



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>



DEVELOPPEMENT D'UN CONTROLE EN ENZYMOLOGIE
ERYTHROCYTAIRE
APPLICATION A LA GLUCOSE-6-PHOSPHATE
DESHYDROGENASE ET A LA PYRUVATE KINASE

Thèse présentée et soutenue publiquement

le 5 Juin 1991

pour obtenir le titre de
Docteur de l'Université de NANCY I
Option Génie Biologique et Medical

par

Mostafa FATI

Membres du Jury :

Président : Mr le Professeur C. VIGNERON
Juges : Mr le Professeur P. LABRUDE
Mlle le Docteur A. VASSAULT
Mme le Docteur C. GUILLEMIN

A notre Président de thèse

Monsieur le Professeur C. VIGNERON

Professeur d'Hématologie

Doyen de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques
de NANCY 1

Chef de Service de Chimie hématologique au Centre Régional de
Transfusion Sanguine et d'Hématologie de NANCY

Il nous a inspiré le sujet de ce travail.

Nous le remercions de nous avoir accueilli dans son service et de
nous avoir donné les moyens de réaliser ce travail.

Nous avons apprécié sa qualité humaine et scientifique.

Qu'il veuille bien trouver ici l'assurance de notre grande
reconnaissance et de notre profond respect.

A nos Juges

Madame le Docteur C. GUILLEMIN

Docteur ès Sciences Pharmaceutiques
Assistante au Centre Régional de Transfusion Sanguine et
d'Hématologie de NANCY

Qui a suivi avec beaucoup d'intérêt et de soin l'élaboration et la
rédaction de ce travail.

Nous la remercions pour sa patience, son soutien et pour tout le
temps qu'elle nous a consacré.

Nous la prions de croire à notre reconnaissance et nous l'assurons
de notre profond respect.

Monsieur le Professeur P. LABRUDE

Professeur de Physiologie à la Faculté des Sciences
Pharmaceutiques et Biologiques de NANCY 1

Nous avons pu apprécier ses conseils lors de l'élaboration et la
rédaction de ce travail.

Nous lui exprimons ici nos plus vifs remerciements pour l'aide
qu'il nous a apportée et pour avoir bien voulu accepter de siéger
dans notre jury de thèse.

Mademoiselle le Docteur A. VASSAULT

Responsable Adjoint du Contrôle de Qualité National en Biochimie
Membre de la Commission Contrôle de Qualité de la S.F.B.C.
Biologiste des Hôpitaux
Hôpital NECKER-PARIS

Nous avons pu apprécier ses conseils lors de la rédaction de ce travail.

Elle nous a fait le très grand honneur de bien vouloir siéger dans notre jury.

Qu'elle veuille trouver ici l'expression de notre profond respect et de notre dévouement.

A mes Parents

A mes Frères et Soeurs
et à toutes ma famille

A mes Amis

en témoignage de mon affection.

Ce travail a été réalisé au Service de Chimie hématologique du Centre Régional de Transfusion Sanguine et d'Hématologie de NANCY (Directeur : Pr F. STREIFF) sous la direction de Monsieur le Professeur C. VIGNERON et Madame le Docteur C. GUILLEMIN.

Que tous ceux ou celles qui, par leurs conseils ou leur collaboration active, ont permis l'élaboration de ce travail, trouvent ici l'expression de notre sincère reconnaissance

En particulier,

- le personnel et les chercheurs de la section de Chimie hématologique du C.R.T.S. de NANCY-Brabois.
- Monsieur le Docteur J.C. HUMBERT pour l'aide qu'il nous a apporté pour réaliser les calculs statistiques.
- Madame E. TOUSSAINT qui a bien voulu accepter de nous aider pour la dactylographie.

RESUME

Le diagnostic des érythroenzymopathies est fondé sur la mise en évidence de la baisse d'activité de l'enzyme dans les hématies. Cette mesure est délicate pour les raisons suivantes : préparation et conservation des réactifs, précision de la température et du pH, stabilité de l'enzyme au cours du temps. L'inexistence de solutions de contrôle adaptées à l'enzymologie érythrocytaire constitue un handicap qui oblige à recourir à un hémolysat préparé le même jour à partir du sang d'un sujet témoin. L'objectif de ce travail est de préparer un matériel de contrôle destiné aux laboratoires d'analyses médicales pour déterminer des activités enzymatiques et dépister sans erreur les déficits enzymatiques érythrocytaires les plus fréquents, notamment ceux de la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD) et de la pyruvate kinase (PK).

Le travail est divisé en deux parties :

- une première partie, exclusivement bibliographique, comprend un rappel des caractéristiques d'une solution de contrôle enzymatique, une revue des méthodes de stabilisation des enzymes suivie de l'étude des propriétés structurales et catalytiques de G6PD et PK érythrocytaires et de leur exploration biologique.
- La seconde partie rassemble nos travaux expérimentaux permettant de préparer une solution de contrôle à partir d'un hémolysat humain où les deux enzymes endogènes sont stabilisées par l'apport de différents protecteurs.

A partir de l'ensemble de nos résultats nous pouvons proposer les modalités permettant d'obtenir des solutions de contrôle possédant des activités G6PD et PK stables, un comportement et une commutabilité très proches de celles des échantillons des patients :

-solution de contrôle liquide prête à l'emploi : hémolysat additionné de TMAO 1 mol/l, de NADP^+ 0,5 mmol/l, de PEP 0,5 mmol/l et de glutathion réduit 0,1 mmol/l.

-solution de contrôle lyophilisée : hémolysat additionné de saccharose 10%, (ou tréhalose 10% ou raffinose 10%), NADP^+ 0,5 mmol/l, PEP 0,5 mmol/l, N-acétylcystéine 0,25 mmol/l et d'azide de sodium 0,01% (p/v).

mots-clés : solution de contrôle - enzymes érythrocytaires - satabilisation - G6PD - PK.

SUMMARY

Diagnosis of erythrocyte enzyme deficiencies is based upon demonstration of a decreased enzyme activity in patients' red blood cells. This is a difficult task due to several critical aspects : preparation and conservation of the reagents, temperature and pH conditions, enzyme stability within a long time. The absence of any reference material for erythrocyte enzyme studies is a disadvantage which necessitate to prepare a hemolysate from a normal control donor. The purpose of this study is to prepare reference materials suitable for accurate determination of enzyme activities in the diagnosis of frequent erythrocyte enzyme deficiencies such as glucose-6-phosphate dehydrogenase and pyruvate kinase deficiencies.

This study is divided in two parts :

- The first part is a literature review of enzyme reference materials, methods of enzyme stabilisation and structural and catalytic properties of erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase and pyruvate kinase.
- In the second part are presented personal experimental studies on the preparation of control materials, using a human erythrocyte hemolysate in which the endogenous enzymes are stabilized by various protective compounds.

From these experimental data are proposed several methods to obtain reference materials with stable G-6-PD and PK activities as similar as possible to the analogous enzyme in patients :

- Liquide control solution, ready for use : hemolysate with TMAO 1 mol/l, NADP⁺ 0.5 mmol/l, glutathione reduced 0.1 mmol/l.
- Lyophilised control solution : hemolysate with sucrose 10% (or trehalose 10% or raffinose 10%), NADP⁺ 0.5 mmol/l, PEP 0.5 mmol/l, N-acetyl-cysteine 0.25 mmol/l, sodium azide 0.01% (w/v).

Key-Words : control solution, erythrocyte enzymes, stabilisation, G6PD, PK.

PLAN



INTRODUCTION

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

- 1 - Contrôle de qualité des dosages enzymatiques
 - 1.1 - Introduction
 - 1.2 - Solutions de contrôle enzymatiques
 - 1.2.1 - Introduction
 - 1.2.2 - caractéristiques
 - 1.2.3 - Solutions de contrôle d'enzymes érythrocytaires
- 2 - Stabilité des enzymes
 - 2.1 - Structure et dynamique conformationnelle des protéines
 - 2.2 - Denaturation des protéines
 - 2.2.1 - Denaturation thermique
 - 2.2.2 - Denaturation chimique
 - 2.3 - Stabilisation des enzymes
 - 2.3.1 - Enzymes intrinséquement stables
 - 2.3.2 - Stabilisation par les additifs
 - 2.3.3 - La congélation
 - 2.3.4 - La lyophilisation
 - 2.3.5 - Modification chimique des enzymes
 - 2.3.6 - Immobilisation des enzymes
 - 2.3.7 - Effets des méthodes de stabilisation sur les propriétés catalytiques des enzymes
- 3 - Enzymes érythrocytaires
 - 3.1 - Glucose - 6 - phosphate deshydrogénase
 - 3.1.1 - Structure
 - 3.1.2 - Propriétés catalytiques
 - 3.1.3 - Variantes
 - 3.1.4 - Transmission génétique
 - 3.2 - Pyruvate kinase
 - 3.2.1 - Structure
 - 3.2.2 - Propriétés catalytiques
 - 3.3 - Exploration biologique

PARTIE EXPERIMENTALE

I - MATERIELS ET METHODES

1 - Matériels

2 - Réactifs

3 - Méthodes de dosages

3.1 - G6PD

3.2 - PK

3.3 - Autres enzymes

3.4 - Dosage de l'hémoglobine

3.5 - Expression des résultats

4 - Protocole d'étude de la stabilité des solutions de contrôle

4.1 - Préparation de l'hémolysat

4.2 - Conservation d'une solution prête à l'emploi

4.2.1 - Première estimation : Choix d'un stabilisateur

4.2.2 - Conservation à court terme

4.2.3 - Conservation à long terme

4.3 - Conservation d'une solution lyophilisée

4.3.1 - Méthode de préparation

4.3.2 - Essais de dégradation accélérée

5 - Modalités de représentation et d'interprétation des résultats

6 - Propriétés analytiques des différentes solutions

6.1 - Recherche de la méthémoglobine

6.2 - Propriétés catalytiques des enzymes

6.2.1 - G6PD

6.2.2 - PK

6.3 - La commutabilité

6.4 - La viscosité

II - RAPPELS DES RESULTATS DU DEA

- 1 - Introduction
- 2 - Effet de la température sur la stabilité des enzymes
- 3 - Effet du pH sur la stabilité des enzymes
- 4 - Effet des adjuvants à effet protecteur
 - 4.1 - Substrats et coenzymes
 - 4.2 - Composés réducteurs
 - 4.3 - Glycérol et éthylène glycol
- 5 - Essais de lyophilisation

III - RESULTATS

- 1 - Valeurs habituelles
- 2 - Evaluation de la précision des méthodes de mesure de l'activité des enzymes G6PD et PK.
 - 2.1 - Répétabilité
 - 2.2 - Reproductibilité
 - 2.3 - Interférence de l'hémoglobine
 - 2.3.1 - Mode opératoire
 - 2.3.2 - Résultats
- 3 - Solution de contrôle prête à l'emploi
 - 3.1 - Etude de la stabilité des enzymes en fonction de la température
 - 3.1.1 - Mode opératoire
 - 3.1.2 - Résultats
 - 3.2 - Choix d'un stabilisateur : première approche
 - 3.2.1 - Substrats et coenzymes
 - 3.2.2 - Composés réducteurs
 - 3.2.3 - Composés métalliques
 - 3.2.4 - Polyalcools
 - 3.2.5 - Acides aminés
 - 3.2.6 - Dérivés d'acides aminés
 - 3.2.7 - Polymères et macromolécules
 - 3.2.8 - Sels neutres

- 3.2.9 - Solvants
- 3.2.10 - Discussion
- 3.3 - Stabilité à long terme
 - 3.3.1 - Solution de contrôle de la G6PD
 - 3.3.2 - Solution de contrôle de la PK
 - 3.3.3 - Solution de contrôle des deux enzymes
 - 3.3.4 - Autres enzymes
 - 3.3.5 - Discussion
- 4 - Solution de contrôle lyophilisée
 - 4.1 - Conservation à long terme
 - 4.1.1- Polyalcools
 - 4.1.2 - Aspartate de lysine- Sels d'EDTA
 - 4.2 - Test de dégradation accélérée
 - 4.2.1 - Polyalcools
 - 4.2.2 - Aspartate de lysine- Sels d'EDTA
 - 4.3 - Recherche de la méthémoglobine
 - 4.4 - Autres enzymes
 - 4.5 - Stabilité après reconstitution
 - 4.6 - Discussion
- 5 - Propriétés catalytiques et propriétés physico-chimiques
 - 5.1 - Glucose-6-phosphate déshydrogénase
 - 5.1.1 - Constante de Michaelis - Vitesse maximale
 - 5.1.2 - pH optimum
 - 5.1.3 - Analogues du substrat
 - 5.1.4 - Commutabilité
 - 5.2 - Pyruvate Kinase
 - 5.2.1 - Constante de Michaelis - Vitesse maximale
 - 5.2.2 - pH optimum
 - 5.2.3 - Activation par le fructose 1-6-diphosphate
 - 5.2.4 - Commutabilité
 - 5.3 - Viscosité
 - 5.4 - Discussion

IV - CONCLUSION

LISTE DES ABREVIATIONS

Symboles

ADP	=	Adénine - 5'- diphosphate
ATP	=	Adénosine - 5'- triphosphate
BME	=	β mercaptoéthanol
DMF	=	Dimethylformamide
DMSO	=	Dimethylsulfoxyde
DTT	=	Dithiothreitol
EDTA	=	Ethylène diamine tétra acétique
G6P	=	Glucose-6-phosphate
G6PD	=	Glucose - 6 - phosphate deshydrogénase
GSH	=	Glutathion réduit
GSSG	=	Glutathion oxydé
Hb	=	Hémoglobine
KCl	=	Chlorure de potassium
Lact.	=	Lactate
LDH	=	Lactate deshydrogénase
MgCl ₂	=	Chlorure de magnésium
NaCl	=	Chlorure de sodium
NAD	=	Nicotinamide adénine dinucléotide
NADH	=	Nicotinamide adénine dinucléotide réduit
NADP	=	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NADPH	=	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit
PEP	=	Phospho-enol-pyruvate
PK	=	Pyruvate kinase
Pyr.	=	Pyruvate
TEA	=	Triéthanolamine
TMAO	=	triméthyl amine N-oxyde
Tris	=	Tris(hydroxyméthyl)-aminométhane
U.I.	=	Unité Internationale
UV	=	Ultraviolet

Unités

D	=	Dalton
g	=	gramme



j	=	jour
l	=	litre
min	=	minute
ml	=	millilitre
μ mol	=	micromole
mmol	=	millimole



INTRODUCTION

Les érythroenzymopathies, anémies hémolytiques d'origine endoglobulaire, sont devenues plus fréquentes en France en raison de l'apport constant de résidents étrangers originaires plus particulièrement du bassin méditerranéen et du continent asiatique.

Le diagnostic de ce déficit est fondé sur la mise en évidence de la baisse d'activité de l'enzyme dans les hématies. Ce dosage est délicat pour les raisons suivantes : préparation et conservation des réactifs, précision de la température et du pH, stabilité de l'enzyme au cours du temps.

L'inexistence de solutions de contrôle adaptées à l'enzymologie érythrocytaire constitue un handicap qui oblige à recourir à un hémolysat préparé le même jour à partir du sang d'un sujet témoin. Ceci empêche toute standardisation réelle de la mesure d'activité enzymatique ; de ce fait les résultats d'un laboratoire ne peuvent que difficilement être comparés avec ceux obtenus par un autre, et le recours à un laboratoire spécialisé en enzymologie érythrocytaire est la règle.

A notre connaissance seuls Bonderman et col. (28) ont décrit un contrôle de la G6PD érythrocytaire. Une seule solution, limitée à la mesure de l'activité de cette même enzyme, existe sur le marché. Elle est commercialisée par SIGMA et correspond probablement à celle de Bonderman et col. Cette solution est préparée à partir d'un hémolysat de globules rouges auquel est ajoutée une enzyme bactérienne.

L'emploi d'un contrôle en enzymologie érythrocytaire, préparé à partir d'hématies humaines, permettrait de standardiser les mesures d'activités enzymatiques et d'effectuer des contrôles interlaboratoires. Cette solution devrait avoir une matrice et des propriétés catalytiques, proches de celles d'un échantillon humain. C'est ainsi que plusieurs auteurs ont souligné l'importance de l'origine humaine, de la commutabilité et de la stabilité de l'enzyme d'une solution de contrôle.

L'objectif de ce travail est donc de préparer un matériel de contrôle destiné aux laboratoires d'analyses médicales pour déterminer des activités enzymatiques et dépister sans erreur les déficits enzymatiques érythrocytaires les plus fréquents, notamment ceux de la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD) et de la pyruvate kinase (PK).

Le travail est divisé en deux parties :

- une première partie, exclusivement bibliographique, comprend un rappel des caractéristiques d'une solution de contrôle enzymatique, une revue des méthodes de stabilisation des enzymes suivie de l'étude des propriétés structurales et catalytiques de G6PD et PK érythrocytaires ainsi que leur exploration biologique.
- La seconde partie rassemble nos travaux expérimentaux dont le but est de préparer une solution de contrôle à partir d'un hémolysat humain où les deux enzymes endogènes sont stabilisées par l'apport de différents protecteurs.

Dans un premier temps, notre étude porte sur la préparation d'une solution prête à l'emploi. Pour cela nous testons, par dégradation accélérée aux températures de 50°C pour la G6PD et de 56°C pour la PK, plusieurs protecteurs appartenant à différentes classes chimiques. Une étude de la stabilité à long terme des deux enzymes à +4°C et à -20°C, est réalisée avec l'association des composés ayant un effet protecteur à faible concentration et ceux ayant un effet protecteur à forte concentration.

Dans un deuxième temps, la lyophilisation est mise en œuvre pour augmenter la stabilité des enzymes en présence de plusieurs lyoprotecteurs. Ces composés appartiennent à différentes classes chimiques : polyalcools, sels d'acides aminés et sels d'EDTA. L'étude en temps réel de ces solutions est complétée par une étude de dégradation accélérée, ce qui permet de calculer la vitesse de dégradation du matériel de contrôle.

Après avoir déterminé les meilleures conditions de protection de la G6PD et de la PK érythrocytaires, nous étudions

la stabilité d'autres enzymes d'intérêt clinique (glutathion réductase, glutathion peroxydase, galactose-1-phosphate uridyl transferase) et mesurons leurs activités catalytiques après 13 mois de conservation dans les hémolysats liquides et lyophilisés les plus stables.

Dans un troisième temps, nous étudions les propriétés catalytiques de la G6PD et de la PK dans les hémolysats stabilisés ou reconstitués (K_m , V_m , analogues de substrats, action d'un effecteur) ainsi que la commutabilité entre deux méthodes de dosage.

L'ensemble de ce travail a été réalisé au Centre Régional de Transfusion Sanguine et d'Hématologie de NANCY dans le laboratoire du Professeur C. Vigneron sous la direction du Docteur C. Guillemin.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

1- CONTROLE DE QUALITE DES DOSAGES ENZYMATIQUES

1.1. INTRODUCTION

Les résultats d'une analyse dépendent des conditions expérimentales utilisées. Il est souvent difficile de ce fait de comparer des résultats provenant de plusieurs laboratoires ou d'évaluer les performances analytiques des différents appareils et systèmes.

L'erreur commise lors d'une mesure d'activité résulte d'un grand nombre d'erreurs partielles. Une première subdivision consiste à séparer les erreurs aléatoires, groupées sous le nom de reproductibilité et les erreurs systématiques ou erreurs d'exactitude. L'erreur de reproductibilité peut être appréciée en répétant une analyse sur une même solution dont le titre n'est pas nécessairement connu ; par contre il est nécessaire d'avoir une solution de titre connu pour évaluer l'erreur d'exactitude. Ainsi un matériel de contrôle permettra de vérifier la reproductibilité d'un jour à l'autre d'une méthode, son exactitude par rapport à une méthode de référence et de comparer différentes techniques de dosage lors d'un contrôle interlaboratoires (12, 37, 42).

Les matériaux de contrôle permettent donc de caractériser la précision d'un processus analytique et d'avoir une information sur la qualité des résultats des échantillons cliniques.

1.2. SOLUTIONS DE CONTROLE ENZYMATIQUES

1-2-1-Introduction

Le dosage d'une enzyme dans les liquides biologiques est effectué par la mesure de son activité catalytique, ce qui crée de nombreux problèmes :(30, 31, 150, 151, 167, 168, 172, 195, 196):

1) L'activité d'une enzyme dépend de plusieurs facteurs dont le pH, la température, la concentration et la nature du substrat, le tampon et sa molarité. La valeur assignée à une solution de contrôle dépend de la méthode utilisée.

2) Les enzymes, comme toutes les protéines, sont peu stables ; la dénaturation conduit à une perte d'activité catalytique ; il en résulte des difficultés pour apprécier la répétabilité d'une méthode d'un jour à l'autre .

3) Dans plusieurs techniques de dosage enzymatique, une enzyme secondaire est ajoutée pour mesurer le produit de l'enzyme originale. Ces enzymes sont elles mêmes instables et leurs activités sont elles aussi méthode-dépendante.

4) Des interférences dues à la présence d'effecteurs (inhibiteurs ou activateurs) dans l'échantillon clinique ou dans les réactifs peuvent fausser les résultats des dosages.

1-2-2-Caractéristiques

Les caractéristiques des solutions de contrôle ont été discutées par de nombreux auteurs (30, 31, 37, 101, 152, 167, 168). Les deux propriétés primordiales qui en ressortent sont la stabilité et un comportement identique aux échantillons cliniques.

a) La stabilité : La plupart des solutions de contrôle sont sous forme lyophilisée, ce qui permet une plus grande période de stabilité. Il est préférable que ces solutions soient stables au moins un an à l'état lyophilisé et six heures après reconstitution (101).

b) "Comportement" des enzymes: Cette propriété, décrite souvent sous le nom de "commutabilité", se définit comme la possibilité, pour une solution de contrôle enzymatique, d'avoir des rapports d'activité entre deux techniques différentes comparables à ceux de l'enzyme humaine.

La présence de conservateurs ou stabilisateurs dans ces solutions et l'ajout d'enzymes d'origine animale ou microbienne afin d'obtenir une activité supranormale entraîne une différence de comportement entre les solutions de contrôle et les liquides biologiques à tester.

Le comportement de certaines enzymes d'origine animale est identique à celui des enzymes d'origine humaine. Des préparations enzymatiques (créatine kinase, γ -glutamyl transferase, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, glutamate deshydrogenase, lactate deshydrogenase, malate deshydrogenase) d'origine humaine et porcine isolées à partir du même organe et purifiées de la même manière possèdent des pH optimums et des constantes de Michaelis identiques (85). Ainsi, une solution de contrôle destinée au dosage de la γ -glutamyl-transférase a été préparée à partir de l'enzyme porcine isolée du rein et lyophilisée dans une matrice contenant la sérum albumine bovine (60 g/l) ; cette préparation montre un comportement et des propriétés cinétiques identiques à celles des sérums humains (182). Des sérums enrichis par de la créatine kinase du cœur du porc ont été analysés en même temps que des sérums contenant l'enzyme du muscle squelettique humain par plusieurs méthodes. Les deux groupes montrent un comportement très peu différent et peuvent ainsi être utilisés dans le contrôle de qualité des dosages enzymatiques (133).

Les enzymes d'origine animale ont des propriétés catalytiques souvent différentes de celles des enzymes humaines. Ainsi, l' α -amylase d'origine porcine, ajoutée au sérum, montre un comportement différent de celle du sérum humain ; par contre l' α -amylase pancréatique et salivaire d'origine humaine montre la même commutabilité que le sérum humain (32).

L'utilisation des enzymes humaines dans le contrôle de qualité serait préférable, mais elle est limitée pour des raisons éthiques. Deux organes seulement sont facilement disponibles, le sang ou fraction de sang et le placenta. Certaines enzymes ont été purifiées à partir de globules rouges (ex. la LDH) et ont été utilisées dans la préparation des sérums de contrôle (51).

Des enzymes d'origine humaine, extraites d'organes différents peuvent avoir un comportement plus ou moins différent de celles du sérum humain. Ainsi les propriétés de la phosphatase alcaline humaine extraite à partir de différents organes et placée dans une matrice d'albumine ont été comparées

à celles des sérums humains (64) ; les constantes de Michaelis des préparations du foie, du tissu osseux et de l'intestin sont identiques à celles du sérum humain, alors que celle du placenta est significativement différente.

c) Influence de la matrice : Les sérums de contrôle enzymatiques sont préparés à priori à partir du sérum humain, mais la turbidité de ces solutions après lyophilisation fait que les sérums sont remplacés par de l'albumine humaine, l'albumine bovine ou par des substances synthétiques.

La matrice, milieu dans lequel baigne l'analyte, peut avoir un comportement différent de celui du sérum humain. Les facteurs qui influencent le comportement de la matrice incluent le stockage, la lyophilisation, la reconstitution, les additifs ...

L'effet de la matrice sur l'activité enzymatique peut être d'ordre physique: Il est dû à une différence des propriétés physiques du matériel de contrôle et du sérum ou bien d'ordre chimique. Dans ce cas, il est lié à la non spécificité de la méthode analytique ou aux interférences.(52).

Les facteurs qui peuvent influencer les propriétés d'une solution de contrôle sont résumés dans le tableau n° I.

1- Comportement lié à l'enzyme

- pH
- concentration du substrat
- inhibiteurs/activateurs
- température de la réaction

2- Effet de la matrice

- physique : viscosité, turbidité
- chimique : interférence avec d'autres enzymes, substrats endogènes, additifs ...

Tableau I: Facteurs susceptibles d'influencer le comportement d'une solution de contrôle enzymatique, d'après Jung et col. (101).

Plusieurs méthodes d'étude ont été décrites pour vérifier la "commutabilité" des solutions de contrôle et l'effet de la matrice (31, 102, 167, 168) :

- Etude des propriétés cinétiques de l'enzyme : des paramètres cinétiques tels que la constante de Michaelis (K_m), le pH optimum, la variation de l'activité en fonction de la température de la solution de contrôle sont comparés à ceux des échantillons cliniques.
- Méthode des rapports : les solutions de contrôle ainsi que les échantillons cliniques sont analysés par plusieurs méthodes ; les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport à une méthode de référence.
- Dans le cas où plusieurs échantillons sont examinés par plusieurs méthodes d'analyse, on ne peut pas comparer les échantillons en même temps que les méthodes entre elles à l'aide des techniques précédentes ; pour cela on fait appel à une méthode statistique, l'analyse des correspondances (167, 168).

d) Valeurs cibles du fabricant: Les valeurs données par le fabricant doivent être précises. L'évaluation doit être réalisée par une ou deux méthodes de référence et à deux températures différentes. Les techniques utilisées quant aux concentrations finales des réactifs, le tampon, le pH, la température sont précisées.

D'autres propriétés des matériaux de contrôle sont plus ou moins importantes selon leur utilisation comme standard, contrôle interméthode, contrôle de précision, ou comme contrôle intraméthode. Ces propriétés sont résumées dans le tableau n° II.

<u>caractéristiques</u>	standard	contrôle interméthode	contrôle de précision	contrôle intraméthode
-commutabilité	+	+	0	0
-propriétés des enzymes humaines	+	+	+	-
-origine humaine de l'enzyme	+	+	+	0
-nécessité d'une seule isoenzyme	-	-	-	0
-matrice équivalente	-	+	+	+
-nécessité d'une saturation de l'enzyme en cofacteur	+	+	+	-
-activité spécifique élevée	+	0	0	0
-absence de chromogène	+	+	+	-
-absence d'enzymes pouvant interférer dans le dosage	+	+	+	-
-absence d'enzymes indicatrices	+	+	0	+

+: propriété nécessaire ; 0: propriété non nécessaire ; -: propriété indésirable

Tableau n° II : caractéristiques des matériaux de contrôle, d'après Fasce et col. (68).

1-2-3-Solutions de contrôle d'enzymes érythrocytaires:

Les études faites sur le contrôle de qualité en biologie clinique ont pour la plupart porté sur le dosage d'analytes du sérum. Peu d'études ont été consacrées au contrôle de qualité dans d'autres liquides biologiques (globules rouges, urines ...) soit parce que les moyens techniques de le réaliser demeurent incertains, soit parce que leurs utilités ne s'est pas fait ressentir.

Une seule solution d'enzyme érythrocytaire a été décrite par Bonderman et col. (28). Elle est utilisée comme contrôle du dosage de la G6PD. Cette solution est préparée de la façon suivante: à partir d'hématies périmées, les auteurs préparent un hémolysat à 144 g/l d'hémoglobine. Ce matériel est laissé au réfrigérateur pendant une période d'une semaine, au terme de laquelle ils obtiennent une activité G6PD très faible. Un lyoprotecteur, le lactose, est ajouté à la concentration de 150 g/l d'hémolysat. Ce matériel est centrifugé à 36000 g à 5°C pendant 10 mn. On prélève le surnageant auquel on ajoute de la G6PD, provenant de la levure *Torula*, pour avoir une activité de 5,8 U/g d'hémoglobine. Cette solution, divisée en aliquotes, est ensuite lyophilisée.

L'enzyme extraite de la levure possède des propriétés catalytiques différentes de celles de l'enzyme érythrocytaire. Les constantes catalytiques des deux enzymes diffèrent selon les auteurs et dépendent des méthodes de caractérisation. Selon Anstall et col.(3) les constantes de Michaelis de l'enzyme de la levure pour le glucose-6-phosphate et pour le NADP sont respectivement de 58 et 20 $\mu\text{mol/l}$; celles de l'enzyme érythrocytaire sont de 35 et 4 $\mu\text{mol/l}$. La G6PD de cette solution de contrôle, ayant un comportement différent de l'enzyme humaine, peut ainsi présenter des problèmes d'interprétation des résultats lors de son utilisation comme contrôle de qualité.

Nous avons vu que les principales propriétés d'une solution de contrôle enzymatique sont la stabilité et un comportement identique aux échantillons humains. Ainsi nous passerons en

revue dans le chapitre suivant l'ensemble des méthodes de stabilisation des protéines et leur influence sur les propriétés catalytiques des enzymes. Un autre chapitre sera réservé aux deux enzymes érythrocytaires concernées par cette étude: la glucose-6-phosphate deshydrogénase (G6PD) et la pyruvate kinase (PK).

-

2- STABILITE DES ENZYMES

De nos jours les enzymes sont utilisées dans plusieurs domaines : en industrie alimentaire, pharmaceutique, et en médecine. De nombreux problèmes liés à leur stabilité limitent leur utilisation. Des progrès importants ont été réalisés ces dernières années grâce à l'utilisation de techniques d'immobilisation, de modification chimique ou simplement par l'apport d'additifs. La stabilité d'une enzyme ou plus généralement d'une protéine dépend de sa structure et du milieu environnant.

2.1 STRUCTURE ET DYNAMIQUE CONFORMATIONNELLE DES PROTEINES.

Les protéines sont des polymères possédant plusieurs degrés d'organisation :

- La structure primaire correspond à l'enchaînement des acides aminés liés par des liaisons peptidiques. On compte une vingtaine d'acides aminés différents. Leur enchaînement résulte de la condensation des groupements α -carboxyles et α -aminés avec élimination d'une molécule d'eau. La séquence linéaire est donc assurée par des liaisons peptidiques: $\text{---}\underset{\text{O}}{\text{C}}\text{---}\text{N}\text{---}$

- La structure secondaire résulte du repliement de la chaîne peptidique en hélices α et en chaînes β .

- La structure tertiaire correspond à l'organisation tridimensionnelle de la protéine résultant d'interactions de faible énergie: liaisons hydrogène, hydrophobes, interactions polaires, liaisons de Van-der-Waals...

- La structure quaternaire correspond à l'arrangement des sous-unités protéiques en oligomères de plus haut poids moléculaires.

Les conditions qui assurent la stabilité des protéines sont liées au milieu dans lequel celles-ci sont dissoutes. En effet dans un milieu donné, la protéine va adopter la conformation de plus faible énergie (83). Les diverses liaisons non covalentes qui contribuent à la stabilité conformationnelle des protéines en solution résultent non seulement des interactions entre les

groupes polaires ou entre les groupes non polaires de la molécule, mais aussi des interactions entre ces groupes et le solvant.

La structure organisée que présentent les protéines "natives" est fonction des propriétés de l'eau (65). De ce fait, après dessiccation ou dissolution dans des solvants non aqueux beaucoup de protéines perdent leurs propriétés biologiques.

L'eau, de par sa nature polaire, possède, en l'absence de tout soluté, un certain degré d'organisation. En ajoutant un composé en solution cette organisation de l'eau est modifiée à proximité des substances dissoutes. Il est possible de décrire plusieurs états de l'eau associée aux protéines (50):

- l'eau de "structure" ou de "constitution", liée à la protéine par des liaisons hydrogènes, contribue à stabiliser la structure de la protéine, et n'est pas disponible comme solvant ou comme réactif. Bien que cette eau ne soit présente qu'en faible quantité, il n'est pas possible de l'extraire sans provoquer des modifications considérables de la conformation et des propriétés fonctionnelles de la protéine.

- l'eau de la "couche monomoléculaire", adsorbée sur des sites spécifiques de la protéine (chaînes latérales ionisées ou non ionisées) par l'intermédiaire de liaisons hydrogène ou d'interactions dipôle-dipôle. Cette eau représente 40 à 90 mg par g de protéine, elle n'est pas (ou peu) disponible comme solvant ou comme réactif, et forme une première "couche" autour de la molécule protéique.

