTERQVIST O., GREEN K.

Effects of naproxen on the in vivo synthesis of thromboxane and prostacyclin in man.

Eur. J. Clin. Pharmacol., 1989, **37**, 563-565.

VIAL J.H., McLEOD L.J., ROBERTS M.S.

Rebound elevation in urinary thromboxane B₂ and 6-keto-PGF_{1α} excretion after aspirin withdrawal.

Advances in Prostaglandin, Thromboxane, and Leukotriene Research

Samuelsson B., Paoletti R., Ramwell P., Folco G., Granström E. eds

Raven Press, New York, 1990, **21**, 157-160.

VIG S.K.

Reduction of Fluorescein at DME.

Thèse de l'Université de DELHI, 1967.

VOSS E.W.

Fluorescein hapten : an immunological probe.

Voss E.W. ed.

CRC Press Inc., Boca Raton, USA, 1984, 4-13.

VOYKSNER R.D., BUSH E.D., BRENT D.

Derivatization to improve thermospray HPLC-MS sensitivity for the determination of prostaglandins and thromboxane B₂.

Biomed. Environ. Mass Spectrom., 1987, **14**(9), 523-531.

WAKITANI K., MATSUMOTO R., IMAKAWA H., KAMANAKA Y., NAKA M., HAMANAKA N., OKEGAWA T., KAWASAKI A.

Anti-thrombotic effect of ONO-8809, a novel TxA₂/PG endoperoxide receptor antagonist.

Advances in Prostaglandin, Thromboxane, and Leukotriene Research

Samuelsson B., Paoletti R., Ramwell P., Folco G., Granström E. eds

Raven Press, New York, 1990, **21**, 599-602.

WALDRON K.L., WU S., EARLE C.W., HARKE H.R., DOVICH N.J.

Capillary zone electrophoresis separation and laser based detection of both fluorescein thiohydantoin and dimethyl aminobenzene thiohydantoin derivatives of amino acids.

Electrophoresis, 1990, **11**, 777-780.

WEBER G.

Rotational brownian motion and polarization of the fluorescence of solutions.

Adv. Protein. Chem., 1953, **8**, 415-459.

WEBER G., TEALE F.W.J.

Photoelectric method for the measurement of the polarization of the fluorescence of solutions.

Trans. Faraday Soc., 1957, **53**, 646-649.

WEBER G., TEALE F.W.J.

Fluorescence excitation spectrum of organic compounds in solution.

Trans. Faraday Soc., 1958, **54**, 640-648.

WEERASEKERA R.A., KAOULLAPIS E.N., KIM J.B., BARNARD G.J., COLLINS W.P., KOHEN F., LINDNER H.R.

Chemiluminescence immunoassay of thromboxane B₂.

Advances in Prostaglandin, Thromboxane, and Leukotriene Research

Samuelsson B., Paoletti R., Ramwell P. eds

Raven Press, New York, 1983, **11**, 185-190.

WESSEL K., KAEVER V., RESCH K.

Measurement of prostaglandins from biological samples in the subnanogram range by fluorescence labelling and HPLC separation.

J. Liq. Chromatogr., 1988, **11(6)**, 1273-1292.

YAMAMOTO S., YOKOTA K., TONAI T., SHONO F., HAYASHI Y.

Enzyme immunoassay.

Prostaglandins and Related Substances : a practical approach.

Benedetto C., McDonald-Gibson R.G., Nigam S., Slater T.F. eds

IRL Press, Oxford Washington DC, 1987, 197-208.

YAMANE M., ABE A.

High-performance liquid chromatography-thermospray mass spectrometry of prostaglandin and thromboxane acetyl derivatives.

J. Chromatogr. Biomed. Appl., 1991, **106 (1)**, 11-24.

YAMAUCHI Y., TOMITA T., SENDA M.

High performance liquid chromatographic analysis of arachidonic acid metabolites by pre-column derivatization using 9-anthryldiazomethane.

J. Chromatogr., 1986, **357**, 199-205.

ZANKER V., PETER W.

The phototropic forms of fluorescein.

Chem. Ber., 1958, **91**, 572-580.

ZOUTENDAM P.H., BOWMAN P.B., RUMPH J., RYAN T.M.

Quantitative determination of prostaglandins A₁ and B₁ in alprostadil (PGE₁) by high performance liquid chromatography.

J. Chromatogr., 1984, **283**, 281-287.

ZOUTENDAM P.H., BOWMAN P.B., RYAN T.M., RUMPH J.

Quantitative determination of Alprostadil (PGE₁) in bulk drug and pharmaceutical formulations by high performance liquid chromatography.

J. Chromatogr., 1984, **283**, 273-280.

**AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE
DE LORRAINE**

o o o

BIU NANCY
Service Commun de Documentation
INPL
2, avenue de la Forêt de Haye - B.P. 3
54501 VANDOEUVRE Cédex FRANCE

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

Monsieur SELVE C., Professeur, FAC. DES SCIENCES, Vandoeuvre
Monsieur BROSSIER P., Professeur, fac. sciences PHARMA.

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Mademoiselle MATT Muriel

à soutenir devant l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE,
une thèse intitulée :

**"Concept et développement d'une immunodosage par polarisation de
fluorescence de biomolécules à fonction carboxyle : application à la
prostaglandine E1 et au thromboxane B2."**

en vue de l'obtention du titre de :

**DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE
LORRAINE**

Spécialité : **"GENIE BIOLOGIQUE"**



NANCY BRABOIS
2, AVENUE DE LA
FORET-DE-HAYE
BOITE POSTALE 3
F - 5 4 5 0 1
VANDŒUVRE CEDEX

Fait à Vandoeuvre le, **25 Août 1993**

Le Président de l'I.N.P.L.,

M. LUCIUS

**CONCEPT ET DEVELOPPEMENT D'UN IMMUNODOSAGE
PAR POLARISATION DE FLUORESCENCE DE
BIOMOLECULES A FONCTION CARBOXYLE :
APPLICATION A LA PROSTAGLANDINE E₁ ET AU
THROMBOXANE B₂**

Soutenue le : 8 septembre 1993

par : **MATT Muriel**

Résumé

Une des méthodes immunologiques pouvant être appliquée au dosage de biomolécules de faible masse moléculaire est la **polarisation de fluorescence**. Cette méthodologie a été appliquée aux biomolécules à fonction carboxyle telles que les **éicosanoïdes**, et en particulier au thromboxane B₂, métabolite de la membrane plaquettaire impliqué dans l'hémostase et la thrombose. Les conditions opératoires d'**amidification** ont été optimisées après la synthèse et la purification du marqueur fluorescent, une **fluorescéine fonctionnalisée** par une fonction amine.

La dérivation de la **prostaglandine E₁** (PGE₁), et du **thromboxane B₂** (TxB₂) a permis d'obtenir des traceurs fluorescents qui ont été purifiés par chromatographie sur couche mince. Leurs caractéristiques spectrales ont été déterminées. La conservation de l'immunoréactivité a été vérifiée dans différents systèmes utilisant des marqueurs isotopiques ou enzymatiques. La praticabilité de l'**immunodosage** a été montrée pour la PGE₁. La méthodologie a pu être transposée au TxB₂.

Le TxB₂ libéré par les plaquettes après activation par un agent pro-agrégant a été dosé. Les résultats obtenus sont en accords avec les données bibliographiques.

Mots clefs : polarisation de fluorescence, éicosanoïdes, immunodosage, amidification, fluorescéine fonctionnalisée, prostaglandine E₁, thromboxane B₂