- l'eau "non congelable": Des interactions fortes avec la protéine empêchent cette eau de cristalliser lors de l'abaissement de température. L'eau "non congelable" inclue l'eau de structure et l'eau de la couche monomoléculaire, et représente jusqu'à 0,3-0,5g par g de protéine. La plus grande partie de cette eau se trouve sous forme de "couches" successives autour de la protéine. Ces couches sont liées les unes aux autres par l'intermédiaire de liaisons hydrogène et d'interactions dipôle-dipôle. Cette partie de l'eau non congelable est disponible en tant que solvant et réactif.

- l'eau d' "hydratation hydrophobe" est moins bien définie et contribue également à la conformation de la protéine. Cette eau serait plus structurée à proximité des régions hydrophobes de la protéine. Des études montrent que des composés hydrophobes de

faible poids moléculaire en solution aqueuse augmentent l'ordre de structure de l'eau par suite d'un accroissement de liaisons hydrogène entre les molécules d'eau.

- l'eau "capillaire" ou d' "imbibition" est retenue physiquement entre les molécules protéiques. Cette eau est disponible comme solvant ou comme réactif (pour des réactions d'hydrolyse par exemple).

- l'eau d' "hydratation hydrodynamique" entoure les molécules protéiques en solution et se déplace avec ces dernières lors de mouvements de diffusion ou autres mouvements (électrophorèse par exemple).

Dans un milieu aqueux, les groupes non polaires de la protéine ont tendance à éviter le contact avec le solvant et se placent à l'intérieur, tandis que les chaînes latérales polaires se mettent en général au contact du solvant (71, 74, 98, 179). Il se forme ainsi un "noyau" hydrophobe. La surface protéique au contact du solvant diminue, conférant à l'état natif de la protéine sa compacité. La géométrie de la chaîne polypeptidique repliée est déterminée par les interactions intramoléculaires des divers acides aminés d'un côté , et les interactions intermoléculaires avec le solvant de l'autre côté conférant à la protéine une organisation de plus faible énergie (97). Mais des contraintes dues aux liaisons covalentes de la chaîne peptidique entraînent l'apparition de résidus hydrophobes à la surface de la protéine et de résidus hydrophiles à l'intérieur. La surface protéique se présente alors comme une mosaïque de régions hydrophiles et de régions hydrophobes (74).

Les interactions de l'eau avec les différentes régions de la protéine ne sont pas identiques. En effet, certains composés hydrophobes de faible poids moléculaire en solution aqueuse montrent une augmentation de l'ordre de structure de l'eau, thermodynamiquement non favorable. On pense alors que dans les protéines, l'eau est hautement ordonnée à proximité des régions hydrophobes et qu'elle serait moins ordonnée à proximité des régions hydrophiles (74, 176).

2.2. DENATURATION DES PROTEINES

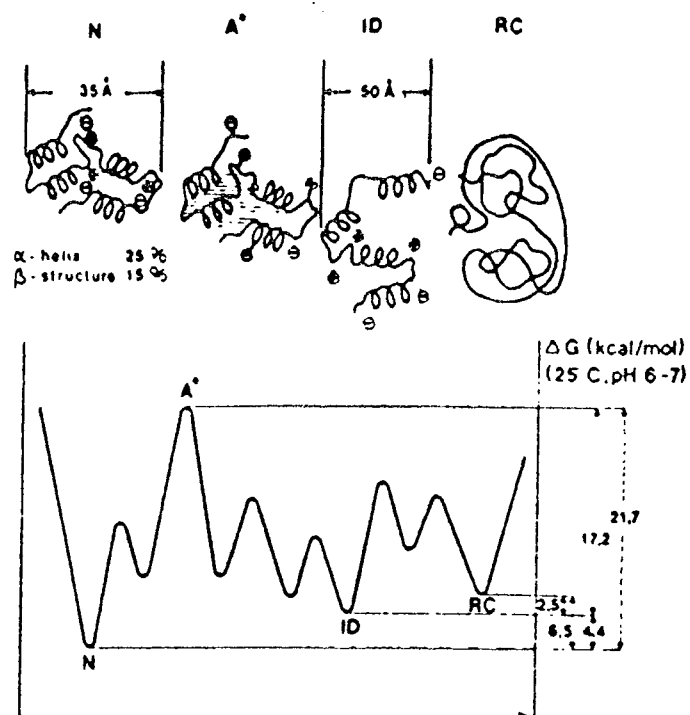
Les protéines sont caractérisées par une conformation hautement structurée. Malgré cette compacité, la structure protéique n'est pas rigide: elle peut subir au cours du temps ou sous l'influence de facteurs physiques ou chimiques un changement de conformation connu sous le nom de dénaturation. Celle ci est définie comme étant l'alteration de la structure globale de la protéine (structure tertiaire et souvent structure secondaire).

Le plus souvent la dénaturation est considérée comme un processus de "tout ou rien". Les études montrent que c'est un processus complexe comprenant plusieurs états intermédiaires, rarement stables, qui ne peuvent être identifiés séparément. Ainsi l'étude de l' α -lactalbumine dénaturée à l'aide du chlorure de guanidine à différentes températures montre l'existence d'intermédiaires possédant des structures secondaires comparables à celle de la molécule native (figure 1) (82, 120, 183).

La dénaturation peut être réversible par élimination de l'agent dénaturant ou par simple baisse de la température du milieu. Ghelis et Yon suggèrent que la renaturation de l' α -lactalbumine commence par la formation de structures secondaires hélicoïdales régies par des interactions locales. Ensuite la compacité des segments d'hélices se fait à l'aide d'interactions hydrophobes et enfin la stabilisation de l'édifice macro-moléculaire est réalisée par des interactions électrostatiques (82, 120).

Les protéines, de part leurs propriétés physiques et chimiques, peuvent subir plusieurs types de dégradations:

- dégradation physique: elle implique essentiellement les changements dans l'organisation tridimensionnelle de la protéine mais ne concerne pas les modifications covalentes. Il existe plusieurs agents de dénaturation physiques ; la dénaturation thermique en est le mode le plus important.
- dégradation chimique: elle implique la formation ou la destruction de liaisons donnant une nouvelle entité chimique.



N = conformation native

A* = état activé

ID = conformation incomplètement dénaturée

RC = état complètement dénaturé (random coil)

Figure n° 1: Illustration schématique des transitions conformationnelles réversibles de l' α -lactalbumine (in Schmid (183)).

Dans un milieu biologique, les protéines peuvent être soumises à la dégradation protéolytique par des protéases.

2-2-1-Dénaturation thermique

Les travaux de Klibanov ont porté plus spécifiquement sur la dénaturation des enzymes (118). La première étape de la thermodénaturation serait un déploiement de la molécule: Dans les conditions normales, la structure native, catalytiquement active de l'enzyme, est maintenue par un "faible" équilibre entre diverses forces. Lorsque la température augmente, toutes ces forces non covalentes diminuent, exceptées les interactions hydrophobes qui restent significatives jusqu'à 60°C environ. La molécule protéique se déploie conduisant à une désorganisation du site actif et donc une inactivation de l'enzyme.(118).

Le déploiement semble être une étape générale de l'inactivation thermique des enzymes. Par contre, les événements qui lui succèdent sont spécifiques de chaque enzyme. Ils peuvent être divisés en deux groupes : changements covalents et changements non-covalents (figure 2).

a-Changements covalents: Ils sont dus à des interactions chimiques entre les différentes parties de la protéine. Ces réactions sont souvent très lentes à température ambiante, c'est le cas des groupements cystéine et cystine dont la réduction peut conduire à la formation de nouvelles liaisons inter ou intramoléculaires.

b-Changement non covalents: Les enzymes déployées peuvent subir deux types de transformations : Une agrégation (transformation polymoléculaire) ou la formation de structures anormales (transformation monomoléculaire).

Au cours du déploiement, les régions hydrophobes de la molécule sont exposées au solvant. Pour réduire l'énergie libre du système, les molécules déployées interagissent entre elles à l'aide de leurs sites hydrophobes conduisant ainsi à leur agrégation.(118).

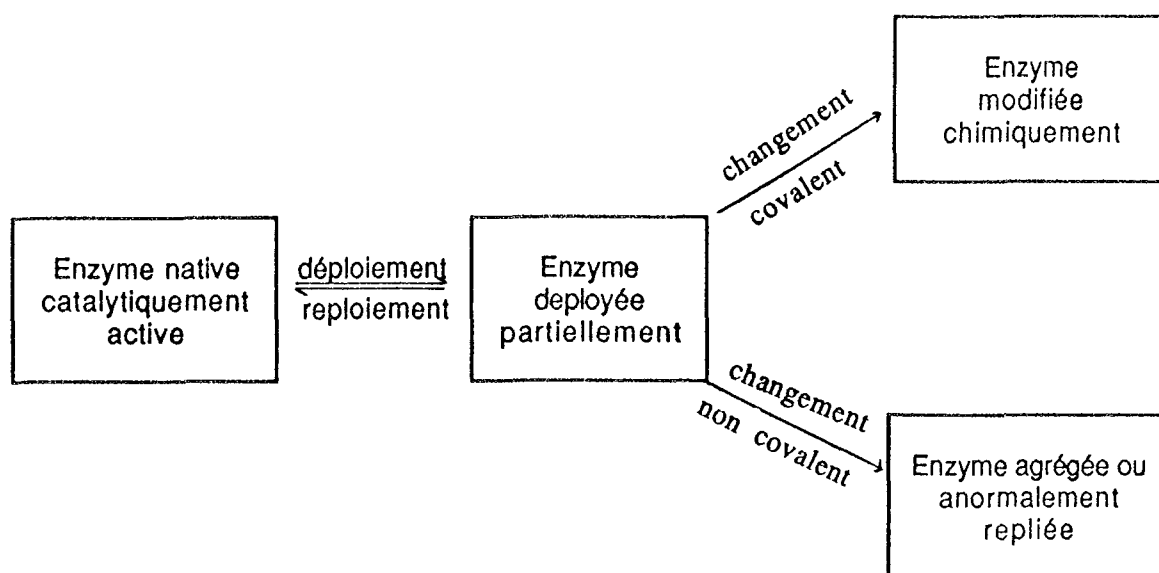


Figure n° 2 : Différentes étapes de l'inactivation thermique des enzymes d'après KLIBANOV (118).

2-2-2- Dénaturation chimique

Plusieurs réactions chimiques peuvent affecter les protéines. Parmi elles, l'hydrolyse des liaisons peptidiques, la desamidation des groupements asparagine (Asn) et glutamine (Gln), l'oxydation de la cystéine et de la méthionine, la β élimination et la racémisation sont les plus étudiées (136).

a- hydrolyse des liaisons peptidiques

La protéolyse peut être réalisée expérimentalement par action de la chaleur et à pH acide. Il a été observé que les liaisons des résidus Asp sont hydrolysées dans ces conditions à une vitesse 100 fois supérieure à celle des autres acides aminés. Les liaisons Asp-Pro sont particulièrement plus labiles et peuvent être hydrolysées plus facilement (107).

b- la desamidation

Le résidu amide de l'asparagine (Asn) ou de la glutamine (Gln) est hydrolysé pour former un acide carboxylique libre. Ce processus observé dans plusieurs protéines *in vivo* joue un rôle essentiel dans la dégradation et le renouvellement des protéines et serait probablement sous contrôle génétique (170).

L'hydrolyse des résidus Asn et Gln a été étudiée expérimentalement dans différentes conditions chimiques (93, 170). La desamidation des résidus Asn, en particulier celle des séquences Asn-Gly, est plus rapide que la desamidation des autres séquences d'acides aminés. Le mécanisme de cette réaction fait intervenir un intermédiaire imide cyclique. Celui-ci est hydrolysé spontanément en donnant un mélange de peptides dans lequel la chaîne peptidique est attachée à l'aide d'une liaison α carboxyl (Asp) ou β carboxyl (iso-Asp) (119, 136). Des études de différents peptides montrent que la Gln peut subir une desamidation mais à une vitesse plus réduite (136).

La vitesse de desamidation serait influencée par les propriétés physico-chimiques des acides aminés voisins, par le pH, la température et la force ionique du milieu (136, 170).

c- oxydation

Les résidus His, Met, Cys, Trp et Tyr des protéines sont des sites potentiels d'oxydation. Cette réaction a été observée au cours de la purification ou le stockage de plusieurs hormones peptidiques (136).

L'oxydation des résidus Met en groupements sulfoxides est accompagnée d'une perte de l'activité biologique des hormones peptidiques et des protéines (39, 56, 136, 188). Dans certaines conditions stériques favorables, des groupements thiols très rapprochés peuvent former des liaisons disulfure intramoléculaires conduisant à l'agrégation de la protéine. Les groupements thiols peuvent s'oxyder non seulement en présence de réactifs oxydants mais aussi spontanément au contact de l'oxygène de l'air (autooxydation). La vitesse de la réaction est influencée par plusieurs facteurs : la température, le pH, la nature du tampon, l'existence de catalyseurs (traces d'ions métalliques par exemple), la pression en oxygène et la nature des acides aminés voisins (56, 136).

d- autres réactions chimiques

D'autres réactions chimiques peuvent affecter les protéines plus particulièrement au niveau des groupements sulfhydriles et des liaisons disulfure. Les propriétés des ponts disulfures et la grande réactivité chimique des groupes thiols peuvent donner

lieu à des réactions d'échange. Celles ci, lorsqu'elles s'effectuent entre plusieurs molécules, peuvent contribuer à des phénomènes d'agrégation consécutifs à la dénaturation. Les ponts disulfures, par suite de leur caractère covalent et des conditions stériques qu'ils imposent, contribuent pour une part importante à la géométrie spatiale de l'édifice macromoléculaire en restreignant les possibilités de repliement de la chaîne primaire et en lui imposant certaines contraintes. La dénaturation des protéines par la chaleur résulte souvent de la destruction de ces ponts disulfures. Cette dénaturation peut s'effectuer chimiquement par β -élimination à faible température et à pH élevé. D'autres résidus d'acides aminés peuvent subir une β -élimination, c'est le cas de la Cys, Ser, Thr, Phe et la Lys. Cette réaction s'effectue par la formation d'un carbanion intermédiaire conduisant soit à une β -élimination soit à une racémisation (figure 3) (119, 136).

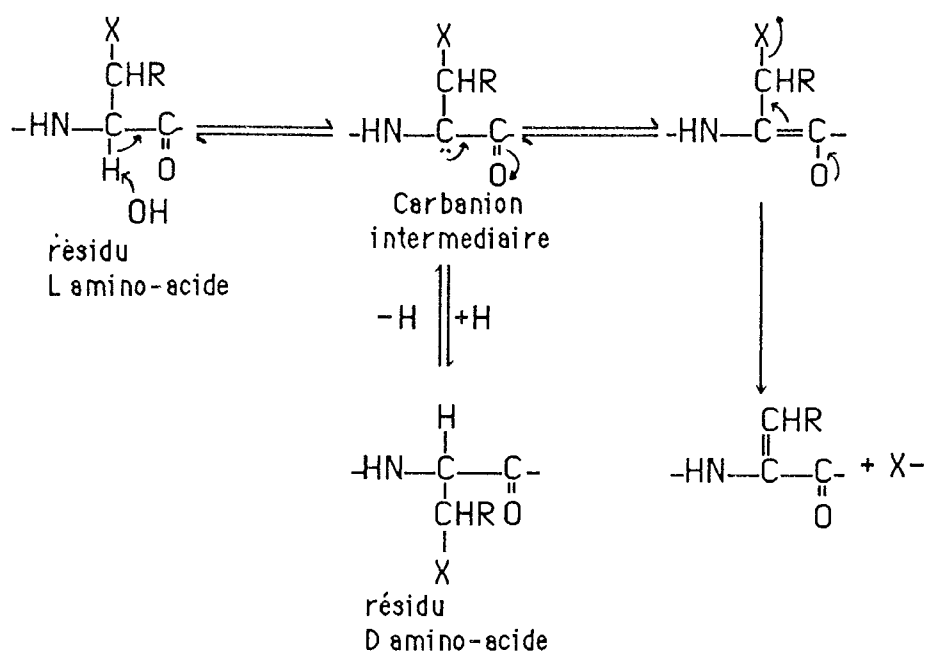


Figure n° 3 : mécanisme des réactions de β -élimination et de racémisation en milieu alcalin (136).

e- agents dénaturants chimiques:

La dénaturation des protéines a été étudiée à l'aide d'agents dénaturants tels que l'urée, le chlorure de guanidine, les acides, les bases, les sels neutres et les détergents.

Le mécanisme d'action de ces composés est complexe et mal défini. Dans beaucoup de cas, la dénaturation entraînée par la présence de ces composés résulte de leur association avec les protéines (74).

La surface protéique est une mosaïque de régions ayant différents degrés d'hydrophobicité. Les composés organiques non polaires vont s'attacher à différents degrés à la macromolécule protéique native. Inversement, il y'aura une exclusion de ces composés à proximité des régions très hydrophiles comme les groupements chargés (65, 74).

Les études de la dénaturation font intervenir souvent des méthodes thermodynamiques ou des études de l'état d'hydratation des protéines.

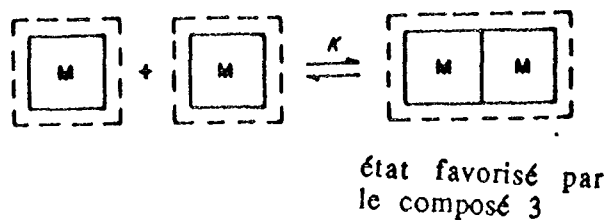
Les méthodes thermodynamiques constituent le moyen usuel pour caractériser l'affinité de la protéine vis à vis du dénaturant. Il est généralement admis que dans un milieu donné la protéine prend la conformation de plus faible énergie (83, 179).

L'hydratation des protéines est aussi un autre paramètre d'étude de cette interaction avec les effecteurs chimiques. Elle est de l'ordre de 0,2 g - 0,5 g d'eau par g de protéine (4).

Dans un système eau-protéine-additif, l'affinité de l'additif pour la protéine est caractérisée par son paramètre d'interaction préférentielle (9). Les composés qui ont un paramètre d'interaction négatif comme le glycérol, les sucres et certains sels neutres sont exclus de la protéine qui devient alors préférentiellement hydratée. Cette exclusion n'est thermodynamiquement pas favorable ; le système tend à la réduire par la diminution de la surface de contact entre la protéine et le solvant en renforçant l'association entre les monomères de la protéine et en déplaçant l'équilibre vers la forme native plus compacte (figure 4). Les composés ayant un paramètre d'interaction positif sont quant à eux préférentiellement liés à la protéine provoquant ainsi sa déshydratation ; ces composés ont un effet dénaturant (9).

L'effet d'un composé sur la conformation d'une protéine peut être lié à d'autres paramètres tels que la tension de surface (145), la constante diélectrique (70) ou l'effet sur la structure

(A) autoassociation



(B) déploiement

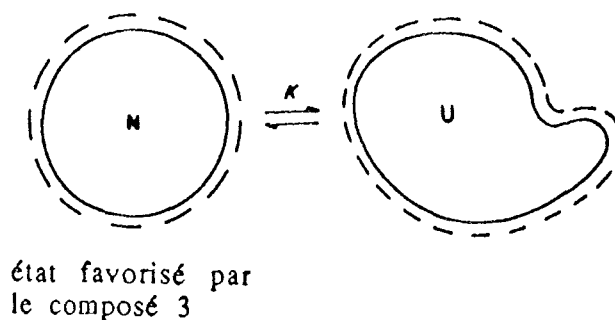


Figure n° 4 : Diagramme schématique des changements de volume d'exclusion d'un cosolvant au cours des réactions de dénaturation.

A) autoassociation de deux monomères (M) de la molécule protéique en dimère par exclusion du soluté. La zone d'exclusion est représentée par la ligne discontinue autour des macromolécules. On montre que la dimerisation réduit la zone d'exclusion du cosolvant. L'équilibre sera déplacé à droite.

B) stabilisation de la structure protéique native à l'aide du soluté exclu du contact avec la protéine. Un chagement de la structure native (N) en une structure dénaturée (D) augmenterait la zone d'exclusion du composé 3 (indiquée par la ligne discontinue) thermodynamiquement non favorable. L'équilibre sera déplacé à gauche (d'après ARAKAWA et TIMASHEFF (9)).

tridimensionnelle de l'eau (65, 74). Dans ce dernier cas, les composés stabilisateurs ont tendance à augmenter l'ordre de structure de l'eau. L'altération de cet ordre déplacerait l'équilibre entre la forme native de la protéine et la forme dénaturée en faveur de cette dernière (65, 74). Le remplacement de l'eau par un solvant plus structuré tel que l'eau lourde confirme cette observation ; D₂O possède un plus grand degré d'organisation structurale que l'eau et une plus grande viscosité. Dans l'eau pure, la demi-vie de l'invertase (β -D-furanosidase E.C.3.2.1.26) à 60°C est de 10 mn. alors que sa demi-vie dans l'eau lourde atteint 36 mn. (58).

- acides et bases

Le pH du milieu dans lequel la protéine est placée a une influence considérable sur le processus de dénaturation. La plupart des protéines sont stables dans une zone donnée de pH et sont souvent dénaturées lorsqu'elles sont soumises à des valeurs de pH très élevées ou très faibles (183).

- sels neutres

Les protéines sont souvent précipitées à l'aide des sels neutres au cours de leur purification. Cette précipitation est due à une diminution de leur solubilité (salting out).

Von Hippel et col. ont étudié l'effet des ions sur la stabilité des protéines (figure n° 5) ; ils montrent une corrélation positive ou négative entre la concentration de ces ions et la température de transition (T_m) d'une protéine (température à laquelle la moitié des molécules sont dénaturées). L'effet total d'un sel est approximativement égal à la somme des effets des ions qui le constituent . L'ordre d'action des différents ions suit exactement la série lyotrope d'Hofmeister (212).

pour les anions : KCN- I- Br- NO₃- Cl- CH₃COO- SO₄--

Les ions situés vers l'extrémité thiocyanate, agissent généralement comme dénaturants, les autres agissent souvent comme protecteurs. Alors que KCl et NaCl n'ont qu'un faible effet

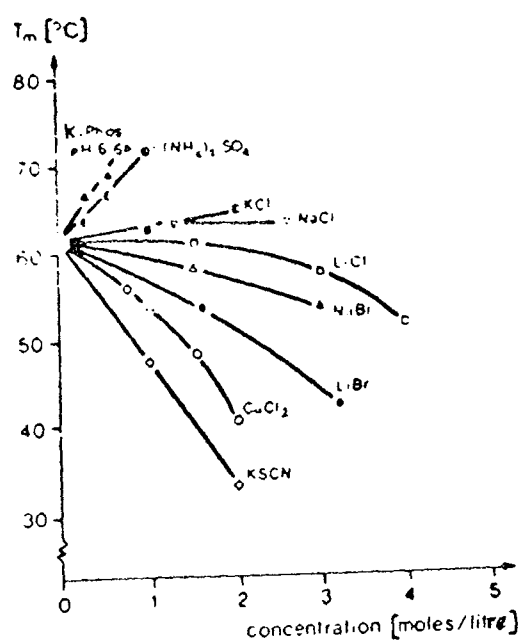


Figure n° 5: Température de transition (T_m) (température à laquelle la moitié des molécules protéiques sont dénaturées) de la ribonucléase en fonction de la concentration de différents sels à pH 7,0 (VON HIPPEL et WONG (212)).

sur les protéines, KCN et CaCl_2 sont des dénaturants très puissants des protéines (212).

Le mécanisme par lequel les ions exercent leur effet sur la conformation des macromolécules est souvent lié à leur pouvoir de solvation. Les agents favorisant le "salting-in" des groupements peptidiques ont un effet dénaturant, alors que ceux favorisant le "salting-out" ont un effet stabilisateur (74, 212). Arakawa et Timasheff (6) ont montré que les ions ayant un effet dénaturant possèdent un paramètre d'interaction préférentiel positif c'est à dire une affinité très grande pour les protéines pouvant être à l'origine de leur effet dénaturant et de "salting-in".

- solvants et solutés organiques

Le mécanisme de dénaturation de ces composés est complexe et mal défini. Plusieurs modèles d'action ont été proposé par différents auteurs.

Des composés organiques comme l'urée et le chlorure de guanidine sont des dénaturants très puissants, souvent utilisés dans les études de dénaturation-renaturation des protéines. Ces composés agissent en formant des liaisons hydrogène à l'intérieur de la molécule protéique et en détruisant l'ordre tridimensionnel des liaisons hydrogène caractéristiques de l'eau à température ordinaire.(74, 158).

D'autres solvants organiques comme le méthanol, le 2-chloroéthanol ou le dioxanne peuvent eux aussi induire une dénaturation des protéines. Ils agissent en modifiant la constante diélectrique du milieu et, par conséquent, les forces électrostatiques qui contribuent à la stabilité des protéines (74).

La surface protéique comporte des régions polaires et des régions apolaires. Les solvants organiques peuvent donc pénétrer dans ces régions hydrophobes et rompre ainsi les interactions hydrophobes conduisant à la dénaturation de la protéine (4, 74).

A faible température et en fonction de leur concentration, les solvants organiques peuvent avoir un effet stabilisateur. Deux processus sont en compétition : d'une part les composés hydrophobes provoquent une diminution de la structure tertiaire

en agissant sur les groupements apolaires des protéines ; d'autre part ces composés favorisent certaines formes secondaires caractérisées essentiellement par des liaisons hydrogène.(4, 74).

- Dénaturants biologiques

Les enzymes, de par leur nature peptidique, sont accessibles aux protéases. La vitesse de dégradation des protéines est liée à la conformation, à la taille, à la charge et aux propriétés structurales telles que la constitution en acides aminés hydrophobes de surface et le nombre de liaisons disulfure (183). Les protéines acides sont dégradées plus vite que les protéines basiques ou neutres. Les protéines de grande taille sont plus accessibles aux protéases que les protéines de faible taille.

En général, la dégradation protéolytique est précédée d'un déploiement de la protéine. Les domaines les plus structurés sont plus résistants grâce à l'inaccessibilité mécanique des liaisons péptidiques (204).

Notre travail étant orienté plus spécifiquement sur un contrôle en enzymologie erythrocytaire, nous étudions dans le chapitre suivant les méthodes de stabilisation des protéines et plus particulièrement celle des enzymes.

2.3. STABILISATION DES ENZYMES

La dénaturation des enzymes se traduit le plus souvent par la perte de leur activité catalytique.

Pour augmenter leur stabilité et éviter leur dénaturation plusieurs procédés ont été décrits. Ils consistent en:

- la recherche d'enzymes intrinséquement stables
- l'apport de composés stabilisateurs
- la congélation en présence ou non de cryoprotecteurs
- la lyophilisation en présence de lyoprotecteurs
- la modification chimique des enzymes
- l'immobilisation des enzymes sur des supports solubles ou non solubles dans l'eau.

2-3-1 Emploi d'enzymes intrinséquement stables

Plusieurs microorganismes sont capables de se développer dans des milieux extrêmes de température, de pression, de pH et de fortes pressions ioniques. Dans ces milieux, ces microorganismes spécifiquement adaptés possèdent des enzymes très stables (97).

Les enzymes thermophiles comparées aux enzymes mesophiles, de même activité catalytique, montrent une composition en acides aminés et des propriétés structurales peu différentes (ex.: une réduction des structures β) mais contiennent souvent un ion métallique. Quand on augmente la température, les interactions hydrophobes augmentent contrairement aux liaisons polaires qui deviennent plus faibles; ainsi la thermostabilité est parfois liée au nombre d'acides aminés hydrophobes de la protéine (97, 183).

D'autres mécanismes ont été décrits pour expliquer ce phénomène de thermostabilité. La substitution d'un seul acide aminé ou l'addition d'une liaison de faible énergie peuvent être suffisants pour transformer une protéine mesophile. Ainsi la thermostabilité apparaît liée à plusieurs facteurs incluant le nombre de liaisons ioniques, hydrogènes, hydrophobes etc...(97, 213, 214). Elle peut s'expliquer aussi par une flexibilité structurale de la molécule protéique afin d'assurer une renaturation plus facile plutôt qu'un maintien de la structure native à haute température (183).

2-3-2 Stabilisation par les additifs:

Depuis longtemps l'apport d'additifs pour stabiliser les enzymes a été utilisé. Parmi les premiers stabilisateurs identifiés, nous retenons les substrats et les coenzymes, les polyalcools comme le saccharose, le glycérol ou les sels neutres comme le sulfate d'ammonium. Le mécanisme de stabilisation de ces composés est complexe et mal défini. Plusieurs interprétations ont été avancées incluant la nature des interactions avec la protéine, l'effet de l'additif sur l'hydratation de la protéine, sur la tension de surface, sur la constante diélectrique du milieu et sur l'ordre de structure de l'eau.

2-3-2-1- Substrats et coenzymes:

La conformation protéique au niveau des sites actifs est souvent moins stable que celle des autres régions de la protéine. En général la fixation du substrat ou d'un autre ligand augmente la stabilité conformationnelle de l'enzyme (183).

L'étude faite sur plusieurs enzymes montre que la fixation d'un ligand peut engendrer soit une stabilisation, soit une destabilisation, ou bien peut n'avoir aucun effet sur l'enzyme.

La lactate-déshydrogénase est stabilisée contre la dénaturation thermique par le NAD, le NADH, le lactate ainsi que par des effecteurs tels que le 3-acétylpyridine-NADH et le fructose diphosphate ; par contre elle est destabilisée par son substrat le pyruvate (183).

La glucose-6-phosphate déshydrogénase est stabilisée par le NADP, nécessaire à son maintien sous forme quaternaire, par contre le glucose-6-phosphate (G6P) n'a aucun effet sur cette enzyme (130).

2-3-2-2 Sels neutres:

A faible concentration ($I < 0,1$ mol/l), on n'observe pas d'effets spécifiques des ions. La solubilité des protéines et leur comportement électrochimique sont proportionnels à la force ionique (figure 6). Cet effet de "salting-in" est dû aux interactions électrostatiques entre les ions et les groupements chargés des protéines (207).

Les métaux tels que le Ca, Zn, Mn, Fe, Mo et Cu peuvent participer à diverses fonctions telles que le transport d'oxygène dans le cas de l'hémoglobine, la fonction catalytique ou le maintien de la structure tertiaire des enzymes. Dans le cas des métalloenzymes, l'effet stabilisateur est dû aux interactions spécifiques entre l'ion et l'enzyme. L' α -amylase de *Bacillus caldolyticus* est stabilisée par des ions Ca. L'élimination du Ca par des agents chélatants conduit à une diminution de la stabilité thermique de cette enzyme. (118, 183).

A forte concentration, les ions ont un effet "salting-out" résultant de plusieurs facteurs dont les interactions électrostatiques et les interactions hydrophobes (6).

Leur effet protecteur suit l'ordre de la série lyotrope d'Hofmeister:

- pour les anions: SO_4^{--} Cl^- Br^- NO_3^- ClO_4^- SCN^-

- pour les cations: $(\text{CH}_3)_4\text{N}^+$ NH_4^+ K^+ , Na^+ Mg^{++} Ca^{++} Ba^{++}

Ainsi le sulfate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ est un protecteur très puissant, souvent utilisé comme stabilisateur d'enzymes.

Les sels neutres peuvent agir sur les protéines après dénaturation: des concentrations élevées d'anions possédant un effet "salting out" (phosphate, citrate, sulfate) augmentent la stabilité de la β hydroxystéroïde deshydrogénase et facilitent la renaturation de l'enzyme préalablement dénaturée par l'urée (47).

2-3-2-3 Solvants et solutés organiques:

Le glycérol et les sucres sont couramment utilisés comme additifs pour stabiliser les enzymes. Leur mécanisme de stabilisation est encore mal défini.

La conservation des enzymes dans des solutions concentrées en polyalcools peut être due en partie à un effet bactériostatique lié à la forte pression osmotique du milieu (183).

Les différents travaux de Timascheff et col. montrent une augmentation de l'hydratation des protéines en présence des composés stabilisateurs tels que le glycérol (77, 78), les sucres (8), les acides aminés comme la glycine, l' α et β alanine, et la bétaine (7). Cet effet d'hydratation serait lié à l'augmentation de la tension de surface de la solution plus spécifiquement pour les sucres et les acides aminés (9, 65, 74, 145).

En présence de glycérol (3 mol/l), d'érythritol (3 mol/l) ou de saccharose (2 mol/l) le temps de demi-vie de l'invertase (β -fructofuranosidase E.C. 3.2.1.26) à 58°C peut être multiplié par un facteur supérieur à 10. Cet effet stabilisateur dépend de la nature de la molécule enzymatique (219).

D'autres solvants ayant un effet dénaturant à fortes concentrations peuvent avoir un effet protecteur à faibles concentrations. C'est le cas du méthanol, de l'éthanol, de l'acétone, du DMSO (Tableau III). Cet effet protecteur serait lié à une diminution de l'activité de l'eau à faible température (183).

Enzyme	Solvant	Stabilité enzymatique
Metapyrocatechase (1.13.11.2)	10% acétone 10% éthanol	Protection de l'inactivation par l'oxygène
Benzylalcool-deshydrogénase (1.1.1.1)	5-10% acétone 5-10% éthanol 20% acétone 10-20% éthanol	S ↑ (24h, 5°C) S ↑ (24h, 5°C)
Homogentisicase (1.13.11.5)	10-20% acétone	S ↓ (20-26h, 4°C)
β-Galactosidase (3.2.1.23)	5-20% méthanol éthanol 2-propanol n-propanol	T ↑ (10 min, 47°C) à 10% (et moins) d'éthanol et de propanol T ↓ (10 min, 47°C) pour les autres concentrations
Lactate deshydrogénase (1.1.1.27)	40% DMSO 10% éthanol 10% méthanol	S ↑ (9 mois, 4°C) S ↑ (36 semaines, 4°C)
Protéase E 30	5% CHCl ₃	S ↑ (4°C, 20°C)
Trypsine (3.1.21.4)	12% éthanol	R ↑ (10°C)

R = renaturation

T = stabilité à la chaleur

S = stabilité au cours du stockage

↑ = augmentation

↓ = diminution

Tableau III : Stabilisation des enzymes par les solvants (in Schmid (183)).

2-3-2-4 Les polymères:

L'utilisation des polymères et des macromolécules comme additifs est un procédé très commun pour stabiliser les enzymes. Ces composés sont variés et appartiennent à différentes classes chimiques dont des protéines, des polyalcools ainsi que des polymères synthétiques tels que la polyvinylpyrrolidone (PVP) ou le polyvinylalcool (PVA) (tableau IV). Un mécanisme d'exclusion stérique lié à la très large taille des polymères expliquerait l'effet stabilisateur de ces composés (183).

Le polyvinylalcool (PVA) et la polyvinylpyrrolidone (PVP) ont été utilisés pour stabiliser la phosphatase acide (E.C.3.1.3.2) extraite de la pomme de terre ; le temps de demi-vie de cette enzyme en présence de l'un ou l'autre de ces polymères peut être 8 à 15 fois supérieur à celui de l'enzyme libre (1).

Le polyéthylène glycol (PEG), utilisé essentiellement comme agent de précipitation au cours de la purification des protéines montre un effet protecteur pour certaines protéines (92, 147), mais peut avoir aussi l'effet inverse en diminuant la température de transition d'autres protéines (129). L'effet protecteur de ce composé dépend de la nature hydrophobe de la protéine et s'explique par deux mécanismes ayant des effets opposés ; d'une part, le PEG est un composé très hydrophobe qui, en se liant aux régions hydrophobes des protéines, induit leur destabilisation. D'autre part, du fait de sa grande taille, il exerce un effet d'exclusion stérique conduisant à une hydratation préférentielle et à la stabilisation des protéines (5, 129).

2-3-2-5- Autres protecteurs

D'autres composés protecteurs sont utilisés pour stabiliser les enzymes. L'addition à faibles concentrations de dithiothreitol, de β mércaptoéthanol est souvent utilisée pour empêcher l'inactivation des groupements sulfhydriles des protéines au cours de la purification (134).

Le glutathion réduit, la cystéine, la N-acétylcystéine ont un effet stabilisateur d'enzymes contre la dénaturation par la chaleur, le froid, les radiations ou la présence de peroxydes (160).

La vitamine E, l'acide ascorbique sont connus pour leurs effets antioxydants (183).

Enzyme	Polymère	Stabilité enzymatique
Glucose oxidase (1.1.3.4)	PVP/PVAc PVP PVP/PVA PVA	T ↑ (4 h, 50°C) T ↑ T ↓ T ↑ (4 h, 50°C)
α-Amylase (3.2.1.1)	Dextran 250 Ovalbumine	I ↓ (anticorps anti-amylase) Dil. ↑
β-Amylase (3.2.1.2)	Albumine bovine PVA Serum albumine	T ↑ (1 h, 37°C) D ↑ T ↑ (18 h, 35°C) T ↑ (48 h, 37°C)
Catalase (1.11.1.6)	Polysaccharide phosphate	S ↑ (120 min, 24°C)
Trypsine (3.4.21.4)	Dextran	pH →
α-Chymotrypsine (3.4.21.1)	gel polymetacryl	T ↑ (180 min, 60°C)
Lactate deshydrogénase (1.1.1.38)	Dextran Gelatine Serum albumine bovine	pH → S ↑ (36 sem, 4°C) Dil. ↑
Malate deshydrogénase (1.1.1.38)	Gelatine + éthanol ou glycérol	S ↑ (5 mois, 4°C)
Glucose-6-phosphate deshydrogénase (1.1.1.49)	Ficoll	T _{1/2} (6 jours, 25°C)
Aldolase (4.1.2.13)	PVP PVA Serum albumine	T ↓ (35°C) Dil. ↑

Tableau IV : Stabilisation des enzymes par les polymères (183).

PVP = polyvinylpyrrolidone

PVAc = polyvinylacétate

PVA = polyvinylalcool

PEG = polyéthylène glycol

T = stabilité à l'inactivation par la chaleur

S = stabilité au cours de la conservation

pH = stabilité aux variations de pH

D = stabilité aux dénaturants

I = stabilité aux inhibiteurs

Dil. = stabilité à la dilution

T_{1/2} = demi-vie (activité résiduelle = 50%)

↑ = augmente

→ = sans variation

↓ = diminue

Le Triton X-100 a un effet protecteur contre la dénaturation de la β -amylase par la chaleur (198). La rhodanese (Thiosulfate sulfurtransferase E.C. 2.8.1.1) peut être stabilisée par un détergent non ionique, le laurylmaltoside (201).

2-3-3- La congélation:

La congélation ou cryoconservation constitue aujourd'hui un moyen très courant de conservation des produits biologiques et alimentaires ; son application dans le domaine médical est très développée.

Néanmoins, plusieurs protéines sont dénaturées au cours de la congélation (143). En effet lorsqu'on diminue la température, les interactions hydrophobes dans une protéine diminuent tandis que les interactions polaires (liaisons hydrogènes, intercharges...) deviennent plus importantes. En fonction de leur structure, les protéines peuvent subir des changements de conformation plus ou moins importants (70). D'autre part, la formation de cristaux au cours de la congélation peut conduire à une déshydratation des protéines; les sels minéraux et les substances organiques solubles deviennent plus concentrés dans la phase liquide. Ainsi l'augmentation de la concentration des solutés, les changements de pH, de force ionique qui l'accompagnent, peuvent affecter la structure des protéines. (143).

L'emploi de cryoprotecteurs est souvent indispensable. Ces composés appartiennent à plusieurs classes chimiques : des sucres, des acides aminés, des polyalcools etc... . Le mécanisme de cryoprotection de ces composés est encore mal défini. Il peut s'agir soit d'un effet direct : ces composés agissent par association avec les protéines à l'aide de liaisons hydrogènes ou de liaisons ioniques, soit d'un effet indirect : ces composés agissent sur la structure de l'eau, empêchant la formation des cristaux de glace et diminuant ainsi le point de congélation de l'eau (143).

L'effet cryoprotecteur du glutamate de sodium, comme l'explique Matsumoto (143), s'effectue de la manière suivante: les molécules de glutamate de sodium, à l'état ionisé, sont associées à la surface de la molécule protéique. Elles conduisent alors à une augmentation de la charge nette et ainsi à l'augmentation de

l'hydratation de la protéine. Ce facteur agirait en réduisant la transconformation et l'agrégation des molécules protéiques induites par l'élimination d'eau résultant de la congélation.

Les solvants organiques, comme le glycérol, le diméthyl sulfoxyde (DMSO), l'éthylène glycol, le diméthyl formamide (DMF) sont parmi les cryoprotecteurs les plus utilisés; ils ont la propriété de diminuer le point de congélation de l'eau (70).

La phosphofructokinase (E.C. 2.7.1.11) purifiée du muscle squelettique du lapin est totalement inactivée après congélation pendant 30 secondes dans l'azote liquide. Son activité enzymatique peut être réstaurée à 70% par addition avant la congélation de cryoprotecteurs tels que le tréhalose (0,5 mol/l), le saccharose (0,5 mol/l) ou la proline (0,5 mol/l), à 50% par addition de 50 mmol/l de triméthylamine-N-oxide (TMAO). L'effet cryoprotecteur de ces composés peut encore être augmenté par la présence de certains ions métalliques comme le Zn, Cu, Cd, Ni et le Co (46).

2-3-4- La lyophilisation:

La conservation des produits biologiques sous forme liquide ou congelée, souvent instables à température ambiante, pose des problèmes de stockage et de transport. De ce fait les solutions lyophilisées sont d'un grand intérêt.

La lyophilisation ou cryodessiccation peut être définie comme l'opération consistant à sécher une solution ou un corps imbibé d'eau maintenu à une température suffisamment basse pour que la plus grande partie de l'eau qu'ils contiennent soit congelée. L'extraction de cette eau se fait par sublimation de la glace.

La lyophilisation est utilisée pour la conservation de divers substances: protéines, microorganismes, produits pharmaceutiques... Cette méthode comporte deux étapes principales, la congélation et la dessiccation. Etant donné l'importance de l'eau dans le maintien de la structure des protéines, ces deux processus peuvent conduire à une alteration de la conformation des protéines.

Des composés protecteurs sont souvent additionnés aux solutions enzymatiques, et aux solutions protéiques en général, avant la lyophilisation. Ces composés appartiennent à plusieurs

classes chimiques. Ce sont des polymères, des polyalcools, des acides aminés... . La plupart de ces composés ont un effet cryoprotecteur. Ainsi, la phosphofructokinase est totalement inactivée après lyophilisation et reconstitution ; par contre l'addition de tréhalose ou de maltose à l'enzyme avant la lyophilisation conduit à la restitution de 80% de son activité de départ (45).

A titre d'exemple, la lyophilisation de l'hémoglobine réalisée sans précaution conduit à la formation d'une forte proportion de méthémoglobine. Pour empêcher la formation de celle-ci, différents procédés sont utilisés incluant la desoxygénation et/ou l'addition de composés protecteurs. Labrude et col. ont essayé plusieurs composés appartenant à différentes classes chimiques: des sucres et leurs dérivés, des polyalcools, des polymères de synthèse, des polypeptides... . Ces composés ont un effet lyoprotecteur vis à vis de l'hémoglobine (49, 69, 121, 122, 124, 125, 126).

L'effet protecteur de ces composés peut être dû soit aux propriétés physiques des molécules actives et aux modifications qu'elles apportent à celles du milieu à lyophiliser, soit aux "interactions" entre l'hémoglobine et les composés protecteurs (122).

Cet effet protecteur peut être aussi lié à l'état d'hydratation de la protéine. En effet après deshydratation, la couche d'eau périphérique de l'hémoglobine peut être perturbée, ce qui peut affecter l'hème (123).

Les composés protecteurs comme les sucres et les acides aminés augmentent l'état d'hydratation des protéines en solution liquide (7, 8) ; Labrude explique l'effet lyoprotecteur de ces composés par un renforcement de la couche d'hydratation autour de la conformation native de la protéine lorsqu'elle est en solution lyophilisée (123).

2-3-5- Modification chimique des enzymes :

La modification chimique des enzymes a été longuement étudiée. En effet elle a été utilisée soit pour déterminer la composition en acides aminés intervenant dans la catalyse enzymatique (108), soit pour augmenter la solubilité ou la stabilité des enzymes.

Une revue de la littérature montre que la modification chimique peut conduire soit à la stabilisation, soit à la destabilisation, ou n'avoir aucun effet sur les enzymes. Plusieurs procédés chimiques ont été décrits faisant intervenir les groupements NH_2 ou les groupements COOH des protéines (183).

Du fait de l'importance des liaisons de faibles energie dans la structure tertiaire des enzymes, la fixation de certains groupements chimiques sur les chaînes laterales peut avoir pour effet de créer de nouvelles liaisons hydrogène, hydrophobes ou des liaisons électrostatiques.

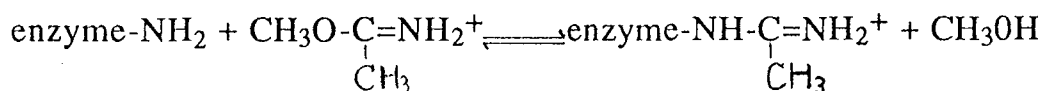
Ainsi la glycogène phosphorylase b modifiée par alkylation avec des aldéhydes aliphatiques, devient plus résistante à l'inactivation par la chaleur ou par le froid (187). Cette augmentation de la stabilité a été attribuée à une augmentation des liaisons hydrophobes due aux groupements introduits.

L'alkylation des groupements amines de l' α chymotrypsine par l'acide glyoxylique en présence de cyanoborohydrate de sodium augmente la stabilité de l'enzyme à la dénaturation par la chaleur. Cette stabilisation serait due à une augmentation de la surface hydrophile autour de la protéine grâce aux groupements $-\text{NHCH}_2\text{COOH}$ plus hydrophiles que les groupements $-\text{NH}_2$ (146).

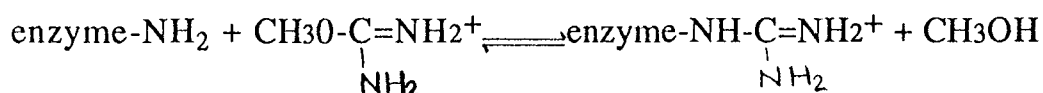
La modification chimique des groupements NH_2 à l'aide de réactifs tels que le diméthyladipimide, l'éthylacétimide ou le cyanate de sodium augmente la stabilité de la LDH à l'inactivation par le froid ; par contre, l'acétylation, l'acétoacétylation ou la succinylation inactivent totalement l'enzyme (185).

Les liaisons salines ont un rôle important dans le maintien de la conformation des protéines. Ces liaisons sont formées entre l'Asp, le Glu chargés négativement et l'His, la Lys et l'Arg chargés positivement. Les liaisons salines formées avec l'Arg sont plus stables que celles formées avec l'His ou la Lys. Ceci est dû au fait que les pK de l'His et de la Lys sont plus faibles que celui de l'Arg. Pour augmenter la stabilisation des enzymes, Klivanov propose de remplacer la Lys (ou l'His) par l'Arg ou d'utiliser des procédés chimiques conduisant à un résultat semblable (117) ; c'est le cas de l'amidination et de la guanidination :

1) Amidination (avec le méthylacétimide)



2) Guanidination (avec le O-méthylisourée)



2-3-6 - Immobilisation des enzymes

La dénaturation d'une enzyme est souvent le résultat d'un changement de conformation, d'une agrégation en oligomères de plus haut poids moléculaire ou d'une dissociation en sous-unités inactives. La fixation de l'enzyme sur un support à l'aide de différentes liaisons (ou immobilisation) augmenterait la rigidité de la conformation de la protéine et conduirait ainsi à sa stabilisation.

Cinq méthodes sont utilisées pour l'immobilisation des enzymes (117, 183) :

1) La première consiste à fixer les enzymes par des liaisons covalentes à un support soluble ou non soluble dans l'eau. Les enzymes sont liées à des supports tels que les polysaccharides, les dextrans de différents poids moléculaires, le DEAE-Dextran, le DEAE-Séphadex ; ces polymères sont activés à l'aide de différents réactifs chimiques dont l'azide et le CNBr.

2) La deuxième méthode fait intervenir la réticulation à l'aide d'agents bifonctionnels produisant des polymères solubles ou non dans l'eau. La conformation de l'enzyme peut être renforcée à l'aide de liaisons intra ou intermoléculaires. Plusieurs réactifs sont utilisés pour la réticulation artificielle des molécules enzymatiques. Le glutaraldéhyde et les diimidoesters sont les plus connus. La réaction dépend de la concentration des réactifs, du pH, de la température et du temps de la réaction.

3) La troisième méthode consiste à adsorber des molécules enzymatiques à la surface de supports inertes (verre, alumine, cellulose, résine, charbon etc...). L'interaction de l'enzyme avec le

support pourra impliquer, de manière plus ou moins complexe, l'une ou l'autre des liaisons de faible énergie (interactions de Van der Waals, interactions hydrophobes, liaisons hydrogène et liaisons ioniques). Cette fixation a l'avantage de n'altérer que peu ou pas l'activité enzymatique, mais des variations de concentrations en substrats, de pH ou de force ionique peuvent provoquer une désorption très rapide de l'enzyme.

4) La quatrième méthode est l'immobilisation des enzymes par inclusion dans des gels polymères. Cette méthode consiste à retenir une enzyme prisonnière à l'intérieur du réseau tridimensionnel d'une matrice. La maille de cette matrice assure de manière purement physique la rétention de la molécule d'enzyme. Un très grand nombre de réactions de polymérisation ont été proposées pour inclure les enzymes. On peut citer les gels de polyacrylamides, qui sont les plus employés. Cette méthode fait appel à l'acrylamide comme monomère de départ qui est polymérisé en présence d'un agent de réticulation, le N, N'-méthylène bis acrylamide.

5) La cinquième méthode réside dans l'encapsulation dans des microcapsules ou dans des fibres: Cette technique consiste à entourer les enzymes par différentes sortes de membranes semi-perméables. Les substrats et les produits de l'enzyme peuvent passer librement par dialyse au travers de cette membrane. L'inclusion est souvent réalisée à partir d'une émulsion de l'enzyme en solution aqueuse dans une solution organique contenant le polymère (nitrate de cellulose par exemple).

2-3-7- Effets des méthodes de stabilisation sur les propriétés catalytiques des enzymes

Les différentes méthodes de stabilisation que nous avons décrit ont des effets variables sur les propriétés structurales et sur la stabilité d'une enzyme. Leur influence sur les propriétés catalytiques serait liée aux modifications des propriétés structurales de l'enzyme, notamment au niveau du site actif, et aux modifications des propriétés du milieu (pH, force ionique, viscosité...).

2-3-7-1 Influence des additifs

Si plusieurs composés protecteurs des protéines ont été identifiés, le mécanisme de stabilisation de ces composés et leurs effets sur les paramètres cinétiques des enzymes, sont encore mal définis.

L'influence du glycérol sur l'activité de nombreuses hydrolases et oxydoréductases a été étudiée par l'équipe de Myers en 1973 (156), mais aucune interprétation simple des variations de la constante de Michaelis (K_m) et de la constante catalytique (k_{cat}) par rapport à celles trouvées dans l'eau ne peut être dégagée (Tableau V). La K_m de la β -galactosidase en présence de 30% de glycérol est augmentée 270 fois alors qu'elle diminuée de 6 fois pour l'aldolase. Malgré deux exceptions, (la trypsine et la phosphodiesterase) la k_{cat} décroît nettement en présence du glycérol. Pour de nombreuses enzymes, la présence de ce polyalcool conduit à une diminution de la k_{cat} et à aucune modification ou à une augmentation de la valeur de la K_m , ce qui suggère que le glycérol se comporte comme un inhibiteur de la réaction enzymatique (156).

La présence de sorbitol ou de DMSO engendre des variations des propriétés catalytiques des enzymes. L'affinité de l'alcool deshydrogénase vis à vis des substrats tels que: éthanol, propanol, butanol et pentanol et vis à vis de son coenzyme, le NAD, augmente au fur et à mesure que la concentration du sorbitol augmente (217). Son effet sur la vitesse maximale (V_m) est variable ; le sorbitol 2,5 mol/l engendre une diminution de V_m de l'enzyme avec l'éthanol et le propanol comme substrats, et une augmentation du V_m en présence du butanol et du propanol (217). Ces changements de constantes catalytiques en présence de sorbitol sont expliqués d'une part par une conformation de l'enzyme plus accessible au substrat et d'autre part par les contraintes de diffusion dues au sorbitol.

L'apport de DMSO et du glycérol modifie l'activité catalytique de la carbamoylphosphate synthétase (E.C. 2.7.2.9). La K_m vis à vis de l'ATP Mg et du bicarbonate diminue au fur et à mesure que la concentration du DMSO ou du glycérol augmente,

ENZYME	SUBSTRAT ^a	eau		eau + glycerol	
		Km(mmol/l)	kcat ^b	Km (mmol/l)	kcat ^b
Alcool deshydrogénase	DPN	0,23	49000	0,063	8000
Alcool deshydrogénase	Ethanol	11	37000	2,8	13000
Aldolase ^c	FDP	0,62	750 ^d	0,098	160 ^d
Phosphatase alcaline	NPP	0,028	2400	0,12	640
α -Chymotrypsine	ATEE	1,4	3700	1,6	1400
Diaphorase	DPNH	0,018	730	0,016	150
β -Galactosidase	ONPG	0,25	17000	67	3800
Glucose-6-P deshydrogénase	G-6-P	0,013	1900	0,014	980
Glutamate deshydrogénase	L-Glutamate	1,9	250	0,44	75
Glyceraldéhyde-3-P-deshydrogénase	PGAL	0,17	3500	0,20	1100
Glyoxylate réductase	Glyoxylate	24	67 ^e	26	13 ^e
Hydroxypyruvate réductase ^f	HP	19	1500	36	320
Nucléase micrococcale	NPpdTp	0,023	4,2	0,019	1,8
Phosphodiesterase I	bis NPP	0,49	0,042 ^e	3,3	0,14 ^e
Sorbitol deshydrogénase	Fructose	300	1000 ^e	1430	430 ^e
Trypsine ^g	BAA	1,8	3,5	8,0	16
Xantine oxydase	Benzaldehyde	0,50	1000	0,67	780

^a Les abréviations suivantes sont utilisées : FDP, fructose 1-6 diphosphate ; NPP, p-nitrophényl phosphate ; ATEE, N-acétyltyrosine éthyl ester ; ONPG, o-nitrophenyl- β -galactoside ; G-6-P, glucose-6-phosphate ; PGAL, glyceraldéhyde-3-phosphate ; HP, hydroxypyruvate ; NPpdTp, déoxythymidine-5'-p-nitrophényl-phosphate-3'-phosphate ; bis NPP, bis (p-nitrophényl)phosphate ; BAA, benzoyl-L-arginine amide.

^b exprimé en μ moles de produit formé par minute et par μ mole de protéines.

^c essai réalisé dans une solution tampon 0,05 mol/l de 3,6-endométhylène-1,2,3,6-tétrahydrophthalate, pH 6,6.

^d exprimé en variation de densité optique par minute et par μ mole de protéine.

^e exprimé en μ moles de produit formé par minute et par mg de protéine.

^f essai réalisé à pH 6,6.

^g essai réalisé dans une solution 0,05 mol/l de tris-HCl à pH 7,6.

tableau V: Effet du glycerol 30% sur les constantes cinétiques des enzymes (156)

alors que la variation de la V_m est biphasique. Elle augmente dans un premier temps puis diminue pour des concentrations croissantes du solvant (95).

L'effet d'un solvant sur les constantes cinétiques d'une enzyme est parfois lié aux types d'interactions entre l'enzyme et le substrat ; c'est ainsi que Maurel observe une importante variation du K_m apparent lorsque le complexe enzyme-substrat fait intervenir des interactions hydrophobes. Les interactions électrostatiques entre l'enzyme et le substrat sont in affectées par la variation de la constante diélectrique du milieu (144).

En général, l'effet d'un solvant organique sur les constantes cinétiques d'une enzyme se traduit par un changement de K_m tandis que la k_{cat} est moins affectée. La variation du K_m apparent n'est pas relié à la variation de la constante diélectrique, même pour les enzymes dont les liaisons enzyme-substrat sont essentiellement électrostatiques (144). Ceci est expliqué par le fait que la variation de la constante diélectrique au niveau du site actif est différente de celle observée à l'échelle macroscopique.

Les constantes catalytiques de l' α -chymotrypsine (E.C. 3.4.4.5) et de la laccase (p-diphénol oxydase E.C. 1.10.3.2) restent stables pour des concentrations croissantes de glycérol, des formamides et d'alcools aliphatiques jusqu'à une concentration critique où l'on observe une diminution brutale de l'activité enzymatique résultant d'un changement de conformation de l'enzyme (dénaturation) (155).

2-3-7-2 Effet des modifications chimiques et de l'immobilisation:

La modification chimique des enzymes par l'introduction de groupements sur la surface protéique peut conduire à une modification de l'environnement au niveau du site actif de l'enzyme affectant ainsi les propriétés catalytiques (108).

Au cours de l'immobilisation d'une enzyme par des liaisons covalentes ou par adsorption, un certain nombre de liaisons vont s'établir entre les groupements fonctionnels de la

molécule enzymatique et ceux du support. Cette interaction se traduira par une distorsion de la structure tridimensionnelle à un degré variable suivant le nombre et la nature des liaisons enzyme-support ainsi que par des phénomènes d'encombrements stériques limitant l'accessibilité du site catalytique au substrat. A la suite des interactions entre les ligands (substrats, produits, protons) et les groupements réactifs du support, il se produit un phénomène de partage qui se traduit par l'apparition de différences notables de concentrations du ligand entre le microenvironnement de l'enzyme immobilisée et le macroenvironnement. L'effet de partage peut affecter de façon plus ou moins importante les constantes catalytiques de l'enzyme tels que le pH optimum, la K_m (117).

3 ENZYMES ERYTHROCYTAIRES :

La fonction du globule rouge est essentiellement le transport des gaz du sang (O_2 , CO_2) au cours des échanges respiratoires entre les tissus et le milieu ambiant. L'élément primordial dans ce processus est constitué par l'hémoglobine. Pour remplir ce rôle, le globule rouge a besoin d'un métabolisme énergétique actif, cependant il possède une structure particulière: absence de noyau, de ribosomes et de mitochondries. Ces inclusions ont été éliminées au cours de la maturation de la cellule. L'énergie nécessaire à sa survie et au maintien de ses fonctions provient uniquement de la seule dégradation anaérobie du glucose et de quelques dérivés glucidiques. Cette énergie est utilisée pour maintenir l'équilibre ionique intracellulaire, permettre la protection de l'hémoglobine, maintenir le potentiel réducteur cellulaire et la forme biconcave de l'hématie.

Le métabolisme énergétique est assuré par la voie glycolytique anaérobie (ou d'Embden-Meyerhof) et le cycle des pentoses (ou shunt d'Horecker et Dickens).

La glycolyse anaérobie, succession de 12 étapes enzymatiques échelonnées entre le glucose et le lactate, est le catabolisme producteur d'énergie par excellence de l'érythrocyte.

Plusieurs déficits enzymatiques ont été répertoriés ; ces anomalies intéressent pour la plupart les deux grandes voies métaboliques. Elles se manifestent le plus souvent par une hyperhémolyse, permanente ou déclenchée par la prise de substances toxiques ou médicamenteuses. Parmi ces érythroenzymopathies, les déficits en G6PD et PK sont les plus fréquents.

3 - 1 - GLUCOSE-6-PHOSPHATE DESHYDROGENASE (E.C.: 1.1.1.49)

Le déficit en G6PD est l'enzymopathie érythrocytaire de loin la plus répandue dans le monde. Elle présente plusieurs aspects cliniques. Le plus fréquemment rencontré est celui d'accidents

hémolytiques brutaux déclenchés par l'absorption de certains médicaments (14).

La G6PD catalyse la transformation du glucose-6-phosphate en 6-phosphogluconolactone. Cette réaction permet la régénération du NADPH utilisé dans plusieurs types de biosynthèse ainsi que par la glutathion réductase NADPH-dépendante afin de maintenir une concentration constante de glutathion réduit. Des études ont montré que les érythrocytes déficitaires en G6PD ont un taux diminué de glutathion réduit GSH et que ce taux s'effondre lors d'une agression oxydative (14, 19).

Dans les cellules normales intactes la plus grande partie du NADP est sous forme réduite (NADPH) ; la G6PD n'est fonctionnelle qu'à 2% de sa capacité théorique (18, 220). En fait les concentrations en substrat (G6P) et en coenzyme (NADP) sont très faibles, l'enzyme est inhibée par le NADPH et par l'ATP, le NADP est utilisé en partie par d'autres enzymes. Une agression oxydative va conduire à l'oxydation du NADPH. Elle s'accompagne simultanément de la levée de l'inhibition de l'enzyme, de l'augmentation de la concentration en NADP, ce qui se traduit par une augmentation de l'activité catalytique de la G6PD. La cellule normale répond ainsi à l'attaque oxydative par une augmentation de ses capacités réductrices et de ses réserves en NADPH. Une très faible activité catalytique de la G6PD n'a qu'un faible retentissement clinique dans les conditions ordinaires mais peut devenir dramatique dans le cas d'un stress oxydatif.

L'hémolyse induite par les médicaments chez les sujets déficients est généralement accompagnée de la formation de corps de Heinz dans les globules rouges. Ces structures sont constituées d'un mélange de protéines de stroma et d'hémoglobine dénaturée. Il semble que les groupements sulfhydriles (SH) de ces protéines aient été oxydés, ce qui aurait provoqué leur dénaturation. Cette oxydation peut être produite soit directement par les radicaux libres provenant des substances chimiques médicamenteuses, soit par l'intermédiaire du

glutathion réduit (GSH) qui s'oxyde en GSSG perdant ainsi son pouvoir protecteur des groupements SH (14).

Chez les déficitaires en G6PD, l'enzyme est incapable de fournir suffisamment de NADPH pour réduire le GSSG en GSH par la voie de la glutathion-réductase. Il en résulte une oxydation des groupements SH des protéines, en particulier de l'hémoglobine, et ainsi la formation d'un complexe disulfure mixte entraînant une précipitation sous forme de corps de Heinz (14).

3.1.1 - STRUCTURE

3.1.1.1 - Structure primaire

L'analyse des acides aminés de la G6PD de différentes origines montre une grande variation dans la structure primaire de ces enzymes. La G6PD érythrocytaire humaine ne contient pas de ponts disulfures. Ce n'est pas une métalloenzyme. Elle ne contient pas de composés non amino-acides mis à part le NADP⁺ fortement lié à l'enzyme (130).

Selon Yoshida, la chaîne polypeptidique comprend 500 résidus amino-acides. L'acide aminé N terminal est l'acide pyroglutamique, l'acide aminé C-terminal étant la glycine (222).

Depuis quelques années, la séquence complète du gene codant pour la G6PD a été établie (164), ce qui permet l'étude des variantes au niveau moléculaire et donc aide à la compréhension de leurs différences (Tableau VI) (20). Le gene compte 13 exons et code pour une protéine de 515 acides aminés. Takizawa et col. ont obtenu la structure primaire complète à partir de la protéine purifiée ; les 479 acides aminés de la région C-terminale sont identiques à la séquence d'acides aminés déduite à partir de l'ADNc tandis que les 52 acides aminés restants ne sont pas représentés dans l'ADNc cloné (199). Des études complémentaires montrent que cette région N-terminale est probablement codée par un gene autosomale situé sur le chromosome 6 (21).

variantes	Position des bases										Designation proposée	
	172	202	376	466	663	844	968	1003	1166	1311		1339
A			A → G									G6PD A ^{376G}
A-		G → A	A → G									G6PD A- ^{302A/376G}
A-			A → G				T → C					G6PD A- ^{376G/1003C}
Matera		G → A	A → G									G6PD Matera ^{302A/376G}
Betica		G → A	A → G									G6PD Betica ^{302A/376G}
Betica			A → G				T → C					G6PD Betica ^{376G/1003C}
Metaponto	G → A											G6PD Metaponto ^{172A}
Rocha				G → A								G6PD Rocha ^{466A}
Chatham								G → A				G6PD Chatham ^{1003A}
Seattle-like						G → C						G6PD Seattle-like ^{844C}
Mediterranean					C → T							G6PD Mediterranean ^{663T}
Sassari					C → T					C → T		G6PD Sassari ^{663T/1311T}
Cagliari					C → T					C → T		G6PD Cagliari ^{663T/1311T}
Santiago de Cuba											G → A	G6PD Santiago de Cuba ^{1339A}
Iowa									A → G			G6PD Iowa ^{1166G}
Springfield									A → G			G6PD Springfield ^{1166G}
Original amino acid	Asp	Val	Asn	Glu	Ser	Asp	Leu	Ala	Lys	Tyr	Gly	
Substitution	Asn	Met	Asp	Lys	Phe	His	Pro	Thr	Glu	Tyr	Arg	

Tableau VI : Mutations associées aux variantes de la G6PD (20).

3.1.1.2 - Structure quaternaire

La G6PD a été étudiée dans de nombreux organismes et à partir de tissus variés : levures, bactéries, champignons, érythrocytes... (130).

Elle se présente dans l'érythrocyte sous deux formes polymères correspondant l'une à un tétramère, l'autre à un dimère. L'équilibre entre les deux formes est étroitement lié au pH et à la force ionique du solvant. Pour plusieurs auteurs, les sous-unités de l'enzyme érythrocytaire ont une composition identique en acides aminés. Le poids moléculaire d'une sous-unité est d'environ 59 000 D (189).

La dissociation en dimères est favorisée par un pH alcalin et une force ionique élevée. Pour une valeur constante de force ionique, à pH inférieur à 7,2 l'enzyme est sous forme tétramérique prédominante ; à pH supérieur à 7,2, elle est principalement sous forme dimérique (55).

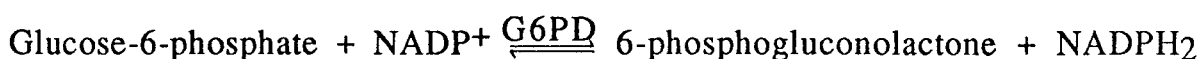
La stabilité des interactions entre les dimères d'un tétramère de la G6PD érythrocytaire implique des liaisons ioniques alors que les interactions entre les sous-unités d'un dimère sont stabilisées par des liaisons hydrophobes (55).

On connaît depuis longtemps le rôle stabilisant du NADP⁺. Sa séparation de l'enzyme conduit à la dissociation en monomères de l'enzyme et ainsi à son inactivation (55).

Bonsignore et col. ont observé que le NADP⁺ lié à l'enzyme est échangeable avec le NADP⁺ en solution, mais sa réduction en NADPH conduit à une dissociation de l'enzyme en monomères (in 130).

3.1.2 - PROPRIETES CATALYTIQUES

La G6PD érythrocytaire est une enzyme active sous ses formes dimériques et tétramériques.

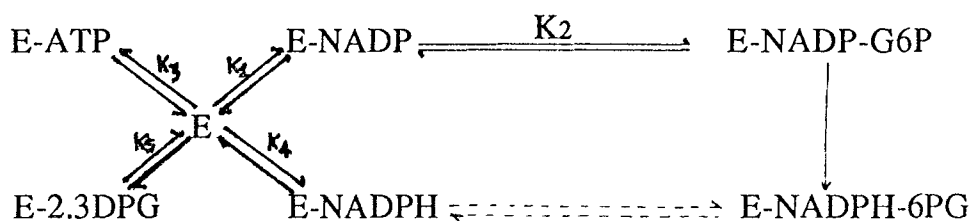


Le D-glucose-6-phosphate est le substrat naturel de l'enzyme. Il donne la V_m la plus élevée et la K_m la plus faible.

La G6PD érythrocytaire peut oxyder certains analogues du substrat : glucose, glucose-6-sulfate, galactose-6-phosphate, 2-desoxyglucose-6-phosphate (130).

Selon l'origine de l'enzyme l'affinité vis à vis du coenzyme est variable. La G6PD érythrocytaire humaine peut utiliser le NAD^+ ou le $NADP^+$ mais elle a plus d'affinité pour ce dernier.

L'étude des propriétés catalytiques de l'enzyme a été réalisée *in vivo* comme *in vitro*. Le modèle cinétique de cette enzyme *in vivo* est défini comme suit :



$$v = \frac{V_{\max} \times \frac{NADP^+}{K_1} \times \frac{G6P}{K_2}}{1 + \frac{NADP^+}{K_1} + \frac{G6P}{K_2} + \frac{ATP}{K_3} + \frac{NADPH}{K_4} + \frac{2.3 DPG}{K_5}}$$

L'enzyme agit selon un mécanisme ordonné (BiBi) avec le $NADP^+$ comme premier substrat. Le $NADPH$, l' ATP et le 2-3 DPG sont des inhibiteurs compétitifs vis-à-vis du $NADP^+$ (34).

A une forte concentration en glucose-6-phosphate (1 mmol/l) correspond une très faible activité de l'enzyme ; ceci est dû à une inhibition par excès du substrat (34).

In vitro, les études de l'activité de l'enzyme érythrocytaire sont faites soit à partir de préparations purifiées ou semi-purifiées, soit à partir d'hémolysats. La K_m vis-à-vis du G6P varie beaucoup d'un laboratoire à l'autre, elle est comprise entre 50 et 78 $\mu\text{mol/l}$ pour Kirkman et col., Betke et col ; entre 37 et 42 $\mu\text{mol/l}$ pour Boivin et col ; elle est de 39 $\mu\text{mol/l}$ pour Yoshida. La K_m vis-à-vis du $NADP^+$ est généralement comprise entre 2,9 et 4,4 $\mu\text{mol/l}$ (in 27).

La G6PD érythrocytaire humaine est fortement influencée par la force ionique et le pH. La courbe d'activité en fonction du pH est étalée entre le pH 7 et le pH 9,5 avec un maximum voisin de 8,5 (27).

3.1.3 - VARIANTES

La G6PD humaine est caractérisée par un large polymorphisme. Les études de cette enzyme montrent des différences significatives entre les propriétés cinétiques des enzymes de différentes populations. Les résultats de ces mesures dépendent des méthodes utilisées et diffèrent d'un laboratoire à l'autre. Aussi la commission de nomenclature de l'OMS a-t-elle recommandé en 1967 l'utilisation de techniques standardisées pour la caractérisation biochimique de l'enzyme. Les critères utilisés pour différencier les variantes sont les suivants : la mobilité électrophorétique, la stabilité thermique, les propriétés cinétiques (substrat et analogues du substrat, pH...) (14). Depuis, plus de 300 variantes ont été caractérisées et portent des designations géographiques.

La G6PD "normale" est celle qui est la plus répandue dans l'ensemble des populations étudiées. On la désigne sous le terme de type B ou Gd(+) B et ses propriétés constituent la G6PD de référence.

Les variantes peuvent être classées en 5 classes selon leur activité enzymatique et leur retentissement clinique (221).

- La classe 1 comprend les variantes de très faible activité (inférieure à 10 % de celle de la G6PD normale). Elles sont associées à une hémolyse chronique.
- Les variantes de la classe 2, bien qu'ayant également une activité très faible (inférieure à 10 % de celle de la G6PD normale), ne sont pas associées à une hémolyse chronique, l'hémolyse ne survenant que dans des circonstances particulières.
- L'activité enzymatique des variantes de la classe 3 est comprise entre 10 et 60 % de l'activité de la G6PD normale. Les hémolyses

symptomatiques surviennent surtout en cas de prise de médicaments particuliers ou d'infections.

- Les variantes de la classe 4 résultent de mutations qui ne modifient pas l'activité enzymatique. Celles de la classe 5 ont une activité enzymatique augmentée. Ces deux types de variantes n'entraînent aucun retentissement clinique.

Le séquençage de la G6PD a ouvert de nouvelles perspectives dans l'étude génétique de cette enzyme. Persico et col. ont rapporté la séquence complète de l'ADNc et ainsi les variations biochimiques des différentes variantes ont pu être élucidées (20, 21).

G6PD A ou Gd(+) A: A côté de la G6PD B, cette variante est la plus répandue dans le monde ; rencontrée chez des sujets normaux, elle est présente chez 30% des Noirs d'Afrique. Sa mobilité électrophorétique, plus rapide que celle de Gd(+) B, est la conséquence de la substitution d'un acide aminé, une asparagine par un acide aspartique. Au niveau de l'ADNc cette substitution correspond au remplacement A→G au niveau du nucléotide 376.

G6PD A- ou Gd(-)A: Plus répandue dans les populations noires d'Afrique, cette variante présente une mobilité électrophorétique rapide. Son activité enzymatique est de 5 à 15% seulement de l'activité normale. Sa relation avec la G6PD A n'a été élucidée qu'après séquençage de l'ADNc. L'ADN de la plupart des personnes Gd(-)A possèdent au moins deux substitutions nucléotidiques ; l'une correspond à celle observée dans la variante Gd(+)A, l'autre correspond à la substitution G→A au niveau du nucléotide 202 provoquant le remplacement d'une valine par une méthionine. Dans certains cas de Gd(-)A, la deuxième mutation est identifiée, non pas au niveau du nucléotide 202, mais au niveau du nucléotide 968 (T→C). Cette variante a été considérée depuis longtemps comme homogène et limitée aux populations noires. Mais l'étude au niveau moléculaire montre qu'elle s'est étendue à d'autres populations : en Espagne (variante Betica), en Italie (variante Matera) ainsi que dans d'autres pays européens et au Mexique.(20).

G6PD méditerranéenne ou Gd(-)medit.: Cette variante est retrouvée surtout dans le pourtour méditerranéen. Elle est caractérisée par une très faible activité enzymatique, par de très faibles valeurs de K_m pour le glucose-6-P et le NADP, une grande capacité à utiliser des analogues du substrat comme le galactose.6.P, le 2 desoxyglucose.6 P ou le desamino NADP et une mobilité électrophorétique normale. Des études biochimiques montrent des différences minimales entre les propriétés de ces enzymes et amènent à considérer que cette variante n'est pas homogène. Les études récentes sur des enzymes de différentes populations montrent qu'elles sont toutes caractérisées par une seule mutation C→T au niveau du nucléotide 563 (20).

3.1.4 - TRANSMISSION GENETIQUE

Le gène contrôlant la synthèse de la G6PD est situé sur le chromosome X ; la transmission héréditaire du déficit est donc liée au sexe et se transmet selon le mode récessif. Le déficit trouve sa pleine expression chez les hommes porteurs d'un variant génétique hérité de leur mère. L'activité G6PD des femmes 46, X(Gd+) X(Gd-) est en général intermédiaire entre celle des hommes atteints et celle des sujets à G6PD normale. En fait, il s'avère que l'activité est très souvent supérieure à 50%, parfois elle avoisine les 20%. La femme hétérozygote comporte une mosaïque de cellules constituée de deux populations distinctes pouvant être d'importance inégale, l'une déficitaire, l'autre normale. Des études du gène codant pour la G6PD ont permis de confirmer la théorie de l'inactivation de l'X.

3 - 2 -LA PYRUVATE KINASE (E.C.: 2.7.1.40)

Le déficit en PK entraîne une anémie hémolytique. Bien que relativement rare par rapport au déficit en G6PD, il arrive en seconde position dans le monde parmi les déficits enzymatiques érythrocytaires héréditaires humains.

Le plus souvent, le déficit en PK est sévère quoique incomplet. La baisse importante de l'activité de l'enzyme, *in vitro*, s'accompagne, dans certains cas, d'une élévation du taux du 2,3 DPG et d'une baisse de l'activité glycolytique de la cellule. Celle-ci se traduit par une diminution d'ATP, qui serait responsable de l'hémolyse.

La transmission du déficit est héréditaire et se fait selon le mode autosomique récessif. Les deux sexes sont également atteints. Les homozygotes présentent une anémie hémolytique et une splénomégalie. On observe habituellement une diminution importante de l'activité de la PK, atteignant 0 à 20% de l'activité normale du globule rouge. Les hétérozygotes sont cliniquement et hématologiquement normaux. L'activité PK érythrocytaire atteint des valeurs situées aux environs de 50% de l'activité normale, mais ce déficit est souvent masqué par la présence de cellules jeunes (25).

Plusieurs auteurs ont noté l'absence de relation entre le degré du déficit et la sévérité des symptômes d'hémolyse (25, 106). Le déficit en PK a été considéré comme un épiphénomène associé à d'autres désordres métaboliques localisés par exemple dans la membrane ou dans les systèmes de régénération de l'ATP. En effet Schröter et Tillmann montrent que dans les conditions physiologiques, environ 4% de la PK érythrocytaire sont liés à la membrane (184). Cette enzyme membranaire peut jouer un rôle majeur en approvisionnant en ATP, l'ATPase membranaire et d'autres systèmes consommant de l'ATP. Ainsi la sévérité de l'hémolyse serait en relation avec la quantité de PK liée à la membrane. Pour Kahn et col. l'expression clinique du déficit serait liée aux anomalies cinétiques de l'enzyme et à sa faible activité résiduelle (106).

3.2.1 - STRUCTURE

On distingue deux isoenzymes de la PK chez l'homme: la forme L caractéristique du globule rouge et du foie (Liver) et la forme M caractéristique du muscle squelettique et du muscle cardiaque.

La PK de type L semble subir après synthèse un processus de protéolyse différent dans le foie et dans le globule rouge (103, 104, 105, 138, 190).

Le précurseur appelé PK R1, synthétisé dans l'érythroblaste, est partiellement protéolysé durant la maturation cellulaire ; il en résulte une autre forme de PK dite PK R2 dans les érythrocytes. Ces deux isoenzymes peuvent être séparées par électrophorèse: la PK R1, forme unique des érythroblastes, domine dans les globules rouges jeunes ; la PKR2 domine dans les globules âgés (105).

La PK R1 correspond à un homotétramère designé par L'4 (masse moléculaire de $L'=63000$ D), la PK R2 à un hétérotétramère L'2Lc2 (masse moléculaire de $Lc =57000-58000$ D) (105).

Par électrophorèse sur gel de polyacrylamide, un troisième type de sous unité (dite Lb) peut être détecté. Il représente moins de 10% de l'activité totale de la PK et possède une masse moléculaire de 60 000 D (105).

3.2.2 - PROPRIETES CATALYTIQUES

La pyruvate kinase du globule rouge possède les propriétés d'une enzyme allostérique. Son substrat PEP exerce un effet homotropique positif avec un nombre de Hill compris entre 1 et 2,5. Le fructose 1,6 diphosphate est le principal activateur allostérique. L'ATP et l'alanine sont les principaux inhibiteurs allostériques. Comme toutes les autres PK, l'enzyme érythrocytaire nécessite pour son activité l'apport d'ions Mg^{++} (25).

La constante de demi-activation par le PEP est variable d'un individu à l'autre et d'une préparation à l'autre. Elle est de $1,31 \pm 0,13$ mmol/l. Le $K_{0,5}(ADP)$ est de $0,18 \pm 0,027$ mmol/l. En présence de fructose 1-6-diphosphate la courbe sigmoïde se

transforme en une hyperbole ; à une concentration de $0,70 \pm 0,15$ mmol/l, on obtient 50% d'activation de la PK (25).

Le pH optimum d'activité de la PK est compris entre 6,5 et 7 (25).

On peut distinguer deux classes de PK chez les patients. Le premier groupe de PK est caractérisé par une augmentation d'affinité vis à vis du substrat PEP et du FDP et une diminution d'affinité vis à vis de l'ATP (c'est à dire un déplacement d'équilibre vers la forme R de l'enzyme). Le deuxième groupe est caractérisé par une diminution d'affinité vis à vis du PEP et du FDP et une augmentation d'affinité vis à vis de l'ATP et l'alanine (c'est à dire un déplacement d'équilibre vers la forme T de l'enzyme) (194).

3 - 3 - EXPLORATIONS BIOLOGIQUES

Pour diagnostiquer les érythroenzymopathies, il existe plusieurs tests de dépistage. Certains sont réalisés directement sur du sang total et sans matériel de mesure ; ce sont les tests colorés (réduction d'un sel de tetrazolium par exemple) ou de fluorescence. Ces méthodes sont douées de spécificité, mais pechent par manque de sensibilité. D'autres font intervenir la mesure de l'activité enzymatique et nécessitent des techniques spectrophotométriques. Ces méthodes reposent sur le principe du test optique de Warburg et apprécient les variations de densité optique qui, en lumière ultraviolette, accompagnent le passage des formes oxydées aux formes réduites des pyrimidines nucléotides et vice versa. Les dosages sont effectués sur un hémolysat de globules rouges.

Malgré la relative facilité des mesures enzymatiques, l'interprétation des résultats est souvent très délicate. L'interférence des hématies jeunes et en particulier des réticulocytes dans le niveau de l'activité enzymatique mesurée, constitue un piège majeur de cet examen. Les plus vieilles cellules qui étaient les plus déficitaires et donc les plus fragiles ont été éliminées de la circulation et remplacées par des hématies jeunes. L'activité enzymatique de celles ci étant toujours plus importante, on peut alors trouver une activité enzymatique très

proche de la normale. Ainsi, chez des malades atteints d'anémies hémolytiques la sévérité de l'hémolyse n'est pas toujours proportionnelle au déficit enzymatique. A déficit égal d'une même enzyme, certains sujets sont asymptomatiques alors que d'autres présentent une anémie hémolytique grave (210).

Dans le cas de déficit liés au chromosome X (ex. G6PD), la mise en évidence des femmes hétérozygotes représente une difficulté importante. En effet, elles possèdent en proportions variables deux populations de globules rouges dont l'une seulement est atteinte du déficit. Cela se traduit en pratique par des activités allant des valeurs très proches du déficit aux valeurs normales.

L'activité d'une enzyme liée aux conditions du dosage (température, pH, réactifs,...) et l'inexistence de solution de contrôle adaptée à l'enzymologie érythrocytaire constitue un handicap qui oblige à recourir à un hémolysat témoin lors de chaque détermination et qui empêche jusqu'alors toute standardisation réelle de la mesure des activités enzymatiques (210).

PARTIE EXPERIMENTALE

I - MATERIELS ET METHODES

1-MATERIELS

- Centrifugeuse Beckmann J-21
- Spectrophotomètre Shimadzu (UV 160 A) avec passeur automatique de cuves et enregistreur. La thermostatisation est effectuée à l'aide d'un système thermoélectrique (effet Peltier).
- Lyophilisateur SMH15 (USIFROID)
- Filtres 0,22 μ m (MILLIPORE)

2-REACTIFS

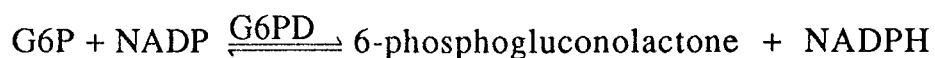
EDTA disodium, Tris, Saccharose, Dimethylsulfoxide (DMSO), Sulfate d'ammonium, Dextran 70, Dextran 500: MERCK. Imidazole, β -Alanine, Sorbitol, Glycérol, Ethylène-glycol, Chlorure de sodium, Chlorure de potassium, Chlorure de magnésium, Dimethylformamide (DMF), Tetrachlorure de carbone: PROLABO. EDTA disodium-magnésium, EDTA disodium-zinc: FLUKA. Glucose-6-phosphate, Phospho-enol-pyruvate, Adenosine5'-diphosphate (ADP), Adenosine5'-triphosphate (ATP), Nicotinamide adenine dinucléotide phosphate (NADP), Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit (NADPH), Dithiothréitol, β mercaptoéthanol, Cystéine, Proline, Glutamate de sodium, Bétaïne, Sarcosine, TriméthylamineN-oxide (TMAO), Lactose, Maltose, Mannose, Raffinose, Tréhalose: SIGMA. Fructose-1,6-diphosphate, Glutathion réduit, Lactate deshydrogénase (LDH), Nicotinamide adénine dinucléotide (NAD), Nicotinamide adénine dinucléotide réduit (NADH): BOHRINGER MANNHEIM.

3 - METHODES DE DOSAGE

Les méthodes de dosage enzymatique sont celles de Cartier et col (48), utilisées dans le Laboratoire de Chimie Hématologique du C.R.T.S. de Nancy (Pr. C. Vigneron).

Conditions opératoires

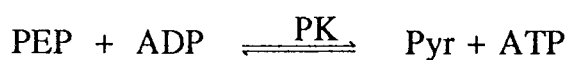
3.1 - GLUCOSE - 6 - PHOSPHATE DESHYDROGENASE :



La vitesse de la réaction est appréciée par la réduction du NADP en NADPH à 366nm et à 25°C

réactifs	volume	concentrations finales
Tampon TEA/EDTA pH 7,6 (TEA 100mmol/l EDTA 10mmol/l)	2600 µl	TEA 86,66 mmol/l EDTA 8,66 mmol/l
NADP 15 mmol/l	100 µl	0,5 mmol/l
hémolysat (Hb = 30 g/l)	100 µl	
La réaction est déclenchée par		
G6P 52,5mmol/l	200 µl	3,5 mmol/l

3.2 - PYRUVATE KINASE :



La vitesse de la réaction est appréciée par l'oxydation du NADH₂ en NAD à 366nm.

réactifs	volume	concentrations finales
Tampon TEA/EDTA (100mmol/l-10mmol/l)	2200 µl	TEA 73,33 mmol/l EDTA 7,33 mmol/l
KCl 750 mmol/l	200 µl	50 mmol/l
Mg Cl ₂ 600 mmol/l	100 µl	20 mmol/l
NADH ₂ 15 mmol/l	50 µl	0,25 mmol/l
PEP 52,5 mmol/l	200 µl	3,5 mmol/l
LDH 5 mg/ml	5 µl	
Attendre 5 min		
hémolysat (Hb = 30 g/l)	100 µl	
ADP 52,5 mmol/l	200 µl	3,5 mmol/l

Les mesures d'activité enzymatique sont effectuées à 25°C, à pH = 7,6 et à $\lambda = 366$ nm.

3.3 - AUTRES ENZYMES : Glutathion réductase (91) ; Glutathion peroxydase (162) ; Galactose-1-phosphate uridyl transferase (96).

Pour l'étude de la commutabilité, nous avons utilisé les techniques du Comité International de Standardisation en Hématologie (C.I.S.H.) (15) dont les concentrations finales des différents produits sont indiquées dans le tableau suivant:

G6PD	PK
Tampon pH 8 : Tris-HCl 0,1 mol/l EDTA 0,5 mmol/l	Tampon pH 8 : Tris-HCl 0,1 mol/l EDTA 0,5 mmol/l
MgCl ₂ -----10mmol/l	MgCl ₂ -----10mmol/l
NADP-----0,2mmol/l	KCl-----100mmol/l
Glucose6P-----0,6mmol/l	NADH-----0,2mmol/l
	ADP-----1,5mmol/l
	LDH-----6UI
	PEP-----5mmol/l

Les mesures d'activité enzymatique sont effectuées à 37°C, à pH 8 et à $\lambda = 366$ nm.

3.4 - DOSAGE DE L'HEMOGLOBINE

Il est réalisé selon la méthode de Drabkin (62).

3.5 - EXPRESSION DES RESULTATS

Les résultats sont exprimés en mUI par 100 mg d'hémoglobine. Une UI est définie comme la quantité d'enzyme qui catalyse 1 μmol de substrat par minute à 25°C et à pH 7,6.

L'activité enzymatique par 100 mg d'hémoglobine correspond à :

$$\text{DO/min.} \times \frac{3}{\substack{\epsilon = \text{coefficient} \\ \text{d'extinction du} \\ \text{coenzyme}}} \times \frac{1\,000}{\substack{\mu\text{l prise} \\ \text{d'essai}}} \times \frac{100}{\substack{\text{concentration} \\ \text{d'hémoglobine} \\ \text{dans l'hémolysat} \\ \text{en mg/100 ml}}} \times 100$$

$$\epsilon = 3,3 \times 10^6 \text{ cm}^2 \times \text{mole}^{-1}$$

4 - PROTOCOLE D'ETUDE DE LA STABILITE DES SOLUTIONS DE CONTROLE

4.1 - PREPARATION DE L'HEMOLYSAT

Une poche de sang total frais non utilisable en transfusion provenant de saignée prélevée sur CPD est lavée à 3 reprises avec du NaCl 0,9 %. Le surnageant et la couche de globules blancs sont éliminés par aspiration. A un volume de globules rouges on ajoute un volume d'eau distillée et un demi-volume de tétrachlorure de carbone. Ce mélange est centrifugé à 20 000 g pendant 10 min. On récupère l'hémolysat et on ajuste la concentration d'hémoglobine à environ 30 g/l avec un tampon imidazole 0,01 mol/l, pH 6,8 contenant les additifs étudiés pour la conservation à la concentration finale choisie.

4.2 - CONSERVATION D'UNE SOLUTION PRETE A L'EMPLOI

4.2.1 - Première estimation: choix d'un stabilisateur

Dans un premier temps, nous avons évalué l'effet protecteur de plusieurs composés vis à vis des enzymes à des températures élevées. Les hémolysats en présence d'additifs sont répartis en petites fractions de 1 ml dans des tubes à hémolyse. Ces fractions sont placées dans un bain-marie à 50°C pour l'étude de la G6PD et à 56°C pour l'étude de la PK. Ces températures ont été choisies arbitrairement à la suite de l'étude des demi-vies des deux enzymes. Les tubes contenant les hémolysats sont prélevés à intervalles de 5 min durant 30 à 35 min et plongés dans la glace. Les activités enzymatiques restantes sont déterminées.

4.2.2 - Conservation à court terme:

Certains composés n'ont pas d'effet protecteur à des températures aussi élevées mais peuvent avoir un effet protecteur à des températures plus basses. C'est le cas des substrats et coenzymes, de l'éthylène glycol, du DMSO et du DMF. Leur effet protecteur est donc estimé à l'aide d'une conservation à court terme à 22 °C. Les hémolysats préparés sont stérilisés par filtration stérilisante (filtres stériles 0,22 µm) puis distribués en fractions de 1 ml dans des flacons à vis stériles de 4 ml et conservés à 22°C. L'activité enzymatique est mesurée tous les 5 jours pendant une période de 30 jours.

4.2.3 - Conservation à long terme

Des protecteurs agissant à fortes concentrations (glycerol, éthylène glycol, DMSO, DMF, saccharose, sorbitol, TMAO, sarcosine, betaïne, alanine, acide glutamique) sont combinés à des protecteurs agissant à des concentrations relativement faibles (NADP+, PEP et le glutathion réduit). Les hémolysats comportant les protecteurs sont stérilisés par filtration stérilisante (filtres stériles de 0,22µm) sous hotte et repartis en fractions de 1 ml dans des flacons stériles de 4 ml . Les différents lots (environ 50

flacons) sont placés à des températures de -20°C et $+4^{\circ}\text{C}$. Les activités enzymatiques de ces solutions sont mesurées sur 3 spécimens différents tous les mois pendant un an de conservation.

4.3-CONSERVATION D'UNE SOLUTION LYOPHILISEE

4.3.1-Méthode de préparation:

L'hémolysat est préparé comme précédemment; la concentration de l'hémoglobine est ajustée à 80 g/l à l'aide d'un tampon Tris-HCl 0,05 mol/l pH 7,4 contenant les additifs étudiés à la concentration finale choisie. Ces additifs sont déjà utilisés comme protecteurs (NADP⁺ 0,5 mmol/l, PEP 0,5 mmol/l) et le N-acetylcysteine 0,25 mmol/l, l'azide de sodium 0,01% utilisés par différents auteurs dans des solutions de contrôles (183, 160, 166, 215). Les différentes solutions ainsi préparées sont réparties en petites fractions de 0,5 ml dans des flacons de 5 ml. La lyophilisation est effectuée sur un appareil SMH 15 (USIFROID). Elle consiste en une première étape de congélation pendant deux heures à une température de -60°C suivie d'une sublimation à une température de $+8^{\circ}\text{C}$ pendant 24 heures. Les flacons lyophilisés sont sertis à l'aide d'une capsule d'aluminium. Les différents échantillons sont conservés à $+4^{\circ}\text{C}$ et à 22°C . La reconstitution est effectuée en ajoutant 2 ml d'eau distillée au lyophilisat, ce qui permet d'obtenir une concentration en hémoglobine de 20 - 30 g/l. Les activités enzymatiques de la G6PD et la PK sont mesurées juste après lyophilisation. Ces mesures sont répétées tous les 30 jours pendant un an de conservation.

4.3.2-Essais de dégradation accélérée:

Les solutions lyophilisées sont souvent stables aux faibles températures. Nous avons effectué des essais de dégradation accélérée à des températures de 45°C et 56°C . Les activités enzymatiques G6PD et PK sont mesurées à intervalles d'un mois pendant 3 mois de conservation pour les lots (15 échantillons)

placés à 45°C, et à intervalles de 3 jours pendant 10 jours pour les lots (15 échantillons) placés à 56°C.

5-MODALITES DE REPRESENTATION ET D'INTERPRETATION DES RESULTATS

a) Pour l'estimation de l'effet protecteur des différents composés, les activités enzymatiques en fonction du temps des hémolysats placés aux températures de 22°C, 50°C ou 56°C sont présentés sous forme de graphiques.

L'effet protecteur (δ) d'un composé est estimé à l'aide de son effet sur la demi-vie de l'enzyme, aux températures de 50°C pour la G6PD et de 56°C pour la PK.

$$\delta = \frac{\text{demi-vie de l'enzyme avec protecteur}}{\text{demi-vie en l'absence de protecteur}}$$

La demi-vie de l'enzyme à une température donnée est la période au terme de laquelle l'activité enzymatique est diminuée de moitié.

La demi-vie de l'enzyme et donc l'effet protecteur d'un composé sont déterminés à partir de l'équation calculée par régression linéaire du logarithme de l'activité enzymatique en fonction du temps. Les résultats sont présentés sous forme de tableaux et d'histogrammes.

b) Au cours des études à long terme la stabilité des deux enzymes à +4°C et à -20°C est suivie par mesure des activités catalytiques. A chaque temps, les dosages sont effectués sur 3 flacons prélevés dans chaque lot. Les résultats sont exprimés sous-forme de graphiques représentant la moyenne des trois valeurs pour chaque temps.

Dans tous les essais de conservation effectués, la période de stabilité représente la durée pendant laquelle les activités enzymatiques sont incluses dans un domaine de validité égal à l'activité obtenue au temps zéro (moyenne de 3 valeurs) plus ou moins deux fois l'écart-type caractérisant la reproductibilité de la méthode du dosage. Cet intervalle est représenté, sur les

graphiques montrant l'activité en fonction du temps, par deux traits correspondant au minimum et au maximum d'activité.

Les données sont aussi analysées par régression linéaire. L'expression générale de la régression linéaire est: $Y_i = ax_i + b$ où x_i représente la durée exprimée en jours ; Y_i correspond à l'activité enzymatique estimée par cette équation au temps x_i ; b est la valeur de Y_i pour $x_i = 0$; a est la pente de la droite de régression. La valeur de la pente et son écart-type $\sigma(a)$ sont déterminés à l'aide des équations suivantes (89):

$$a = \frac{n \sum x_i y_i - \sum x_i \sum y_i}{n(\sum x_i^2) - (\sum x_i)^2}$$

$$\sigma(a) = \left(\sum (y_i - Y_i)^2 / ((n-2) \sum (x_i - \bar{x})^2) \right)^{1/2}$$

y_i désigne la valeur de l'activité enzymatique mesurée au temps x_i . n est le nombre de valeurs mesurées durant toute la période de conservation.

L'activité enzymatique d'un hémolysat en présence d'un protecteur est considérée comme stable lorsque la pente a n'est pas différente de zéro avec une probabilité supérieure ou égale à 95%. Cette estimation est réalisée en calculant $t = a/\sigma(a)$, cette valeur sera comparée à celle donnée par la table de student pour $p = 0,05$ avec $(n-2)$ degré de liberté.

c) Pour l'étude de la dégradation accélérée des solutions lyophilisées, nous avons étudié la stabilité à 45°C et à 56°C. Les valeurs d'activités enzymatiques restantes au cours du temps sont exprimées en pourcentage par rapport à l'activité au temps zéro. Les résultats sont présentés sous forme de tableaux et de graphiques. La vitesse de dégradation des enzymes étant prise d'ordre 1, la perte d'activité en fonction du temps à une température donnée est supposée exponentielle. A la température T , la constante de vitesse de dégradation reliant l'activité $(a-x)$ obtenue au temps t à l'activité initiale (a) : $k_T = 1/t \times \ln(a/a-x)$. Ainsi k_T est la tangente de la fonction $\ln(a-x) = f(t)$ déterminée par régression linéaire. Les constantes de vitesse sont

calculées pour chaque lot à 22°C, à 45°C et à 56°C. A partir de ces 3 valeurs nous avons calculé la constante de vitesse de dégradation à +4°C et à -20°C en utilisant l'équation d'Arrhénius. En effet celle-ci relie la constante de vitesse k_T à la température T: $\text{Ln}k_T = \text{Ln}A - \Delta E/RT$ où R= constante des gaz parfaits, ΔE = l'énergie d'activation, T= température absolue donnée en °K (= 273 + °C) et A = une constante. La fonction $\text{Ln}k_T = f(1/T)$ a été calculée par regression linéaire (100, 115, 116).

Pour faciliter la lecture de ce travail, nous avons repertorié en italique les conclusions de nos propres résultats expérimentaux.

6-PROPRIETES ANALYTIQUES DES DIFFERENTES SOLUTIONS

Les propriétés de ces solutions sont étudiées et comparées à celles d'un hémolysat témoin préparé sans protecteur.

6.1- RECHERCHE DE LA METHEMOGLOBINE

Les taux de méthémoglobine dans ces solutions sont déterminés après un an de conservation à l'aide de la méthode d'Evelyn et Malloy (67).

6.2- PROPRIETES CATALYTIQUES DES ENZYMES

6.2.1- Glucose - 6 - phosphate deshydrogénase :

a - Constantes catalytiques

La détermination des constantes catalytiques, K_m et V_m , est réalisée selon la méthode de Cartier et col. (48) en faisant varier la concentration de l'un des substrats.

Pour la G6PD, les vitesses initiales sont déterminées à huit concentrations différentes de glucose-6-phosphate variant entre 0,02 et 2 mmol/l, la concentration du NADP étant maintenue constante (0,5 mmol/l). Les résultats sont portés sur un graphique selon la méthode des inverses de Lineweaver-Burk. La courbe est ensuite tracée par ajustement linéaire des moindres carrés (regression).

b - Analogues du substrat :

Les différentes solutions sont testées en présence du glucose-6-phosphate 2 mmol/l et de NADP 0,5 mmol/l dans un premier temps. Ensuite le glucose-6-phosphate est remplacé par l'un de ses analogues, le galactose-6-phosphate ou le 2-desoxyglucose-6-phosphate à la même concentration (2 mmol/l) ; la concentration de NADP étant maintenue constante (0,5 mmol/l). Les résultats des activités des différentes solutions en présence d'analogues du substrat sont exprimés en pourcentage par rapport à l'activité enzymatique observée avec le glucose-6-phosphate (2 mmol/l).

c - Courbe d'activité en fonction du pH :

L'activité enzymatique G6PD en fonction du pH est étudiée selon la méthode de Cartier et col. (48) en remplaçant le tampon TEA/EDTA pH 7,6 par des solutions tampons dont le pH varie de 6,5 à 9,5, préparées à partir de Tris-HCl 0,05 mol/l. Les solutions dont le pH est compris entre 9,5 et 7,5 sont ajustées à l'aide de HCl N et celles dont le pH est en dessous de 7,5 avec du citrate 0,2 mol/l.

6.2.2 - Pyruvate kinase

a - Constantes catalytiques

Huit concentrations différentes de PEP, comprises entre 0,25 mmol/l et 8 mmol/l, ont été préparées pour l'étude des propriétés catalytiques de la PK. La concentration en ADP étant maintenue constante à 2 mmol/l, tous les autres réactifs sont utilisés aux mêmes concentrations que pour la mesure de l'activité enzymatique (48). La K_m est calculée à l'aide de la méthode des inverses de Lineweaver-Burk.

b - Activation par le fructose diphosphate

Un test d'activation par le fructose diphosphate (FDP) (20 μ mol/l) a été réalisé en présence et en l'absence de celui-ci. Tous les réactifs sont maintenus aux mêmes concentrations que pour la

mesure de l'activité enzymatique, à l'exception du PEP et de l'ADP utilisés à des concentrations plus faibles (0,2 et 0,5 mmol/l respectivement). Les résultats sont exprimés en pourcentage d'activation par rapport au témoin sans conservateur.

c - Courbe d'activité en fonction du pH

Comme pour l'étude de la G6PD, des solutions tampons Tris HCl 0,05 mol/l ont été préparées avec des pH variant entre 5,5 et 8,5. Les solutions ayant un pH compris entre 8,5 et 7,5 sont ajustées à l'aide d'HCl N, celles ayant des pH compris entre 5,5 et 7,5 avec du citrate 0,2 mol/l. L'activité enzymatique en fonction du pH est étudiée avec les mêmes concentrations en substrat que celles utilisées pour son dosage et en remplaçant le tampon TEA/EDTA (pH 7,6) par les différentes solutions tampons préparées.

6.3 - LA COMMUTABILITE

Nous avons mesuré les activités enzymatiques de ces solutions à l'aide de deux méthodes de dosage enzymatique, celle préconisée par Cartier à 25°C (48) et celle recommandée par le C.I.S.H. à 37°C (15).

6.4 - LA VISCOSITE

Nous avons mesuré à l'aide d'un viscosimètre Low Shear 30 la viscosité de ces solutions de contrôle à 37°C.

II - RAPPEL DES RESULTATS DU DEA

1 - INTRODUCTION

Le but de notre travail est de préparer une solution de contrôle de G6PD et de PK érythrocytaires. Cette solution, en l'occurrence un hémolysat, doit être stable pendant une période suffisamment longue et doit posséder des caractéristiques proches de celles d'un échantillon sanguin provenant du patient. Nous avons approché plusieurs formes de conservation d'un hémolysat: liquide, congelée, lyophilisée avec addition de conservateurs et/ou de protecteurs d'enzymes.

2 - EFFET DE LA TEMPERATURE SUR LA STABILITE DES ENZYMES

Des hémolysats ont été placés à des températures de +4°C, -20°C et -80°C.

Les activités enzymatiques G6PD et PK diminuent rapidement, dès les premiers jours de conservation à +4°C comme à -20°C. L'activité de la G6PD diminue plus rapidement à +4°C qu'à -20°C. La PK se comporte différemment ; elle est plus stable en solution liquide à +4°C qu'en solution congelée à -20°C.

A -80°C, les activités catalytiques des deux enzymes restent stables durant un mois et demi seulement.

3 - EFFET DU pH SUR LA STABILITE DES ENZYMES

L'ajout de solutions tampons à des hémolysats permet d'obtenir des pH variant entre 5 et 8,5. Ces hémolysats sont conservés à température ambiante. Les activités enzymatiques ont été mesurées tous les jours pendant une période d'une semaine et montrent que les deux enzymes sont plus stables à des pH situés entre 6,5 et 7.

4 - EFFET DES DIFFERENTS PROTECTEURS

4.1 - Substrats et coenzymes

Le glucose-6-phosphate ou le NADP⁺ sont ajoutés à un hémolysat aux concentrations respectives de 3,5 mmol/l et 0,5 mmol/l. La G6PD est plus stable en présence de son coenzyme, le NADP⁺, alors que le glucose-6-phosphate n'a aucun effet protecteur.

On ajoute à un hémolysat du PEP ou de l'ADP aux concentrations de 3,5 mmol/l. Les deux composés ont un effet protecteur de la PK (le premier a un effet protecteur plus important que le second).

4.2 - Composés réducteurs

Des composés tels que le β -mercaptoéthanol ou le dithiothreitol ajoutés à faibles concentrations (1 mmol/l et 2,5 mmol/l) à un hémolysat n'ont pas d'effet protecteur de l'activité enzymatique de la G6PD et de la PK.

4.3 - Glycérol et éthylène glycol

Ces deux composés ont été ajoutés séparément (33 % v/v) et étudiés aux températures de +4°C et -20°C. La conservation de ces solutions pendant 2 mois montre que les deux enzymes sont plus stables avec le glycérol. Nous avons ainsi pratiqué une conservation à long terme avec un mélange de glycérol 33%, de NADP 0,5 mmol/l et à pH 7,6 ; les deux activités enzymatiques sont stables pendant les 5 mois d'étude à +4°C et à -20°C.

5 - ESSAIS DE LYOPHILISATION

Des essais de lyophilisation ont été réalisés à court terme. L'inactivation des enzymes peut être retardée par certains lyoprotecteurs comme : le glucose, le galactose étudiés à des concentrations de 2 et 5 %, le saccharose et le sorbitol étudiés à des concentrations de 5 et 10 %. Cependant, le Dextran 70 et le Dextran 500 étudiés aux concentrations de 2 et 5 % n'ont pas d'effet protecteur.

A la suite de cette étude, nous avons réalisé un essai de conservation avec un mélange de protecteurs : sorbitol 10 %, NADP 0,5mmol/l et ADP 1 mmol/l .Cette solution enzymatique est stable durant les deux mois d'étude à +4°C.

III - RESULTATS

1 - VALEURS USUELLES

Les valeurs normales des deux activités enzymatiques ont été déterminées à partir de 20 sujets adultes sains (donneurs de sang).

- G6PD : $m \pm 2 \sigma = 485 \pm 150$ mUI/100 mg d'Hb

- PK : $m \pm 2 \sigma = 915 \pm 335$ mUI/100 mg d'Hb

2 - EVALUATION DE LA PRECISION DES METHODES DE MESURE DES ENZYMES : G6PD ET PK

2.1 - REPETABILITE

L'étude de la répétabilité a été réalisée sur un hémolysat témoin prélevé le jour même et en utilisant le même lot de réactifs. Six dosages sont réalisés (Tableau I):

ni	1	2	3	4	5	6	m	σ	c.v (%)
G6PD mUI/100 mg Hb	465	475	495	485	480	460	476	11,8	2,4
PK mUI/100 mg Hb	1005	950	985	970	965	975	975	17	1,7

Tableau I: Répétabilité de la méthode de dosage.

2.2 - REPRODUCTIBILITE

L'étude de la reproductibilité a été faite durant 16 jours sur un hémolysat témoin conservé en petites fractions de 1 ml à -80°C . Les dosages sont effectués avec les mêmes réactifs conservés en petites fractions congelées à -20°C . Chaque jour, le dosage est effectué à 3 reprises sur le même flacon. Les résultats sont présentés dans le tableau II :

nj	j0	j2	j4	j7	j9	j11	j14	j16	m	σ	c.v (%)
G6PD mUI/100 mgHb	475	440	485	450	460	485	460	450	463	15,8	3,41
PK mUI/100 mgHb	945	940	980	975	990	995	985	940	968	21,7	2,25

Tableau II : Reproductibilité de la méthode de dosage.

2.3 - INTERFERENCE DE L'HEMOGLOBINE

2.3.1 - Mode opératoire

Nous avons étudié l'effet de la concentration de l'hémoglobine sur les dosages des enzymes érythrocytaires. Pour cela, nous avons préparé, à partir d'une poche de sang, plusieurs hémolysats à différentes concentrations en hémoglobine comprises entre 10 et 60 g/l. Nous avons déterminé l'activité enzymatique G6PD et PK des différents hémolysats.

2.3.2 - Résultats

On observe une augmentation de l'activité enzymatique proportionnelle à la concentration en hémoglobine jusqu'à 30 g/l (Figure 1).

Au-delà de cette valeur, l'activité n'est plus linéaire. Nous avons donc choisi de travailler à une concentration en hémoglobine de l'hémolysat inférieure à 30 g/l.

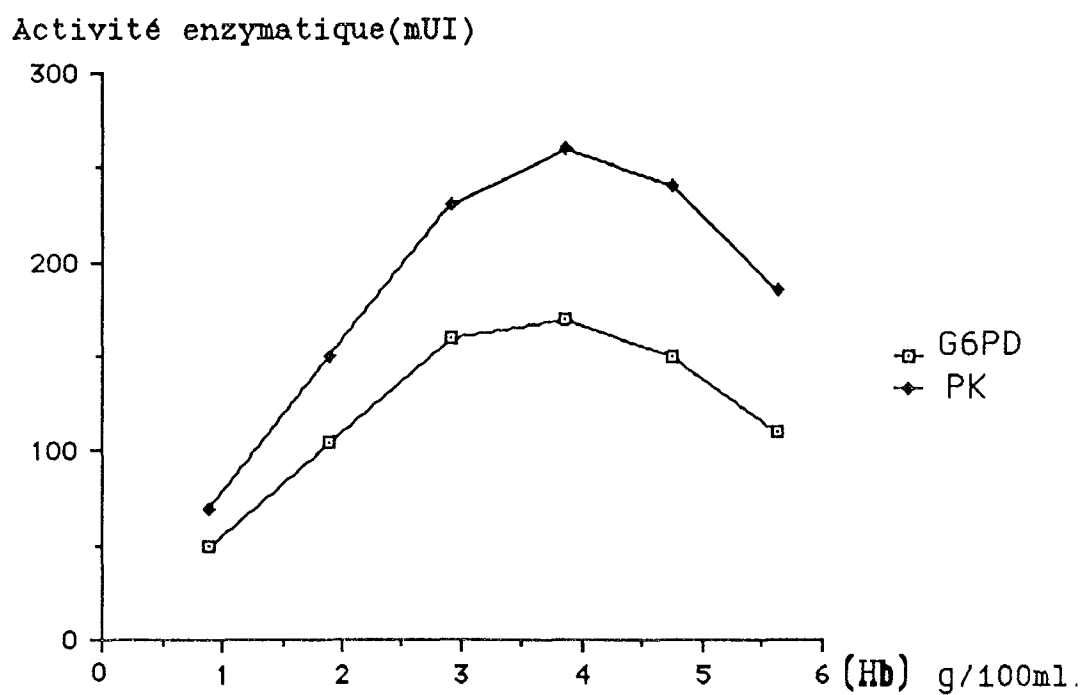


Figure 1 : Activités enzymatiques G6PD et PK d'un hémolysat en fonction de la concentration d'hémoglobine.

3 - SOLUTION DE CONTROLE PRETE A L'EMPLOI

3.1 - ETUDE DE LA STABILITE DES ENZYMES EN FONCTION DE LA TEMPERATURE

3.1.1 - Mode opératoire

Un hémolysat fraîchement préparé (page 59) est réparti en fractions de 1 ml dans des tubes à hémolyse. Ces tubes sont placés par 3 dans des bains-marie dont la température est comprise entre 37°C et 60°C. Après 30 min, les hémolysats sont retirés et placés dans la glace, ils sont en suite centrifugés à 3000 g. L'activité enzymatique restante est mesurée dans le surnageant.

3.1.2 - Résultats

Les résultats sont présentés sur la Figure 2. Chaque point représente la moyenne des 3 dosages effectués pour chaque température. *La courbe de dénaturation des enzymes en fonction de la température a une forme sigmoïde, avec une température de demi-activation (T_m) située à 45°C pour la G6PD et à 53°C pour la PK. Ainsi la PK est nettement plus stable que la G6PD.*

3.2 - CHOIX D'UN STABILISATEUR: première approche

Dans les hémolysats placés aux températures de 50°C et 56°C la diminution des activités enzymatiques G6PD et PK est de type exponentiel. *La demi-vie de la G6PD à 50°C dans un hémolysat témoin sans conservateur est en moyenne de 11 ± 3 minutes (12 essais). Celle de la PK à 56°C est de 20 ± 3 minutes (12 essais).*

3.2.1 - Substrats et coenzymes

a - Glucose-6-phosphate deshydrogénase

L'apport dans un hémolysat de substrats et de coenzymes de la G6PD (G6P, NADP, NADPH, NAD et NADH) aux concentrations de 0,5 et 1 mmol/l n'a pas d'effet protecteur à 50°C. Il en est de même, à 22°C, pour le G6P. Quant aux coenzymes, ils ont un léger

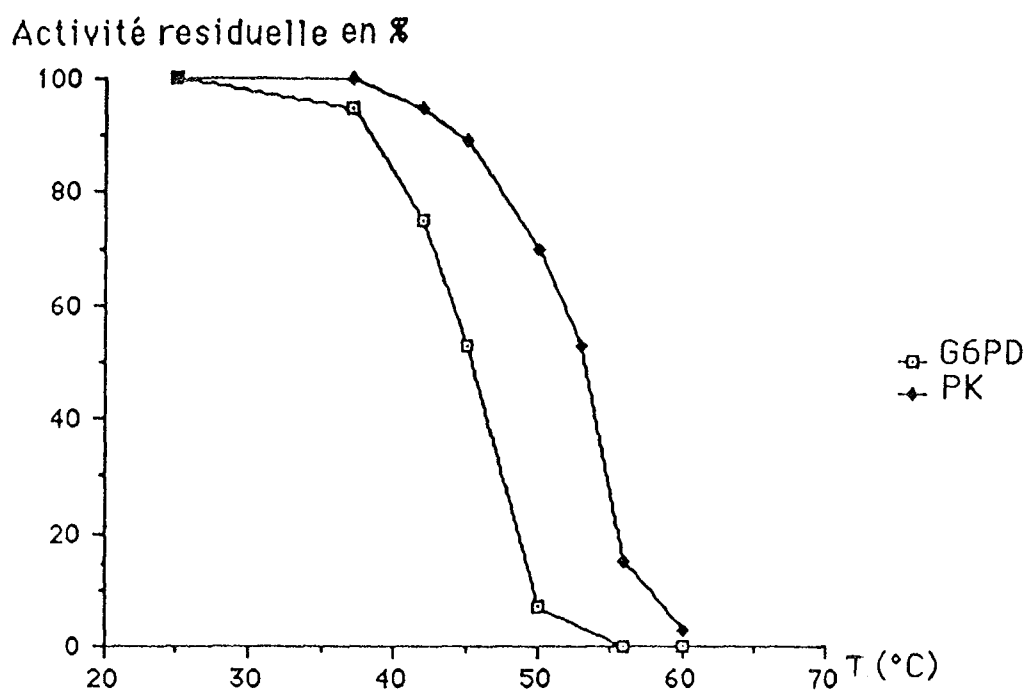


Figure 2 : Activité enzymatique résiduelle de la G6PD et de la PK d' un hémolysat placé 30 minutes à différentes températures.

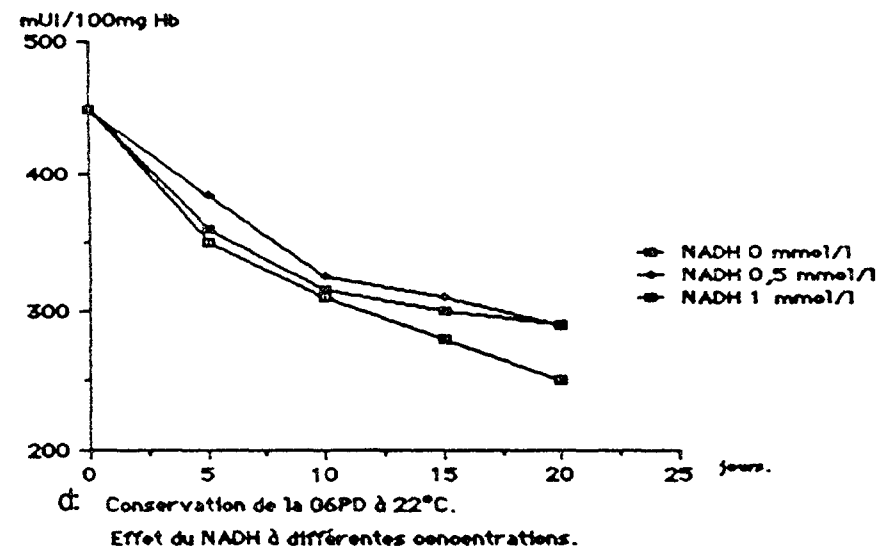
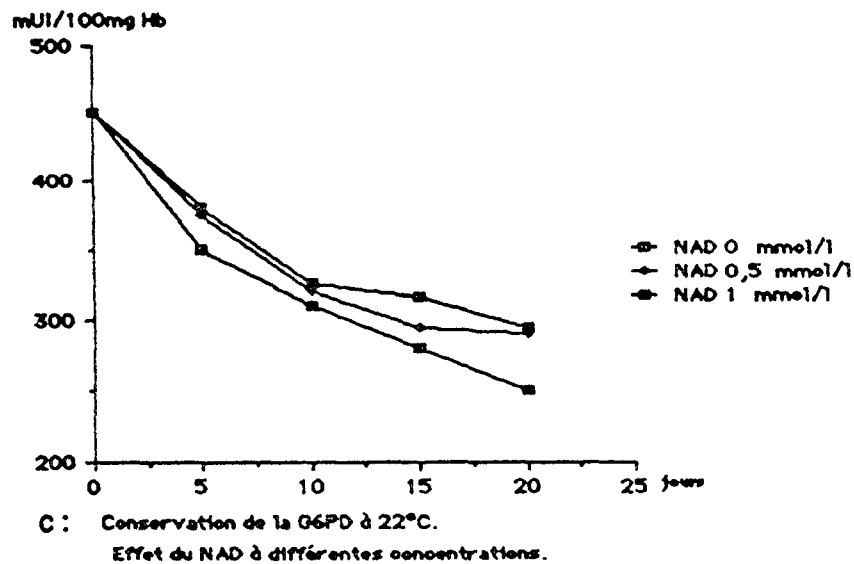
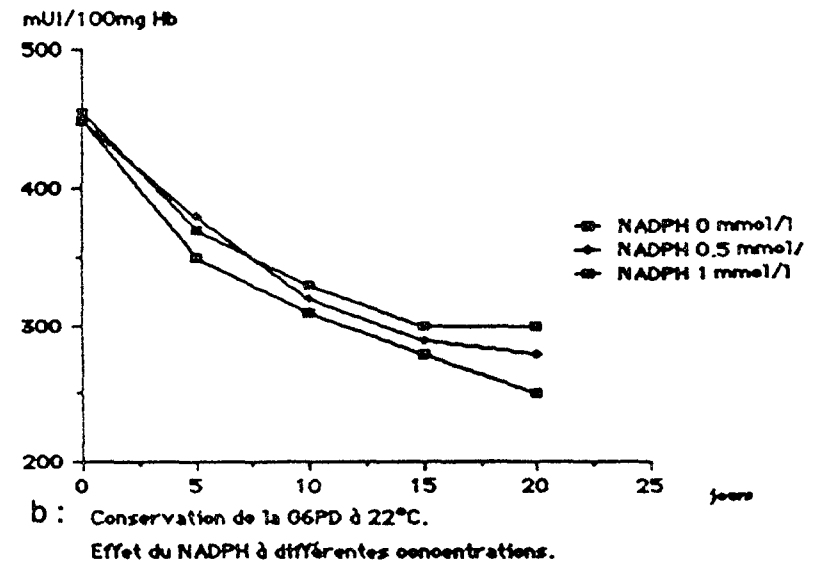
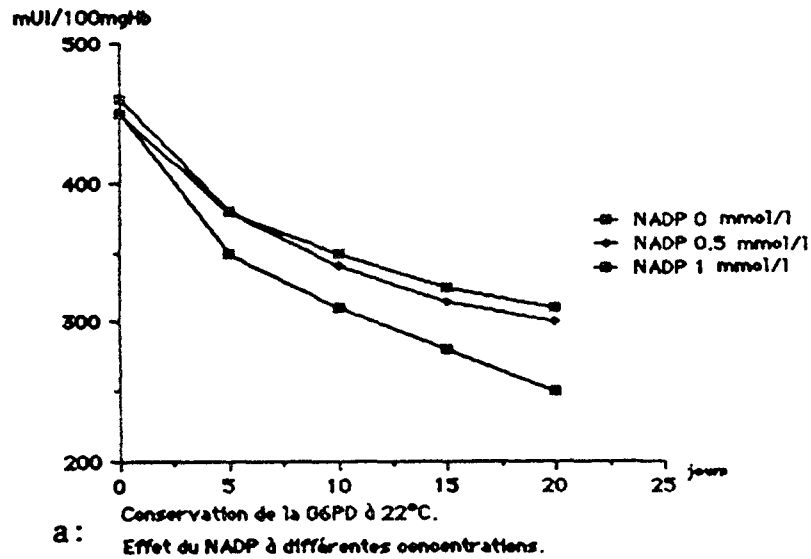


Figure 3: Conservation de la G6PD d'un hémolysat à 22°C. Effet des coenzymes (a : NADP; b : NADPH; c : NAD; d : NADH) à différentes concentrations sur la stabilité de l'enzyme.

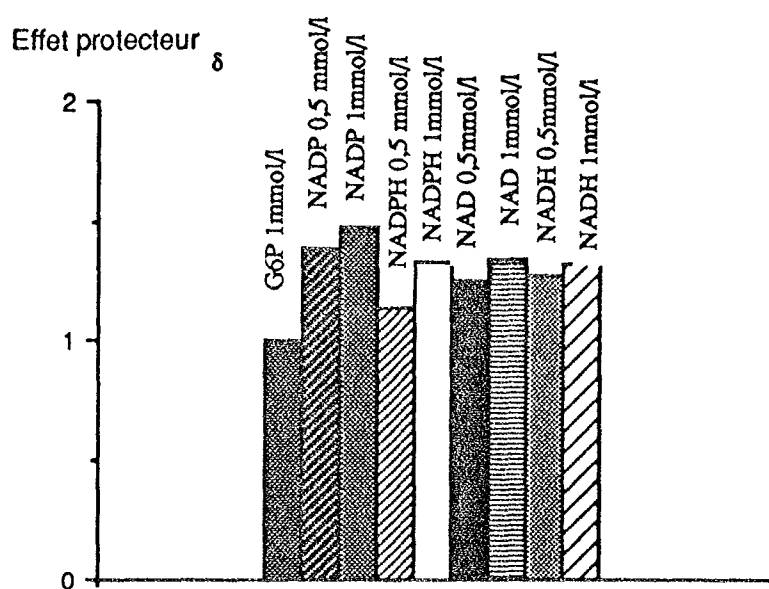


Figure 4 : Effets protecteurs des substrats et coenzymes sur l'activité de la G6PD d'un hémolysat conservé à 22°C.

pouvoir protecteur à 22°C (Figure 3). Cet effet augmente avec la concentration du coenzyme. Il est plus important en présence du NADP qu'en présence des autres coenzymes (Figure 4).

b - Pyruvate kinase

Comme pour la G6PD, le substrat et le coenzyme testés (PEP et ADP) n'ont pas d'effet protecteur à 56°C aux concentrations de 0,5 et 1 mmol/l. Cependant, ils possèdent un léger pouvoir protecteur de l'enzyme à 22°C (Figure 5). Leur effet protecteur δ est de 1,3 et 1,15 respectivement en présence du PEP et d'ADP aux concentrations de 1mmol/l (Figure 6).

3.2.2 - Composés réducteurs

A la suite des résultats de notre DEA, notre choix s'est porté sur différents composés réducteurs utilisés pour la conservation des enzymes ou de l'hémoglobine: le dithiothreitol, le β -mercaptoethanol, le glutathion réduit et la cysteine.

Les hémolysats sont préparés comme décrit précédemment (p. 59). A 22°C, 50°C et à 56°C, ces composés réducteurs ne montrent aucun effet protecteur vis à vis de la G6PD et de la PK. Seul le glutathion réduit possède un effet protecteur respectivement de 1,25 et 1,30 aux concentrations de 0,5 et 1 mmol/l à 22°C vis à vis de la PK uniquement (Figures 7- 8- 9- 10).

3.2.3 - Composés métalliques

Certains métaux lourds peuvent avoir un effet stabilisateur des enzymes à faibles concentrations (45, 46, 183). Nous avons ainsi ajouté à un hémolysat différents composés métalliques: le sulfate de cobalt, le sulfate de lithium, le sulfate de cadmium, le sulfate de fer, le sulfate de barium à une concentration de 1 mmol/l. Les hémolysats ont été conservés durant une période de 20 jours à 22°C. Aucun de ces composés ne possède un effet protecteur des deux enzymes ; δ est légèrement inférieur ou égal à 1.

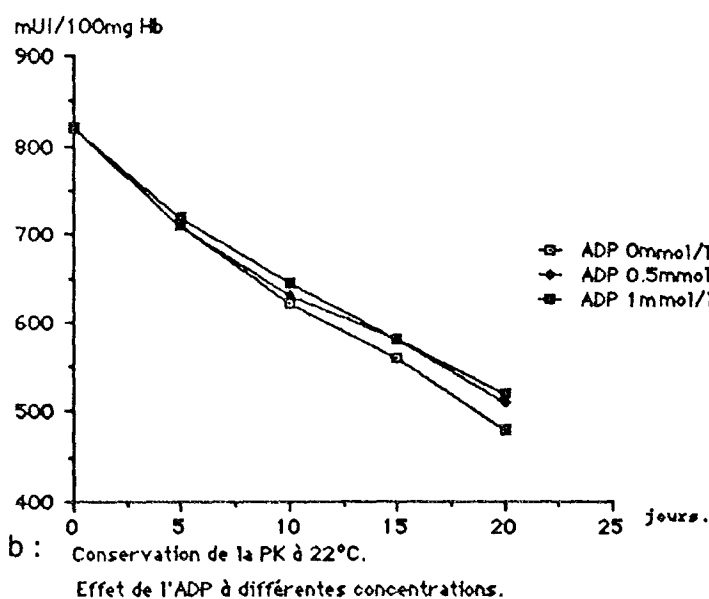
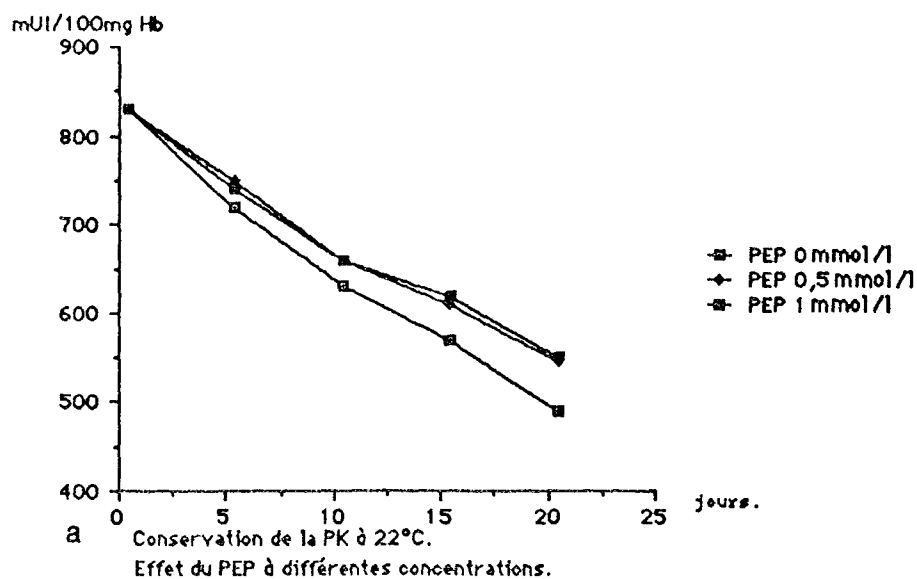


Figure 5 : Conservation de la PK d'un hémolysat à 22°C en présence
a : du PEP ; b : d'ADP.

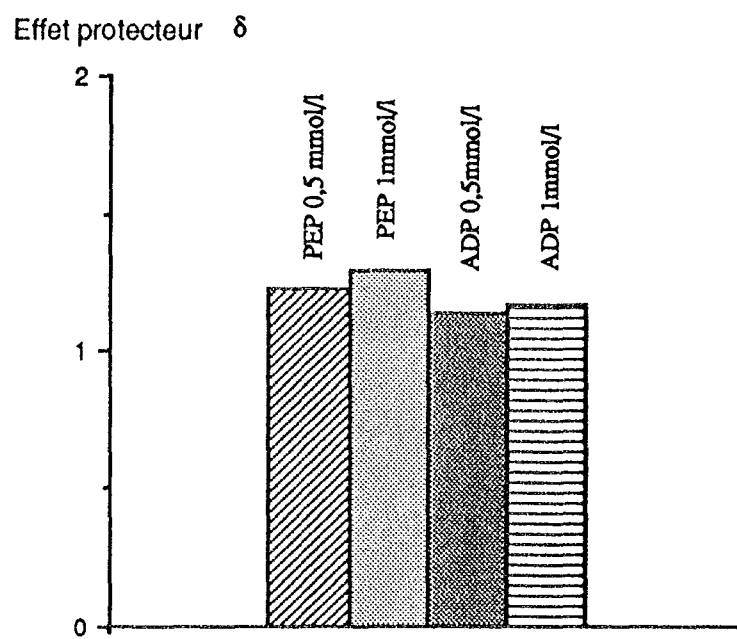
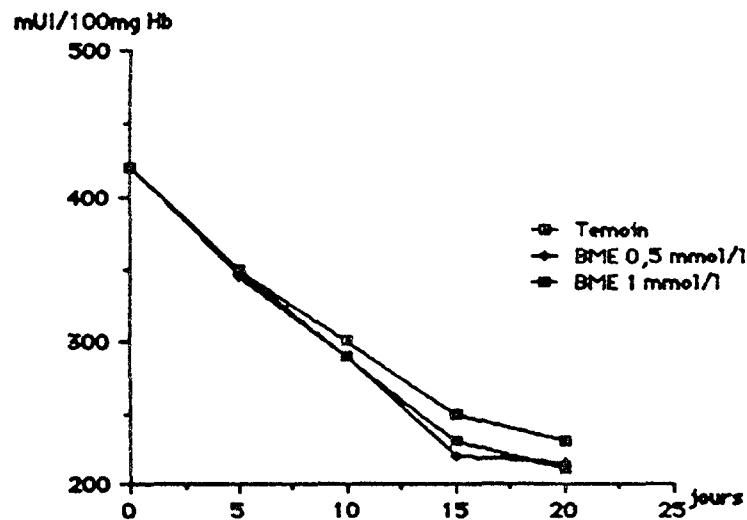
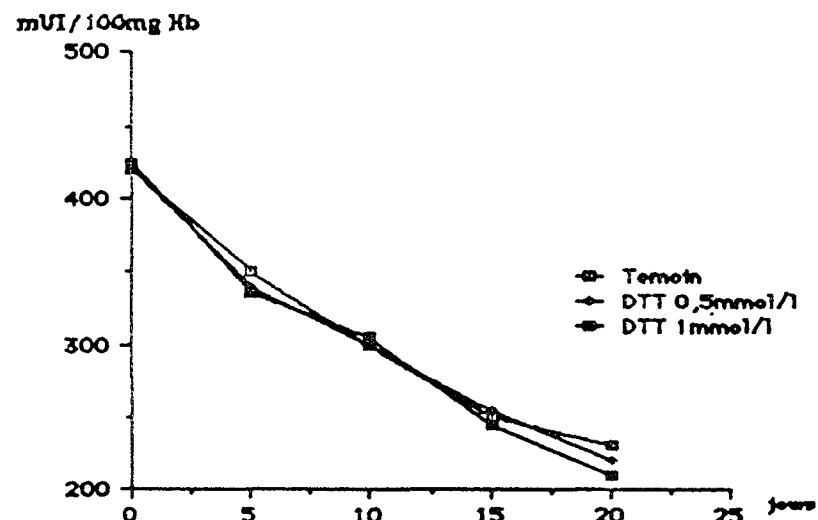


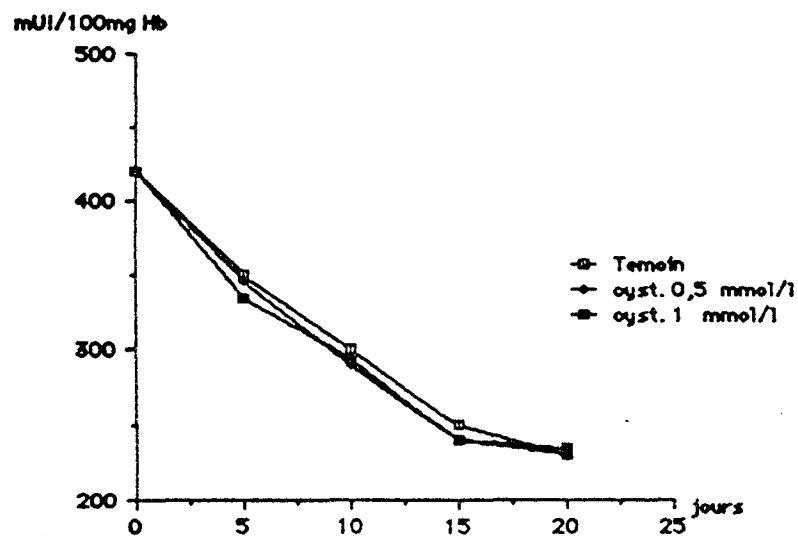
Figure 6 : Effet protecteur du PEP et de l'ADP
sur l'activité enzymatique PK d'un hémolysat à 22°C.



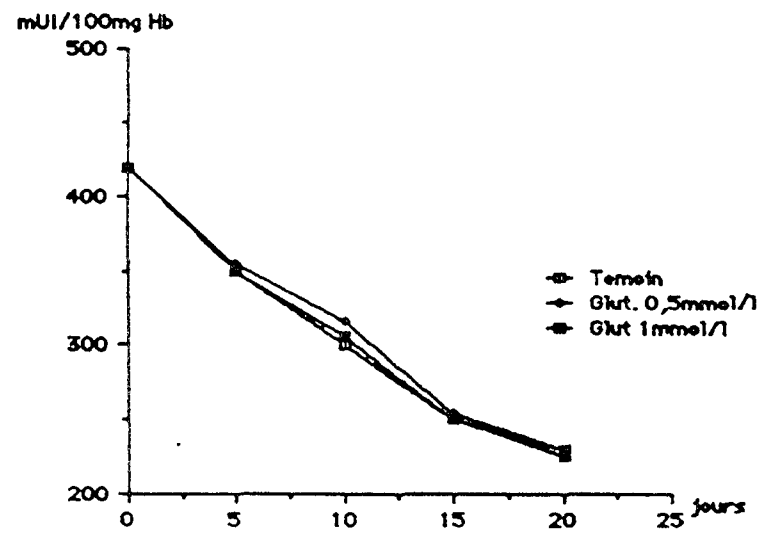
a : Conservation de la G6PD à 22°C.
Effet du β mercapto-éthanol à différentes concentrations.



b : Conservation de la G6PD à 22°C.
Effet du dithiothréitol à différentes concentrations.



c : Conservation de la G6PD à 22°C.
Effet de la cystéine à différentes concentrations.



d : Conservation de la G6PD à 22°C.
Effet du glutathion réduit à différentes concentrations.

Figure 7 : Conservation de la G6PD d'un hémolysat à 22°C en présence des composés réducteurs. a : β mercaptoéthanol
b : dithiothréitol : c : cystéine : d : glutathion réduit

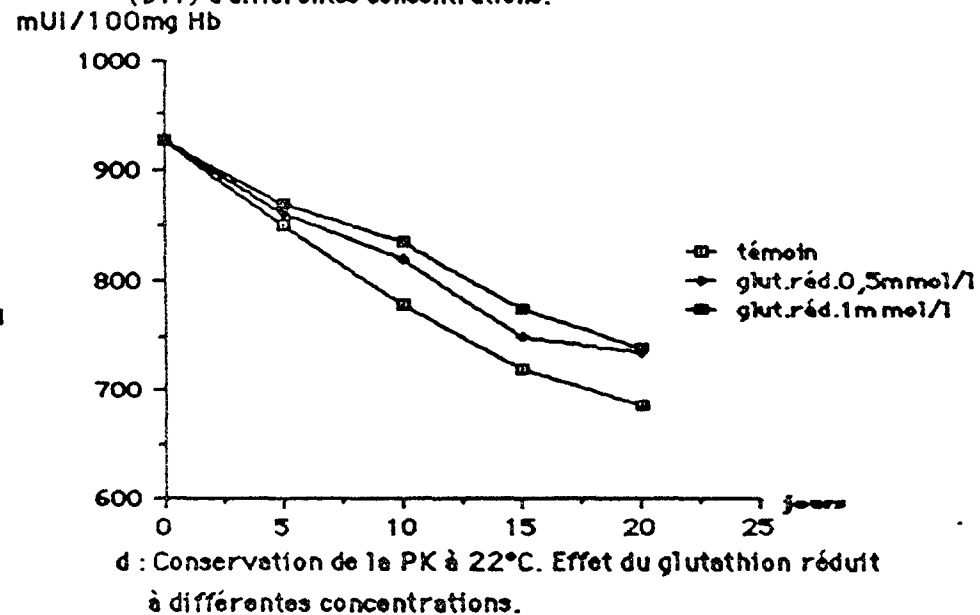
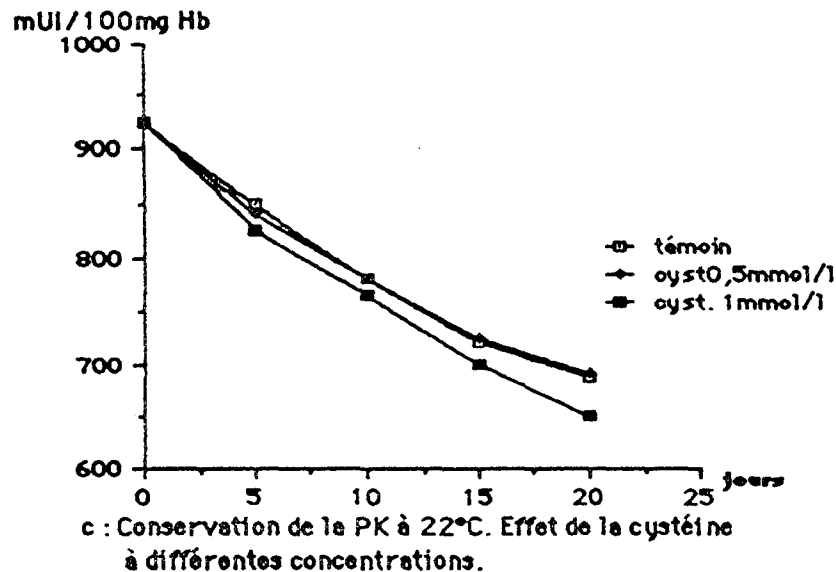
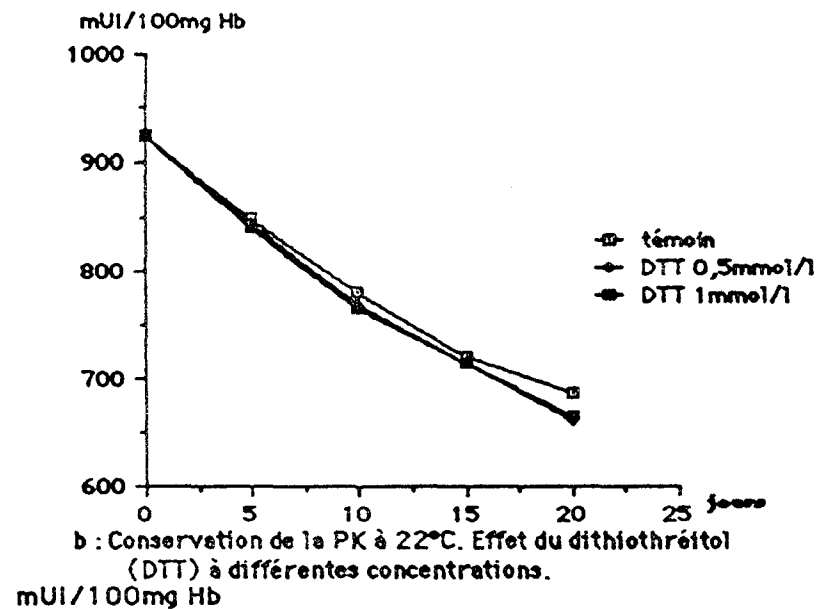
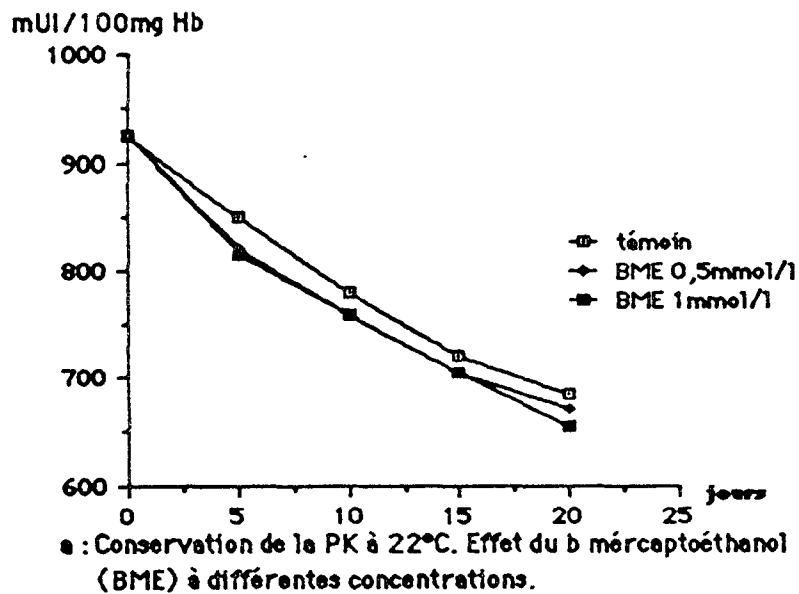


Figure 8 : Conservation de la PK d'un hémolysat à 22°C en présence de composés réducteurs

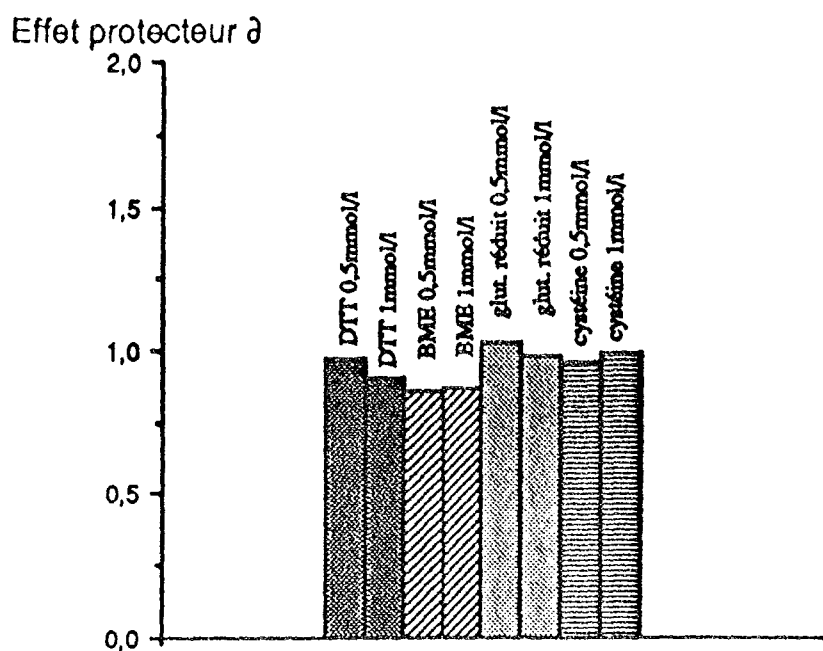


Figure 9 : Effets protecteurs des composés réducteurs sur l'activité de la G6PD à 22°C.

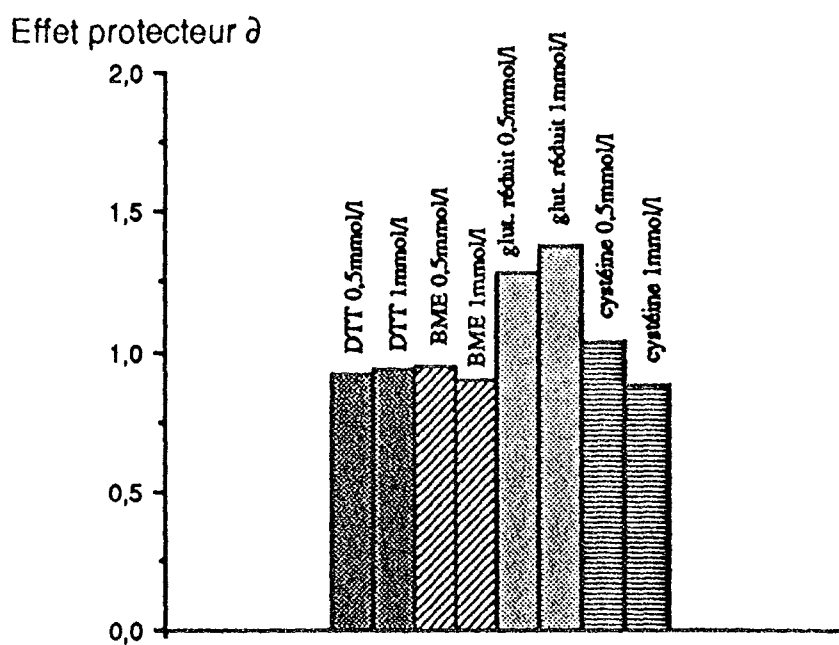


Figure 10 : Effets protecteurs des composés réducteurs sur l'activité de la PK à 22°C.

3.2.4 - Polyalcools

Depuis longtemps connus comme stabilisateurs des protéines, les polyalcools utilisés dans cette étude sont: le glycérol, l'éthylène-glycol, le saccharose et le sorbitol.

L'éthylène glycol n'a pas d'effet protecteur à ces hautes températures et sera étudié à 22°C avec d'autres solvants: le diméthylsulfoxyde (DMSO) et le diméthylformamide (DMF).

En présence du glycérol, du saccharose ou du sorbitol la dénaturation des enzymes est toujours de type exponentiel. Le logarithme de l'activité enzymatique résiduelle en fonction du temps est une droite (Figure 11 b). La demi-vie de l'enzyme (et ainsi l'effet protecteur d'un composé) est calculée à partir de l'équation de regression linéaire de cette droite. Les résultats des effets protecteurs de ces différents composés sont résumés dans le tableau III.

a- Glycérol

Son effet protecteur a été étudié pour des concentrations comprises entre 10 et 40% (v/v). La demi-vie de la G6PD augmente parallèlement à la concentration du glycérol dans l'hémolysat (Figure 11 - 12). L'effet protecteur δ du glycérol à 40% est de 3,65 (voir tableau III). Quant à la PK, l'effet protecteur augmente jusqu'à une valeur de $\delta = 2,45$ et diminue légèrement pour des concentrations en glycérol plus grandes.

b- Saccharose

Etudié à des concentrations comprises entre 5 et 20% (p/v), il possède un effet protecteur très important vis à vis des deux enzymes. Cet effet augmente parallèlement à la concentration du saccharose (Figures 11-12). A la concentration de 20% l'effet protecteur est de 6,2 pour la G6PD et de 9,7 pour la PK (Tableau III).

c- Sorbitol

Comme pour le saccharose, le sorbitol est étudié entre 5 et 20%. Il possède un effet protecteur identique à celui du glycérol, mais plus faible que celui du saccharose. En augmentant la concentration du sorbitol dans l'hémolysat, l'effet protecteur de ce composé augmente: pour une concentration de 20% il est de 3,7 pour la G6PD et pour une concentration de 15% il est de 2,6 pour la PK.

3.2.5 - Acides aminés (Figure 13)

Notre choix a porté sur la β -alanine et le glutamate de sodium car ces deux acides aminés sont très utilisés comme stabilisateurs des protéines.

a- β -alanine

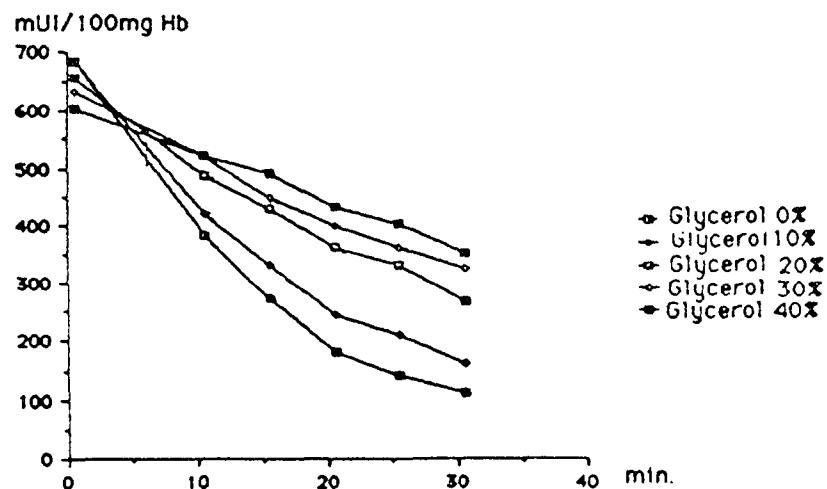
Etudiée à des concentrations comprises entre 0,1 et 0,5 mol/l, son effet protecteur augmente parallèlement à sa concentration dans l'hémolysat. Il est plus important pour la G6PD que pour la PK. La valeur de δ est respectivement de 2,4 et de 1,75 à une concentration de 0,5 mol/l (Tableau III).

b- Glutamate de sodium

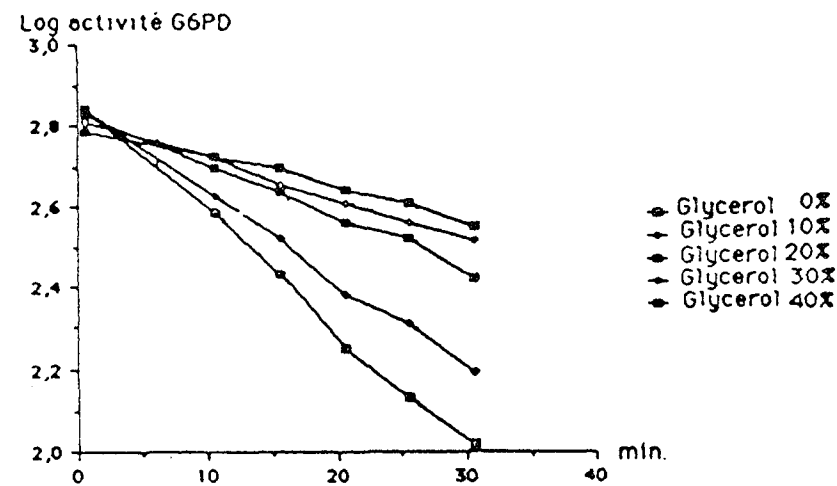
Ce composé est plus connu comme cryoprotecteur des protéines. Nous l'avons étudié à des concentrations comprises entre 0,1 mol/l et 0,5 mol/l. Son effet protecteur augmente parallèlement à la concentration. La valeur de δ à une concentration de 0,5 mol/l est de 4,1 et de 2, respectivement pour la G6PD et pour la PK (Tableau III).

3.2.6 - Dérivés d'acides aminés (Figures 14 - 15)

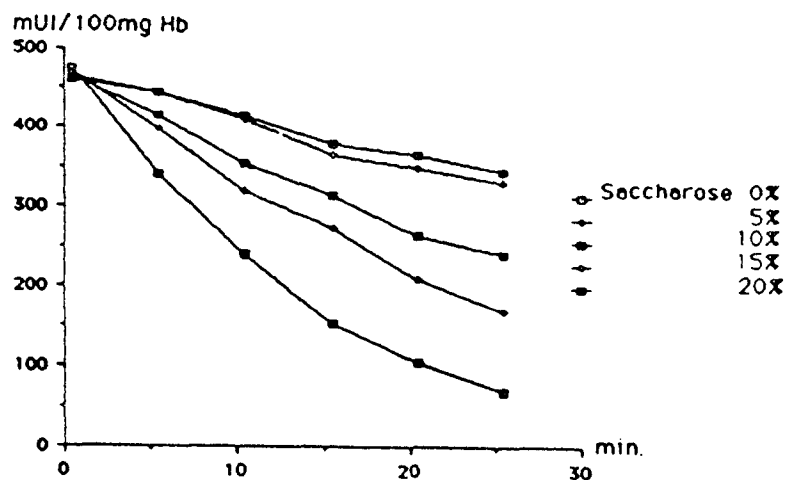
Le triméthylamine-N-oxide (TMAO), la bétaine et la sarcosine ont été utilisés comme cryoprotecteurs (46). Nous les avons étudié à des concentrations comprises entre 0,2 et 1 mol/l. A 50°C et 56°C, la courbe représentant les activités des deux enzymes au cours du temps est exponentielle jusqu'à 20 minutes. On note ensuite une diminution plus rapide de l'activité



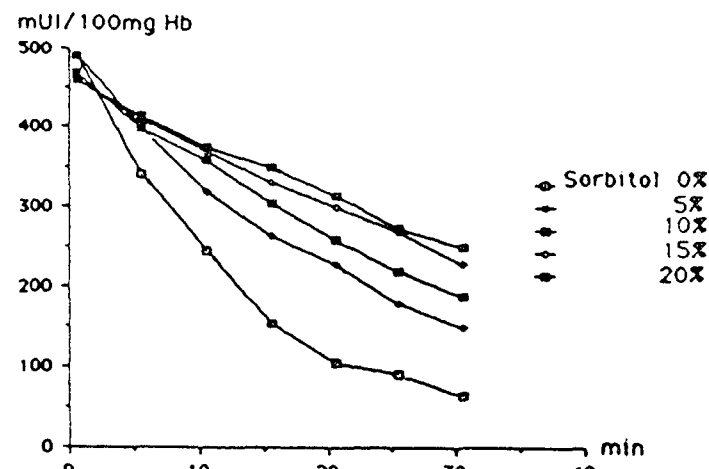
a: Effet du glycerol sur l'activité enzymatique de la G6PD à 50°C.



b: Effet du glycerol sur l'activité enzymatique de la G6PD à 50°C.

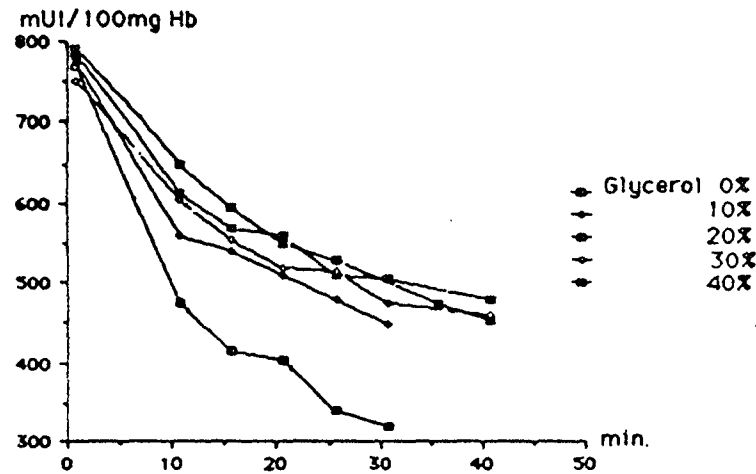


c: Denaturation thermique de la G6PD (50°C-pH6,8). Effet du saccharose à différentes concentrations.

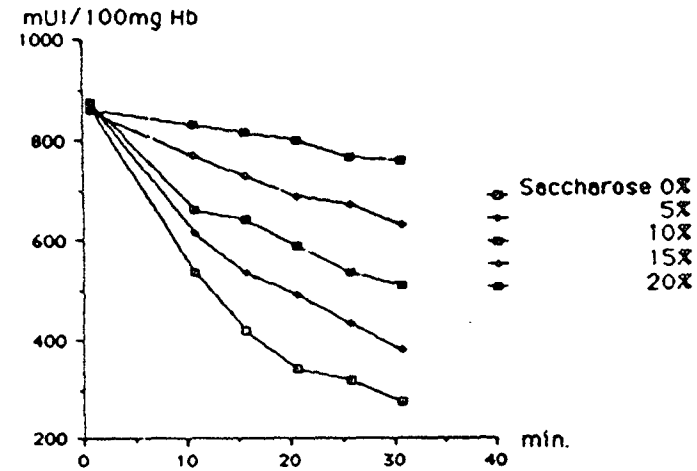


d: Denaturation thermique de la G6PD (50°C-pH6,8). Effet du sorbitol à différentes concentrations.

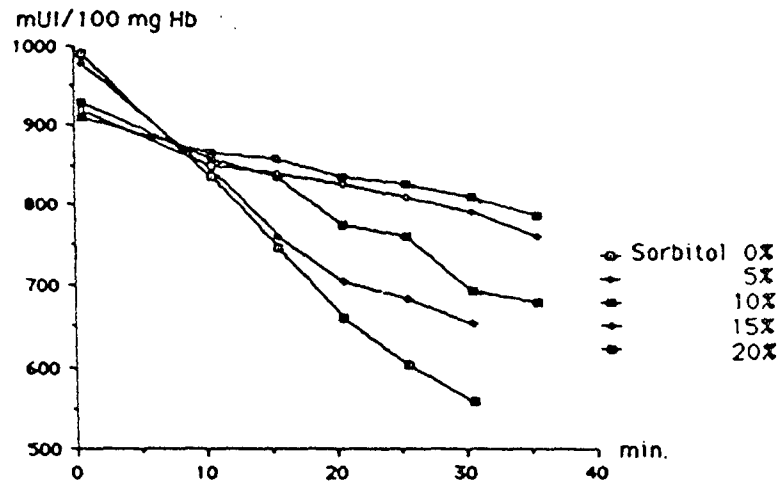
Figure 11 : Activité enzymatique résistante de la G6PD en fonction du temps dans un hémolysat placé à 50°C (pH 6,8). Effet des polyalcools ; a: glycérol, c: saccharose, d: sorbitol. b: Logarithme de l'activité enzymatique en fonction du temps en présence du glycérol.



a: Denaturation thermique de la PK (56°C-pH 6,8).
Effet du Glycerol à différentes concentrations.



b: denaturation thermique de la PK (56°C-pH 6,8).
Effet du saccharose à différentes concentrations.



c: Denaturation thermique de la PK (56°C-pH 6,8).
Effet du sorbitol à différentes concentrations.

Figure 12 : Activité enzymatique résistante de la PK en fonction du temps dans un hémolysat placé à 56°C (pH 6,8). Effet des polyalcools a: glycérol, b: saccharose, c: sorbitol.

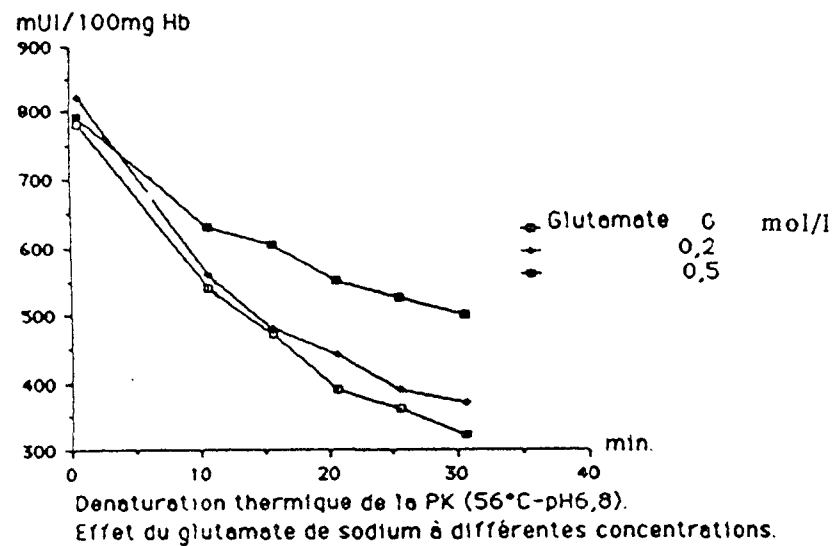
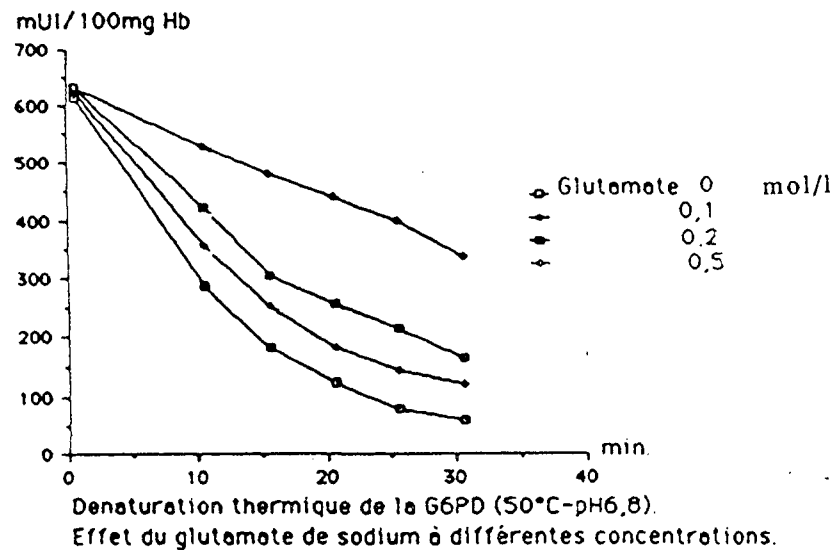
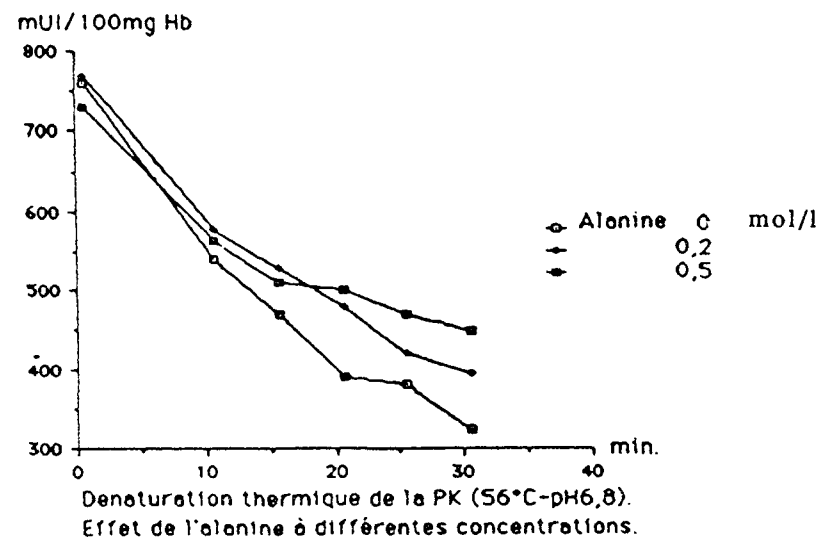
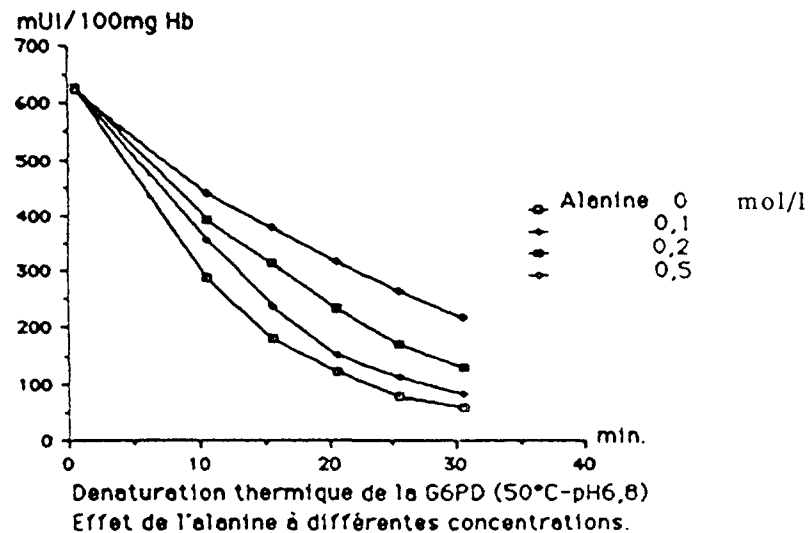


Figure 13 : Activités enzymatiques réstantes de la G6PD et de la PK en fonction du temps dans des hémolysats placés à 50°C (G6PD) et à 56°C (PK). Effet des acides aminés : a-b: alanine , c-d : glutamate de sodium à différentes concentrations.

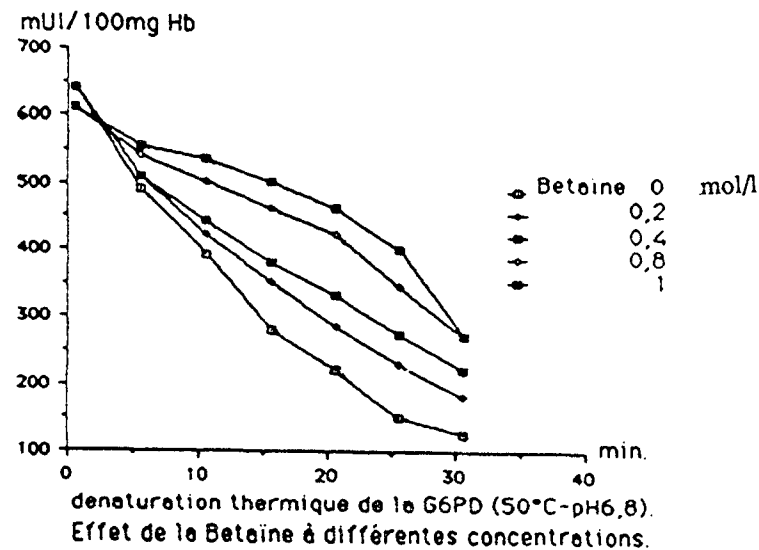
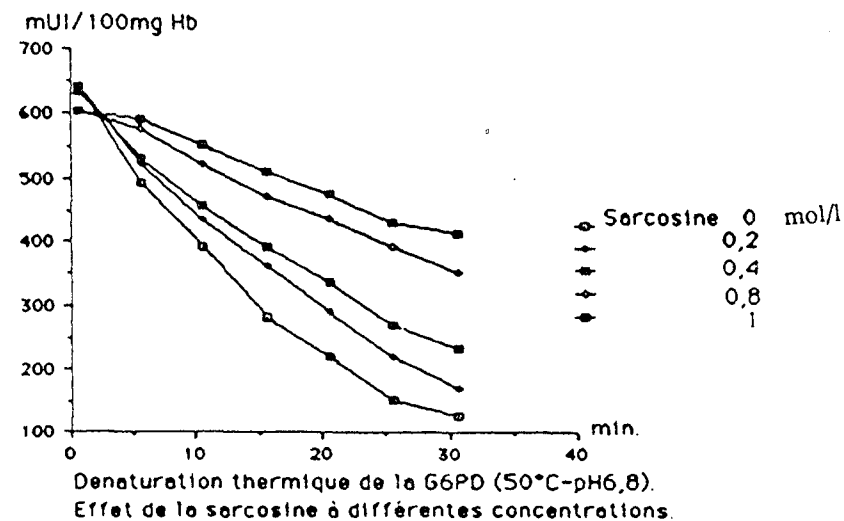
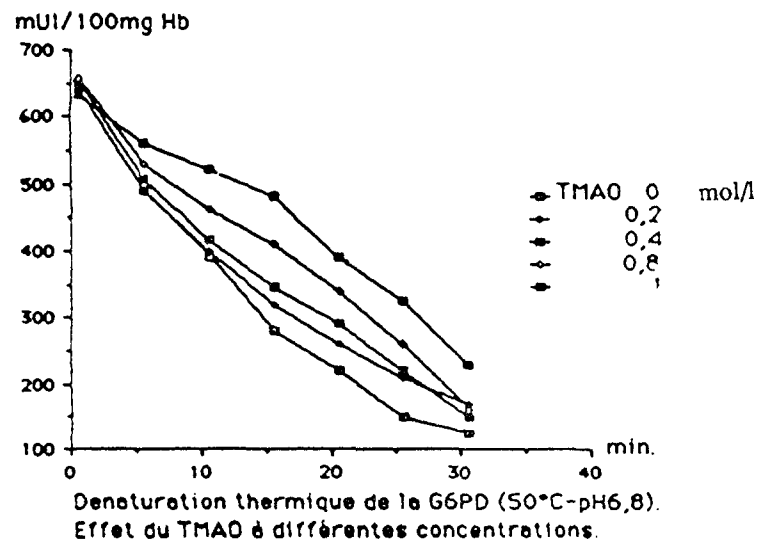


Figure 14 : Activité enzymatique résistante de la G6PD en fonction du temps dans un hémolysat placé à 50°C (pH 6,8). Effet des dérivés d'acides aminés: a: TMAO- b: sarcosine- c: bétaine.

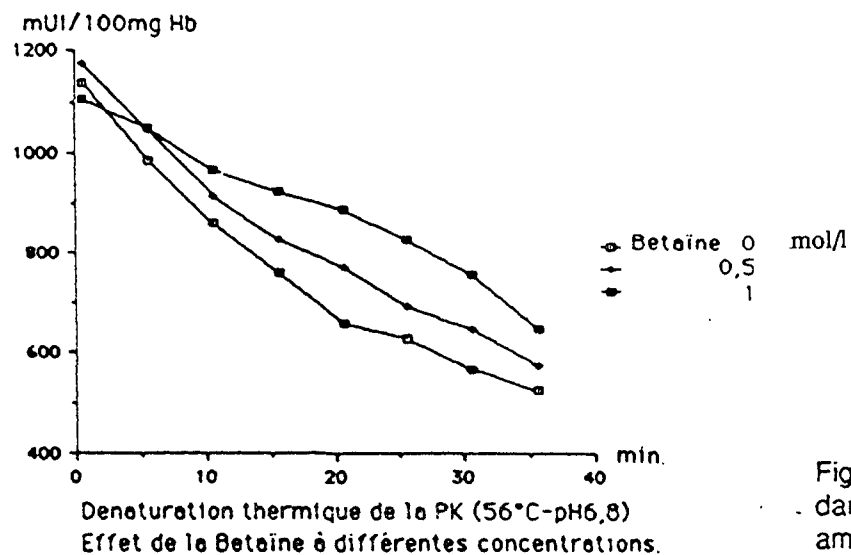
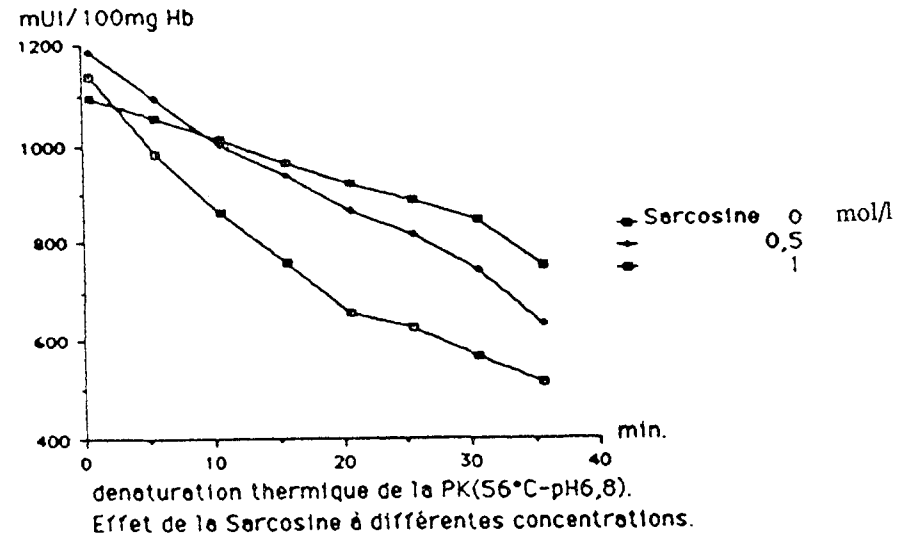
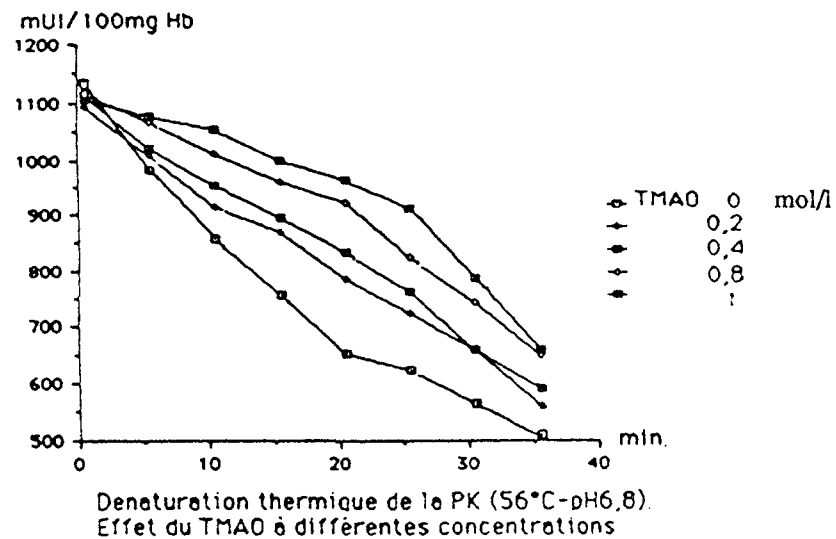


Figure 15 : Activité enzymatique résistante de la PK en fonction du temps dans un hémolysat placé à 56°C (pH 6,8). Effet des dérivés d'acides aminés: a: TMAO- b: sarcosine- c: betaine.

enzymatique. Cela peut être dû soit à une réaction de ces composés avec l'enzyme au cours de la dénaturation, soit à une altération de ces composés soumis, au cours du temps, à des hautes températures.

En présence de ces composés, l'effet protecteur augmente avec la concentration des différents produits. Cet effet est généralement plus important pour la G6PD que pour la PK. La valeur de δ est plus grande avec la sarcosine qu'avec la betaïne, elle même plus grande qu'avec le TMAO (Tableau n° III).

3.2.7 - Polymères et macromolécules (Figures 16-17-18)

Le Dextran 70, le Dextran 500, le polyéthylène glycol 2000, la polyvinylpyrrolidone ou l'albumine bovine sont souvent utilisés dans la conservation des protéines des solutions de contrôles. Nous avons étudié ces composés aux concentrations de 2,5 et de 5%. A 50°C et à 56°C la dénaturation des deux enzymes en présence des polymères est toujours de type exponentiel. Leur effet protecteur δ est faible et voisin de 1. Ces composés ne seront donc pas retenus pour l'étude de la conservation à long terme de ces deux enzymes.

3.2.8- Sels neutres (Figure 19)

Depuis les études de Von Hippel et Wong (212), les sels neutres sont connus comme stabilisateurs des protéines. Notre choix a porté sur le chlorure de sodium et le sulfate d'ammonium.

a- Chlorure de sodium

Nous l'avons étudié à des concentrations comprises entre 1 mol/l et 3 mol/l. Pour la G6PD, l'effet protecteur δ augmente au fur et à mesure qu'on augmente la concentration (jusqu'à 3 mol/l: $\delta = 3,2$). Quant à la PK, l'effet protecteur δ est maximum à une concentration de 1 mol/l ($\delta = 2,5$), puis il diminue aux concentrations plus importantes (Tableau n° III).

b- Sulfate d'ammonium

Nous l'avons étudié à des concentrations comprises entre 0,5 mol/l et 2 mol/l. Pour la G6PD, l'effet protecteur δ augmente jusqu'à 1,5 mol/l ($\delta = 5,5$), il diminue ensuite pour des concentrations plus grandes. Quant à la PK, elle est plus stable à des concentrations plus faibles ; la valeur de δ atteint son maximum à 0,5 mol/l.

3.2.9- Solvants (Figures 20 - 21)

Des composés tels que l'éthylène glycol, le dimethylsulfoxyde (DMSO) ou le diméthylformamide (DMF) n'ont pas d'effet protecteur aux températures de 50°C et 56°C, mais sont connus comme protecteurs à faible température. Nous les avons ainsi testé à 22°C, à différentes concentrations, ainsi que le glycérol. Les hémolysats sont suivis pendant un mois à intervalles de 5 jours.

En présence de DMSO à 50% ou du DMF à 40% il se forme un précipité de protéines dans l'hémolysat. Ainsi nous avons étudié le glycérol, l'éthylène glycol et le DMSO à des concentrations comprises entre 5 et 40 % (v/v), le DMF entre 5 et 30% (v/v).

Au temps t_0 lorsqu'on augmente la concentration de ces composés, l'activité enzymatique diminue légèrement. L'effet protecteur augmente parallèlement à la concentration jusqu'à un maximum. Comme pour les sels neutres, l'effet d'un composé dépend de l'enzyme étudiée. Ainsi, l'effet protecteur du glycérol vis à vis de la G6PD augmente jusqu'à 5,28 à une concentration de 30% (Tableau n° IV) ; pour la PK il atteint un maximum de 3,3 à une concentration de 20% seulement. En présence des autres solvants, la PK peut se conserver avec des concentrations maximales de 30% d'éthylène glycol ($\delta = 2,95$), 20% de DMSO ($\delta = 2,26$), et 20% de DMF ($\delta = 2,3$), alors que la G6PD nécessite des concentrations plus faibles: 20% seulement d'éthylène glycol ($\delta = 4,6$), 10% de DMSO ($\delta = 3$) et 5% de DMF ($\delta = 4,75$).

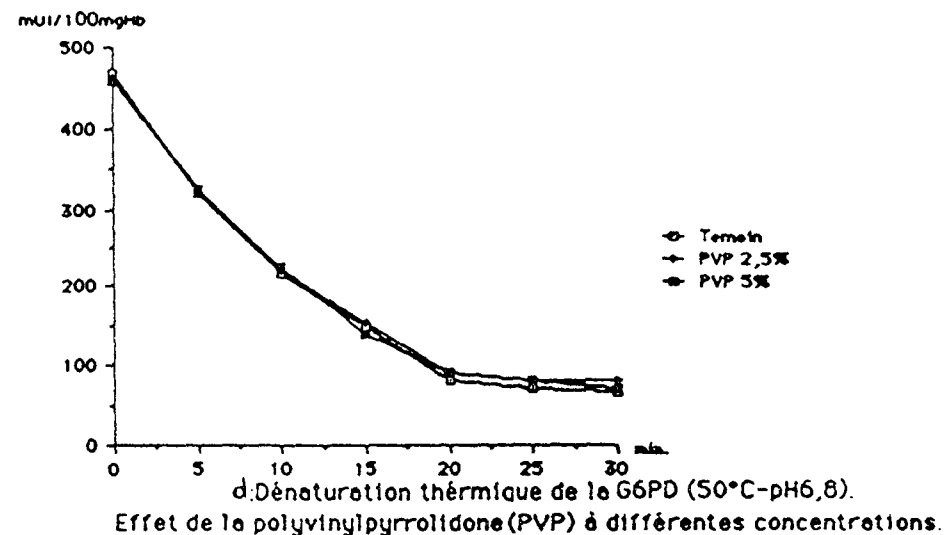
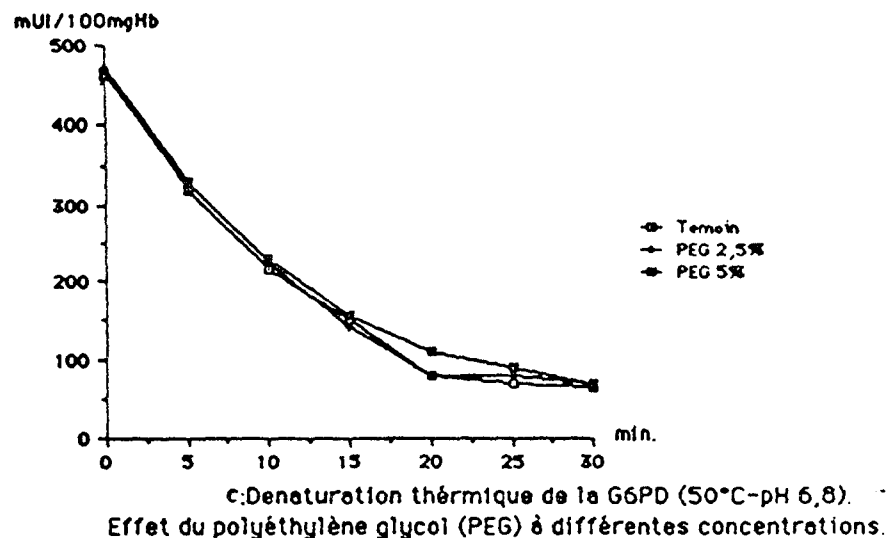
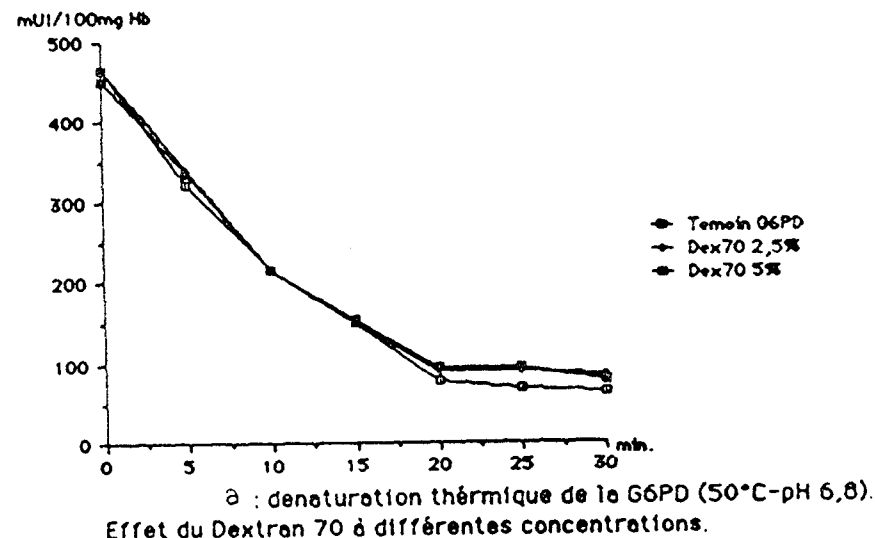
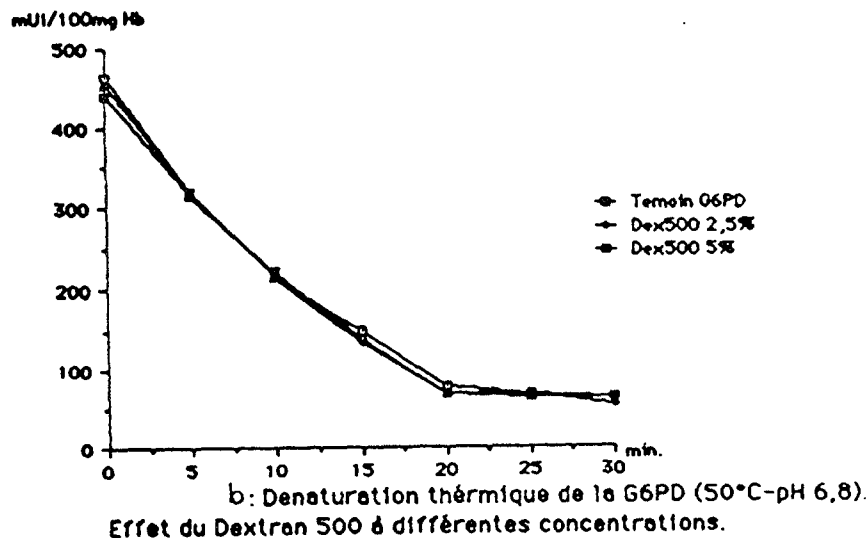


Figure 16 : Activité enzymatique résistante de la G6PD en fonction du temps dans un hémolysat placé à 50°C (pH 6,8). Effet des polyalcools : a: Dextran 70 ; b: Dextran 500 ; c: polyéthylène glycol (PEG) - d: polyvinylpyrrolidone (PVP).

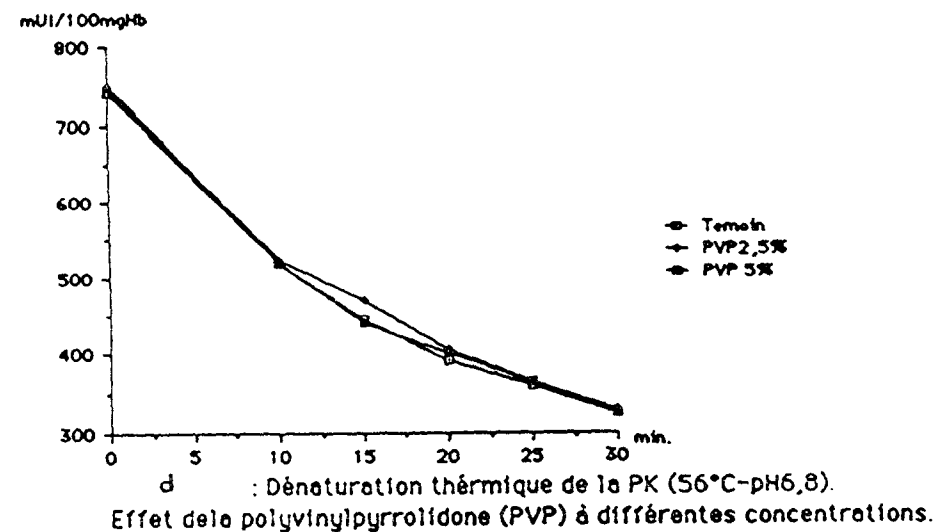
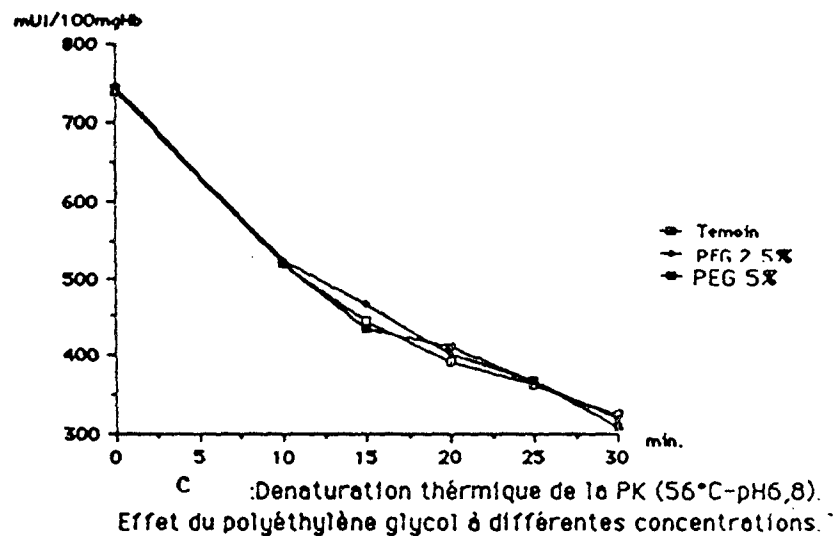
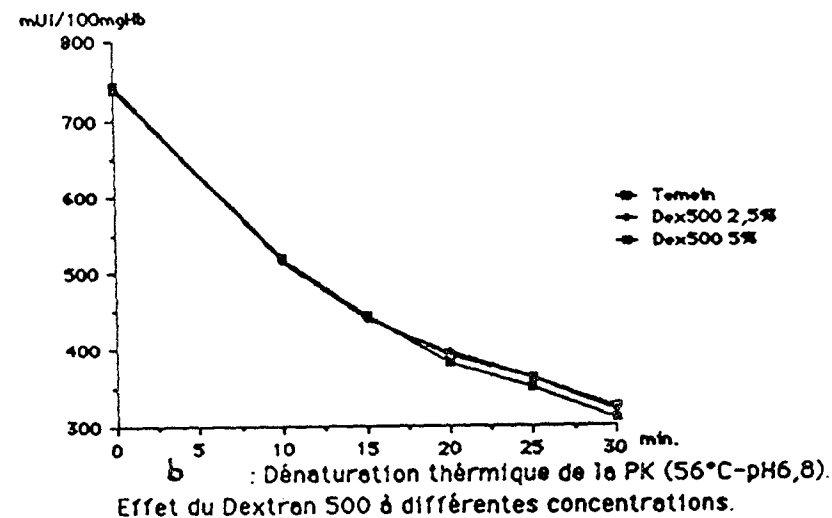
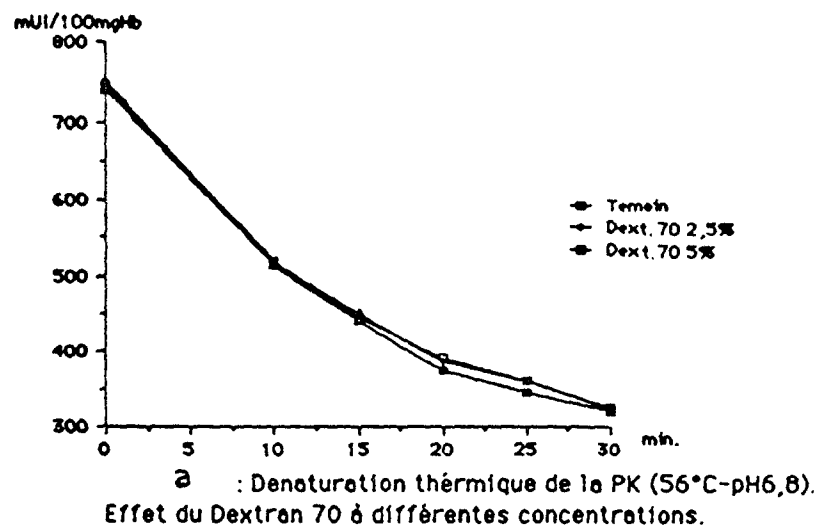


Figure 17 : Activité enzymatique restante de la PK en fonction du temps dans un hémolysat plac4 à 56°C (pH 6,8). Effet des polyalcools : a: Dextran 70 ; b: Dextran 500 ; c: polyéthylène glycol (PEG) - d: polyvinylpyrrolidone (PVP)

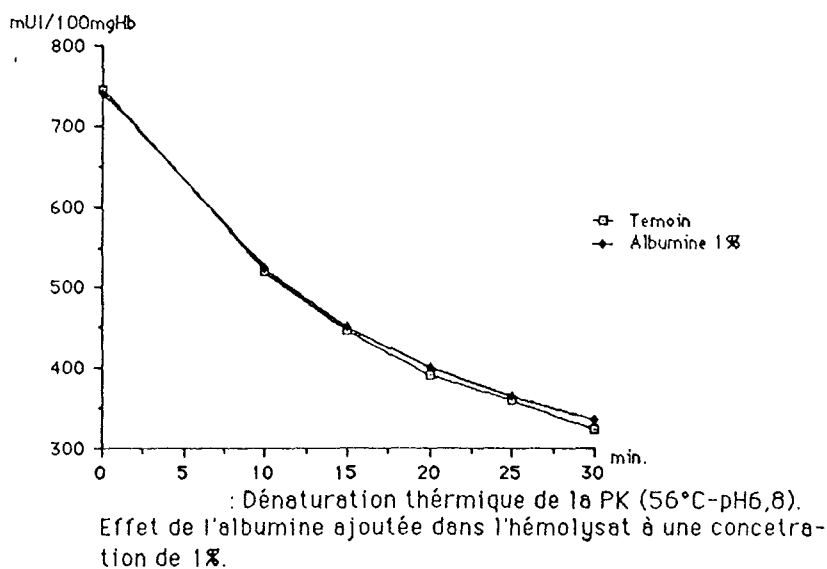
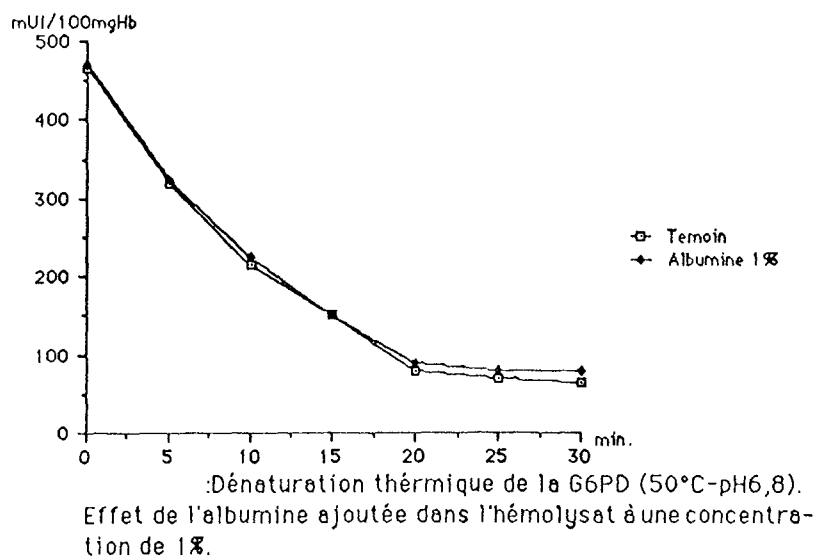
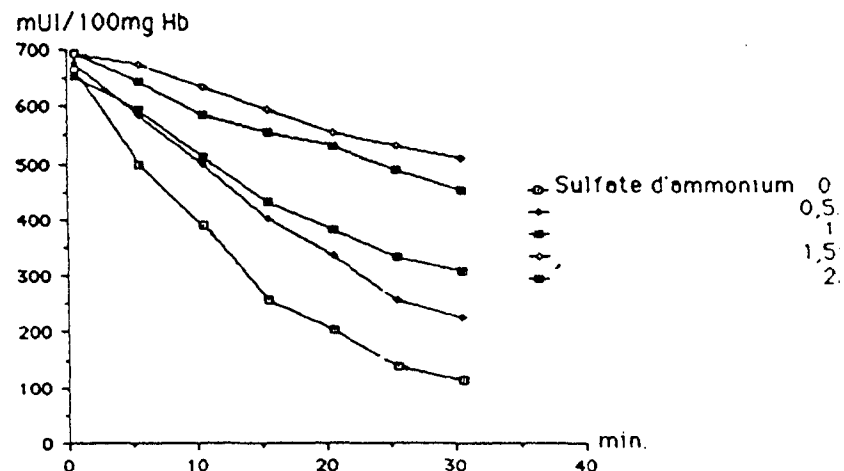
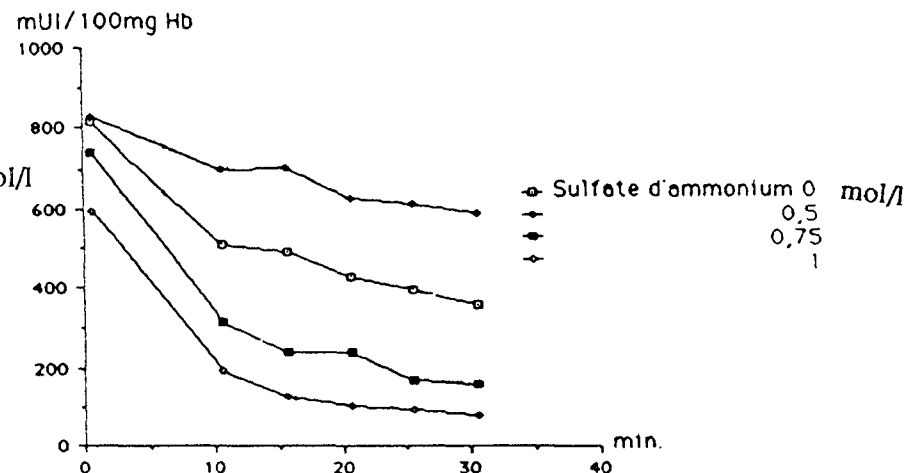


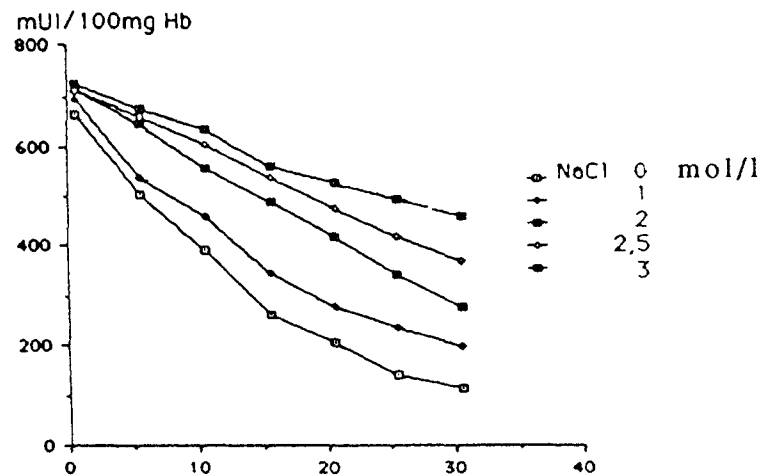
Figure 18 : Activités enzymatiques restantes de la G6PD et de la PK d'un hémolysat en fonction du temps. Effet de l'albumine à différentes concentrations. a: G6PD (50°C, pH 6,8)-b: PK (56°C, pH 6,8).



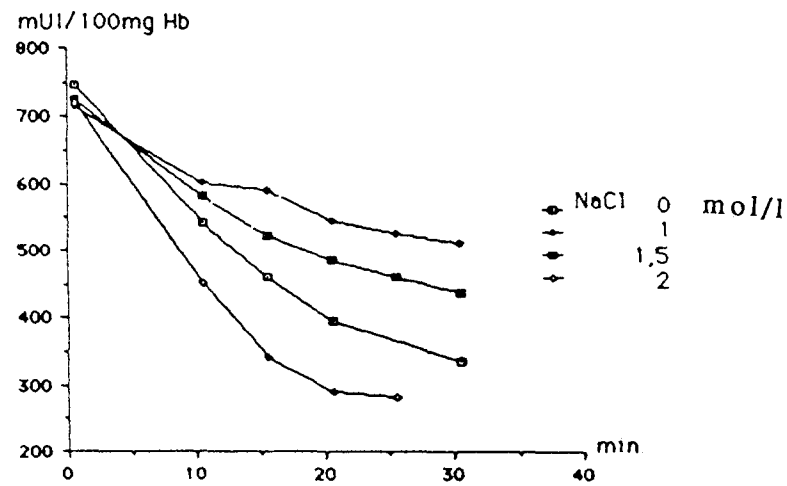
a: Denaturation thermique de la G6PD (50°C-pH6,8).
Effet de du sulfate d'ammonium à différentes concentrations



b: Denaturation thermique de la PK (56°C-pH6,8).
Effet du sulfate d'ammonium à différentes concentrations.

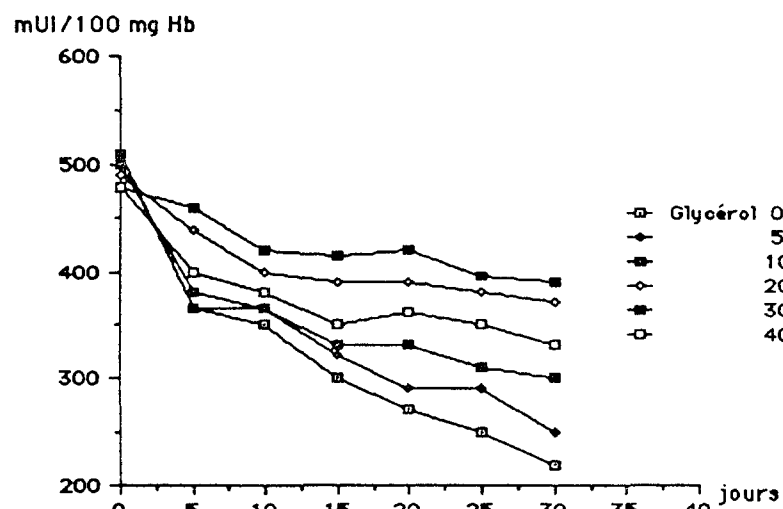


c: Denaturation thermique de la G6PD (50°C-pH6,8).
Effet du chlorure de sodium à différentes concentrations.

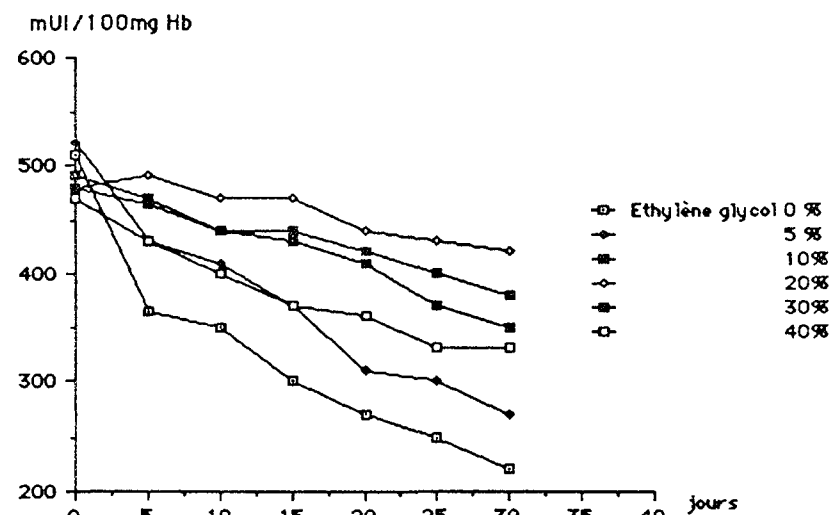


d: Denaturation thermique de la PK (56°C-pH6,8).
Effet du NaCl à différentes concentrations.

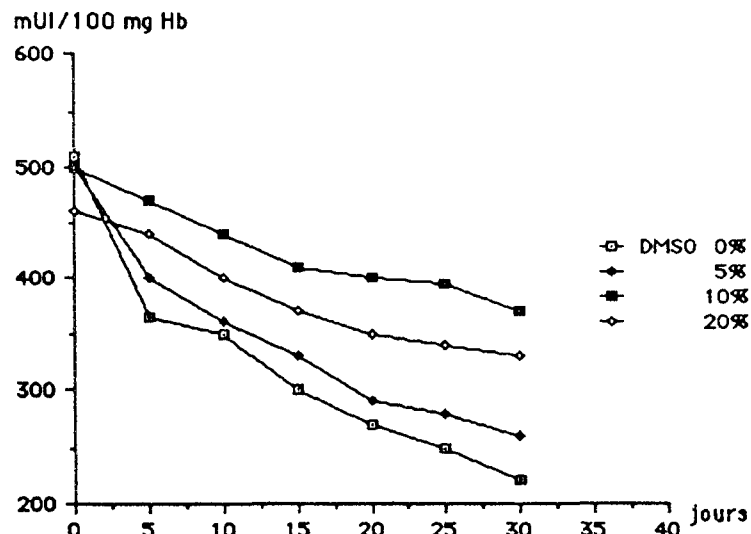
Figure 19 : Activités enzymatiques réstantes de la G6PD et de la PK en fonction du temps dans des hémolysats placés à 50°C (G6PD) et à 56°C (PK). Effet des sels neutres. a-b : sulfate d'ammonium. c-d : chlorure de sodium.



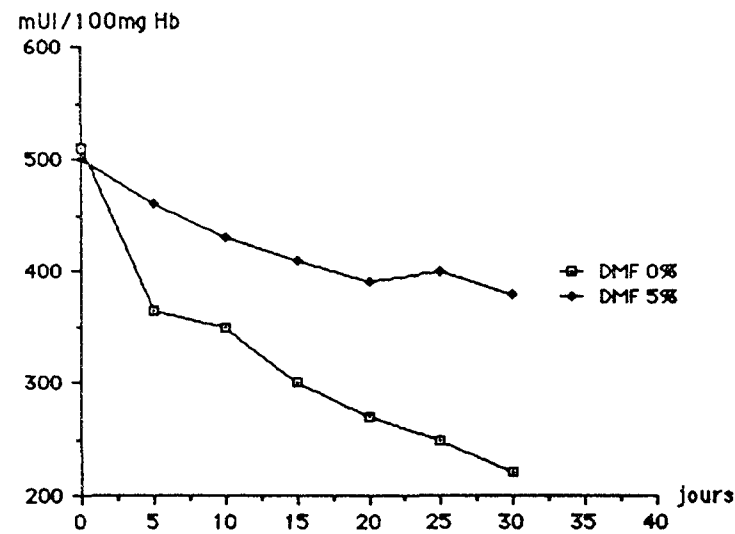
a : Conservation de la G6PD à 22°C en présence de différentes concentrations de glycérol.



b : Conservation de la G6PD à 22°C en présence d'éthylène glycol à différentes concentrations.

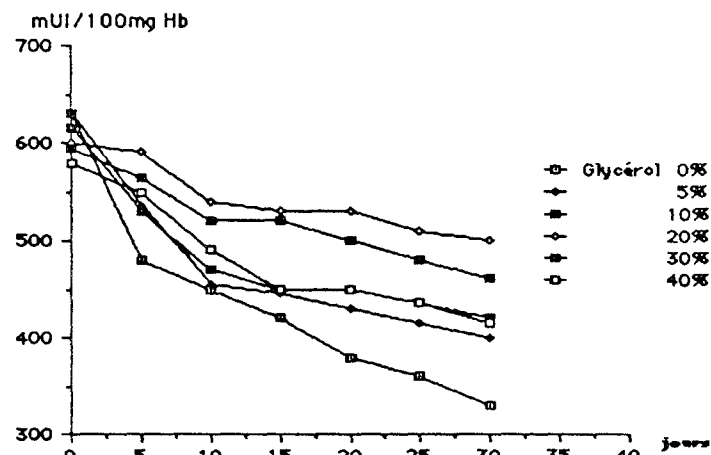


c : Conservation de la G6PD à 22°C en présence de DMSO à différentes concentrations.

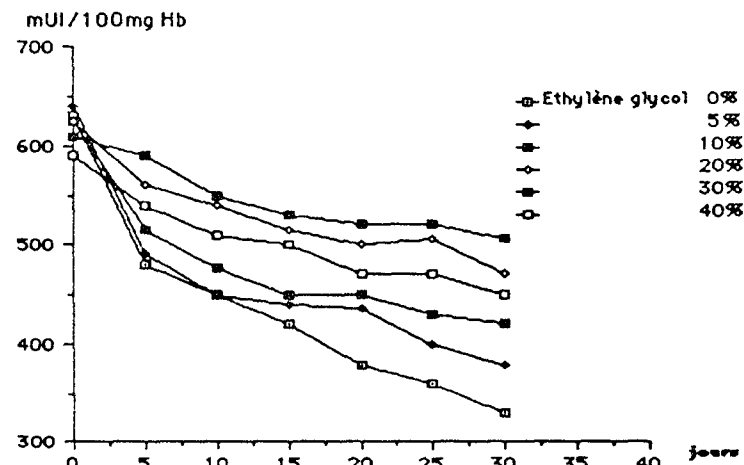


d : Conservation de la G6PD à 22°C en présence du DMF à différentes concentrations.

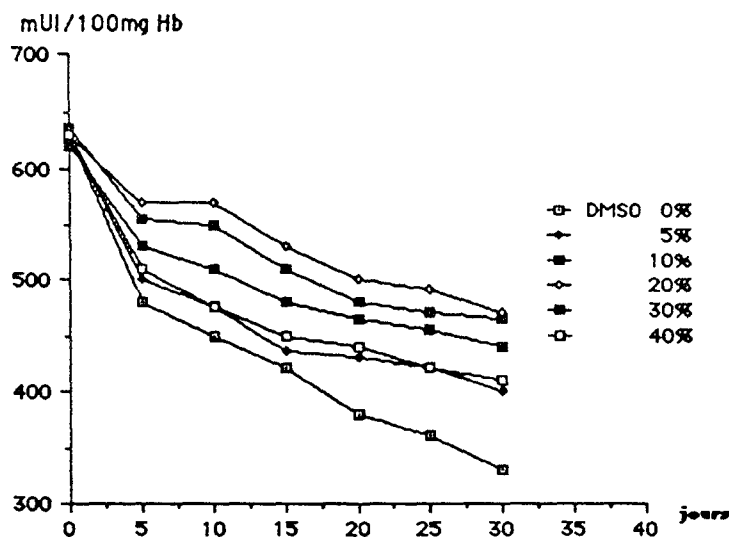
Figure 20 : Activité enzymatique restante de la G6PD en fonction du temps dans un hémolysat placé à 22°C. a: glycérol ; b : éthylène glycol ; c : DMSO ; d : DMF.



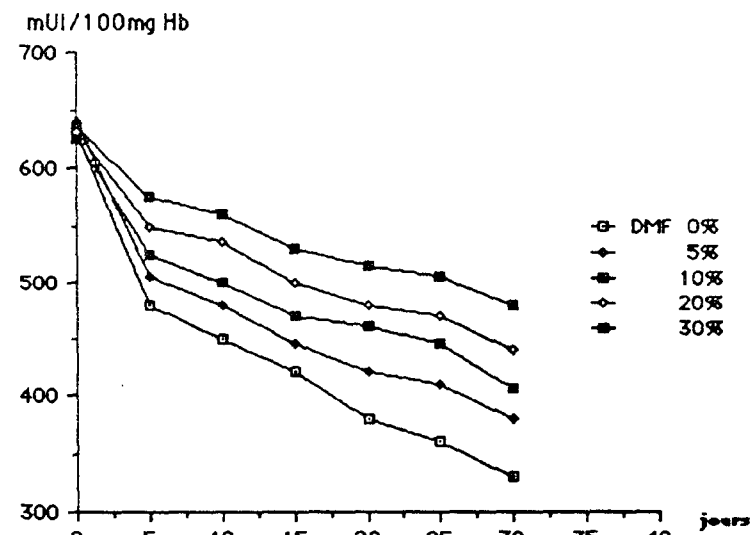
a : Conservation de la PK à 22°C en présence de différentes concentrations de glycérol.



b : Conservation de la PK à 22°C en présence de différentes concentrations d'éthylène glycol.



c : Conservation de la PK à 22°C en présence de différentes concentrations de DMSO.



d : Conservation de la PK à 22°C en présence de différentes concentrations de DMF.

Figure 21: Activité restante de la PK en fonction du temps dans un hémolysat placé à 22°C. Effet des solvants : a : glycérol ; b : éthylène glycol ; c : DMSO ; d : DMF.

Protecteurs		Effet protecteur δ de la G6PD à 50°C pH 6,8	Effet protecteur δ de la PK à 56°C pH 6,8
Glycérol	0%	1	1
	10%	1,25	1,75
	20%	2,1	2,45
	30%	2,7	2,45
	40%	3,65	2,30
Saccharose	0%	1	1
	5%	1,87	1,5
	10%	2,75	2,3
	15%	5,15	4,3
	20%	6,2	9,7
Sorbitol	0%	1	1
	5%	1,85	1,6
	10%	2,5	2,15
	15%	3,3	2,6
	20%	3,7	2,4
Alanine	0 mol/l	1	1
	0,1	1,25	
	0,2	1,6	1,27
	0,5	2,4	1,75
Glutamate de sodium	0 mol/l	1	1
	0,1	1,35	
	0,2	1,8	1,05
	0,5	4,1	2
TMAO	0 mol/l	1	1
	0,2	1,2	1,2
	0,4	1,2	1,65
	0,8	1,4	1,5
	1	2	1,65
Betaïne	0 mol/l	1	1
	0,2	1,3	
	0,4	1,5	
	0,5		1,4
	0,8	2,3	
	1	2,6	3,5
Sarcosine	0 mol/l	1	1
	0,2	1,3	
	0,4	1,65	
	0,5		1,8
	0,8	3,1	
	1	4,3	4
NaCl	0 mol/l	1	1
	1	1,4	2,5
	1,5		1,6
	2	2,0	0,65
	2,5	2,75	
	3	3,8	
(NH ₄) ₂ SO ₄	0 mol/l	1	1
	0,5	1,65	2,65
	0,7		0,45
	1	4,35	0,25
	1,5	5,5	
	2	2,35	

Tableau n°III : Effet protecteur (δ) de différents composés sur l'activité catalytique de la G6PD (50°C - pH 6,8) et de la PK (56°C - pH 6,8).

Composés protecteurs		Effet protecteur δ de la G6PD à 22°C	Effet protecteur δ de la PK à 22°C
Glycérol	0%	1	1
	10%	2,80	1,41
	20%	4,38	3,30
	30%	5,28	2,13
	40%	2,27	1,70
Ethylène glycol	0%	1	1
	10%	2,16	1,65
	20%	4,07	2,45
	30%	4,60	2,95
	40%	2,58	1,81
DMSO	0%	1	1
	5%	1,26	1,4
	10%	3,02	1,53
	20%	2,35	1,26
	30%		2,07
	40%		1,4
DMF	0%	1	1
	5%	4,75	1,14
	10%		1,9
	20%		2,3
	30%		1,5

Tableau n° IV: Effets protecteurs (δ) du glycérol, ethylène glycol, DMSO et DMF à 22°C.

3.2.10- Discussion

A la suite de cette première approche, parmi les composés testés, nous pouvons distinguer deux catégories de protecteurs:

Les premiers, utilisés à faible concentration, sont les substrats, les coenzymes, les composés réducteurs et les composés métalliques ; Ces composés ont la particularité d'agir au niveau du site actif de l'enzyme, c'est le cas des substrats, des coenzymes et des composés métalliques. Les composés réducteurs, quant à eux, agissent sur d'autres sites de l'enzyme en empêchant l'oxydation de certains groupes nécessaires à la stabilité de l'enzyme. Parmi les composés étudiés *seuls le NADP possède une action protectrice de la G6PD. Le PEP, l'ADP et le glutathion réduit ont une action protectrice de la PK.*

Dans le deuxième groupe, nous avons regroupé les polyalcools, les acides aminés et leurs dérivés, les polymères, les sels neutres et les solvants. Ces composés sont utilisés à des concentrations relativement fortes. Seuls les polymères n'ont pas d'effet protecteur aux concentrations étudiées. L'effet protecteur des autres composés augmente parallèlement à leur concentration jusqu'à un maximum. Leur mode d'action est encore inconnu et mal défini. Il peut s'expliquer selon les auteurs soit par l'augmentation de l'hydratation des protéines, soit par la variation de certains paramètres tels que la tension de surface ou la constante diélectrique, soit par une augmentation de la cohésion de l'eau située autour des protéines (9, 58, 74).

Ces composés ont généralement une action protectrice plus importante pour la G6PD que pour la PK et les deux enzymes nécessitent souvent des concentrations différentes de protecteurs pour une stabilité maximale. En effet la G6PD nécessite des concentrations en sels neutres et en glycérol plus grandes que celles de la PK. Inversement, le DMSO, le DMF et l'éthylène glycol agissent à des concentrations plus grandes pour la PK que celles nécessitées par la G6PD. Cette différence peut être due d'une part à la nature des deux enzymes, la G6PD étant très hydrophile, la PK hydrophobe et d'autre part à la nature des composés

protecteurs : les sels neutres et le glycerol très hydrophiles agissent plus particulièrement sur la G6PD alors que le DMSO, le DMF et l'éthylène glycol plus hydrophobes agissent à plus grandes concentrations sur la PK.

A des concentrations supérieures à celles donnant une stabilité maximale les enzymes subissent une dénaturation dès le temps t_0 . Dans le cas des sels neutres cette dénaturation, comme l'expliquent Arakawa et Timascheff (6, 7, 9), se fait par agrégation afin de réduire la surface de contact avec le sel exclu par la protéine. Les solvants, quant à eux, vont s'attacher directement aux groupements hydrophobes des protéines. En augmentant leur concentration en solution, la protéine maintient une large hydratation et un nombre de sites hydrophobes relativement faible. Ce phénomène est thermodynamiquement non favorable car la différence entre la composition du solvant dans le domaine immédiat des protéines et celle du reste du solvant devient très importante. Il en résulte soit une séparation de la phase solide amorphe de la protéine de la phase eau/solvant organique (agrégation), soit une dénaturation totale de la protéine.

La différence de composition en acides aminés hydrophiles et hydrophobes entre les deux enzymes explique la variation des concentrations en sels neutres et en solvants utilisées pour la stabilisation de chaque enzyme.

Ainsi nous pouvons retenir de cette étude que les concentrations suivantes présentent les effets protecteurs les plus importants:

- *pour la conservation de la G6PD : le glycerol 30%, l'éthylène glycol 20%, le DMSO 10%, le DMF 5%, le NaCl 2 mol/l ou le sulfate d'ammonium 1 mol/l.*

- *pour la conservation de la PK : le glycerol 20%, l'éthylène glycol 30%, le DMSO 15-20%, le DMF 10-20%, le NaCl 1 mol/l ou le sulfate d'ammonium 0,5 mol/l.*

- pour la conservation de la G6PD et la PK ensembles : le saccharose 20%, le sorbitol 20%, le TMAO 1 mol/l, la sarcosine 1 mol/l, la bétaine 1 mol/l, l'alanine 0,5 mol/l ou le glutamate de sodium 0,5 mol/l.

Après avoir testé ces composés protecteurs aux températures de 22°C, 50°C et 56°C, nous avons dans un deuxième temps étudié les effets protecteurs de ces produits à long terme à +4°C et à -20°C.

3.3 - STABILITE A LONG TERME

Les composés protecteurs agissant à faible concentration comme les substrats, les coenzymes et les composés réducteurs sont combinés aux protecteurs agissant à fortes concentrations et ajoutés ensemble à un hémolysat comportant une concentration finale d'hémoglobine de 30 g/l.

Dans le deuxième groupe de protecteurs, certains composés agissent à des concentrations différentes pour la G6PD et la PK, d'autres procurent une stabilité maximale aussi bien pour la G6PD que pour la PK à des concentrations identiques. Ainsi, nous avons préparé des solutions destinées à la conservation de l'une des deux enzymes uniquement ainsi que des solutions destinées à la conservation des deux enzymes ensemble dans le même hémolysat.

Pour la conservation de la G6PD, les solutions suivantes sont préparées aux concentrations finales indiquées ci-après :

- Glycérol	30 % +	NADP ⁺ 0,5 mmol/l
- Ethylène glycol	20 % +	"
- DMSO	10 % +	"
- DMF	5 % +	"

Pour la conservation de la PK, nous avons préparé les solutions suivantes :

- Glycérol	20 % +	PEP 0,5mmol/l +	Glutathion réduit 0,1 mmol/l
- Ethylène glycol	30 % +	" +	"
- DMSO	15 % +	" +	"
- DMF	10 % +	" +	"

Les solutions destinées à la conservation des deux enzymes comportent simultanément du NADP⁺ 0,5 mmol/l, du PEP 0,5 mmol/l et du glutathion réduit 0,1 mmol/l. Elles sont préparées

en présence de l'un des composés protecteurs suivants: Saccharose 20%, Sorbitol, 20%, TMAO 1 mol/l, Sarcosine 1 mol/l, Betaine 1 mol/l, Alanine 0,5 mol/l ou Glutamate de sodium 0,5 mol/l.

Nous avons de plus étudié deux acides aminés connus essentiellement comme cryoprotecteurs: la proline 0,5 mol/l et l'aspartate de magnésium 0,5 mol/l.

Ces hémolysats comportants les protecteurs sont stérilisés (voir matériels et méthodes) puis placés à des températures de -20°C et $+4^{\circ}\text{C}$. Les activités enzymatiques G6PD et PK sont mesurées pendant 12 mois de conservation en même temps que celles d'un hémolysat témoin sans conservateur. Les résultats des dosages sont présentés sous forme de courbes, chaque valeur correspond à la moyenne de 3 dosages.

Les hémolysats comportants les sels neutres et le DMF 10% deviennent turbides après 4 mois de conservation et montrent une concentration très importante de méthémoglobine (supérieure à 45%) à $+4^{\circ}\text{C}$ et à -20°C . Ce ne sont pas des conservateurs de l'hémoglobine contrairement aux autres produits. Aussi l'étude de la conservation des activités enzymatiques en présence de ces additifs a été interrompue, la solution de contrôle présentant une coloration inappropriée.

3.3.1- Solution de contrôle de la G6PD

La G6PD d'un hémolysat témoin sans conservateur montre une diminution exponentielle d'activité enzymatique en fonction du temps à $+4^{\circ}\text{C}$ et à -20°C (Figure 22). L'enzyme est plus stable en solution congelée à -20°C (demi-vie= 190 jours) qu'en solution liquide à $+4^{\circ}\text{C}$ (demi-vie= 100 jours).

Les hémolysats contenant les conservateurs sont placés par lots à $+4^{\circ}\text{C}$ et à -20°C . Seul l'hémolysat contenant du glycerol 30% est sous forme liquide à -20°C . Les autres hémolysats préparés en présence d'éthylène glycol 20%, du DMSO 10% ou du DMF 5% placés à -20°C sont sous forme congelée. Ces solutions présentent

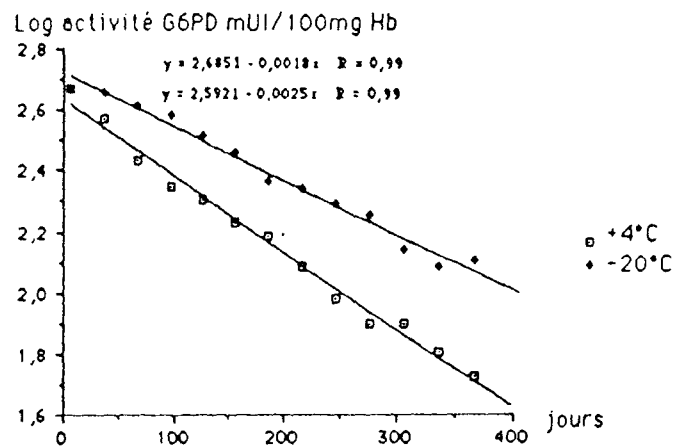
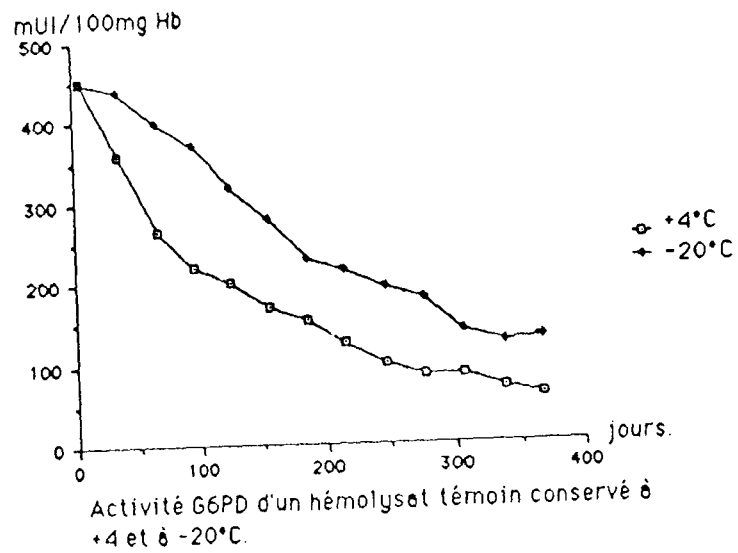


Figure 22 : a : activité en fonction du temps de la G6PD d'un hémolysat sans conservateur à +4°C et à -20°C. b : logarithme de l'activité enzymatique en fonction du temps.

un point de congélation très bas et se décongèlent très rapidement à température ambiante.

a- Glycerol - Ethylène glycol - DMSO (Figure 23) :

Les résultats des dosages enzymatiques de la G6PD au cours du temps dans les hémolysats comportants le glycérol 30%, l'éthylène glycol 20% ou le DMSO 10% et en présence du NADP⁺ 0,5 mmol/l sont présentés sur la figure 23 (a-b-c).

A -20°C ces hémolysats montrent une activité stable. Les valeurs d'activité enzymatique obtenues au cours des 13 mois de conservation sont incluses dans le domaine de stabilité que nous avons défini comme étant égal à la valeur de l'activité initiale obtenue au temps zéro plus ou moins deux fois l'écart-type caractérisant la reproductibilité de la méthode du dosage. Dans le tableau V nous montrons par étude de régression linéaire que la pente de régression (a) est très proche de zéro. Ces hémolysats conservés à -20°C ne présentent donc pas de variation significative d'activité enzymatique (au risque de 5%) après 13 mois de conservation.

A +4°C l'enzyme est moins stable qu'à -20°C. On observe sur les graphiques une diminution significative de l'activité enzymatique à partir de 7 à 8 mois de conservation. Dans le tableau n°III nous montrons par étude de régression linéaire qu'il n'y a pas de variation significative pendant 7 mois de conservation (au risque de 5%). Au delà de cette période on constate une diminution significative d'activité.

b- DMF (Figure 23) :

En présence du DMF 5% et du NADP 0,5 mmol/l, plusieurs protéines de l'hémolysat dont l'hémoglobine sont dénaturées après congélation à -20°C. La solution devient trouble et l'activité G6PD est très faible après décongélation.

Cependant cet hémolysat conservé à +4°C reste homogène et ne présente pas de turbidité au cours des 13 mois de conservation. Sur les graphiques on observe des valeurs très

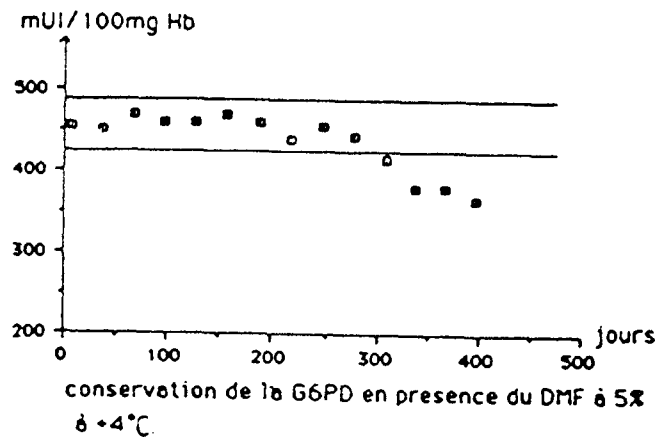
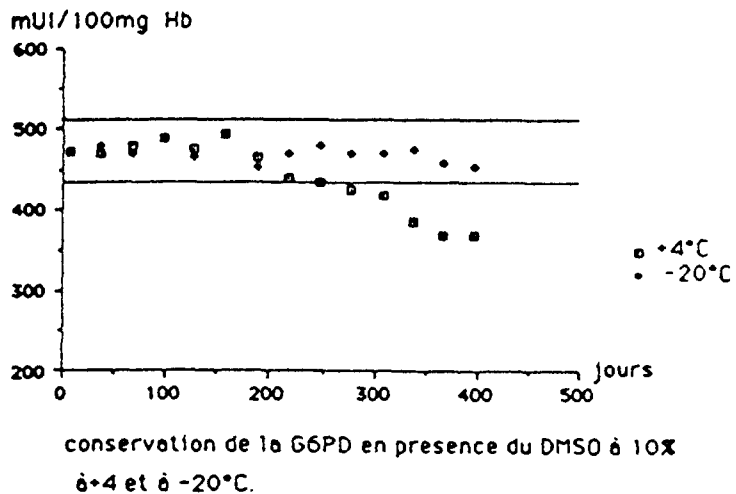
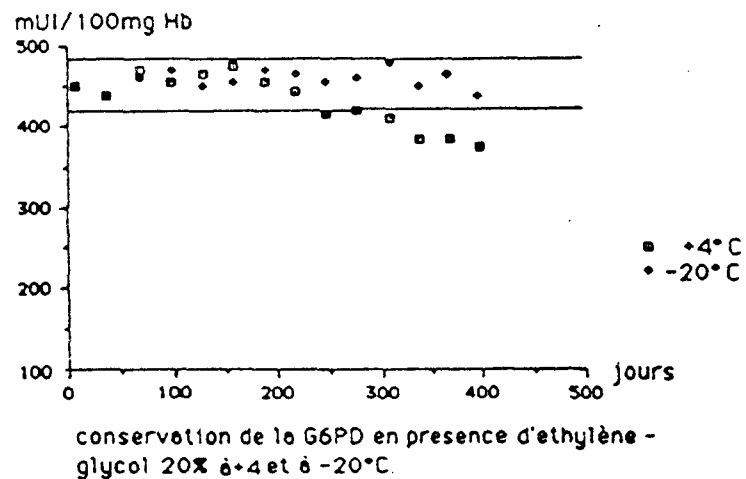
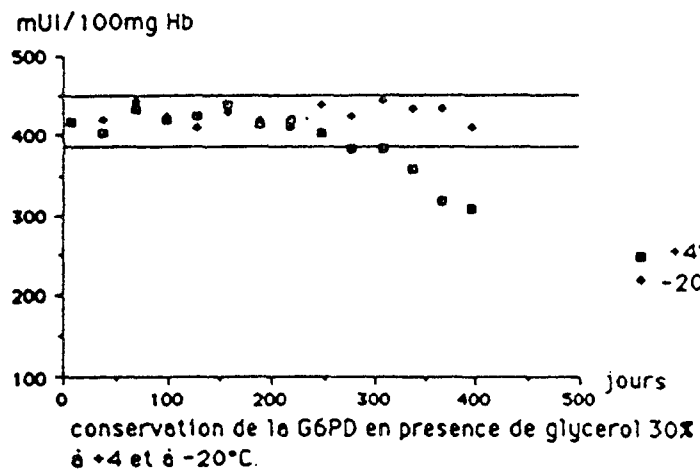


Figure 23 : conservation à long terme à +4°C et à -20°C de la G6PD d'un hémolysat comportant : a: glycérol 30% + NADP+ 0,5mM ; b: éthylèneglycol 20% + NADP+ 0,5mM ; c: DMSO 10% + NADP+ 0,5mM ; d: DMF 5% + NADP+ 0,5mM.

protecteur	température	durée de conser- vation (mois)	moyenne (m) mUI/100 mg Hb	écart- type (m)	penle(a)	écart- type(a)	p=0,0
Glycérol	4°C	13	385	41	-0,27	0,052	n.st
"	"	7	414	11	0	0,062	st
"	-20°C	13	417	12	0,003	0,028	st
Ethylène- glycol	4°C	13	422	34	-0,235	0,039	n.st
"	"	7	450	12	-0,002	0,066	st
"	-20°C	13	450	11,3	0,003	0,026	st
DMSO	4°C	13	430	50	-0,355	0,048	n.st
"	"	7	465	17,3	-0,123	0,082	st
"	-20°C	13	463	13,5	-0,057	0,026	st
DMF	4°C	13	420	55	-0,352	0,076	n.st
"	"	9	450	11,8	-0,055	0,041	st

Tableau n°V: Conservation de la G6PD érythrocytaire dans l'hémolysat en présence des solvants (Glycérol 30%, Ethylène-glycol 20%, DMSO 10%, DMF 5%) à +4°C et à -20°C. Estimation de la stabilité par régression linéaire. st= stable ; n.st= non stable.

faibles à partir du 10^e mois de conservation. Dans le tableau n°V l'étude par régression linéaire confirme ces résultats en montrant une diminution significative d'activité enzymatique après 13 mois de conservation. Par contre pendant les 9 premiers mois cette variation n'est pas significative (au risque de 5%).

c- Recherche de la méthémoglobine

Les résultats du dosage de la méthémoglobine après 13 mois de conservation à +4°C et à -20°C sont présentés dans le tableau n°VI. Toutes les solutions, à l'exception du DMF 5%, montrent des proportions très faibles de méthémoglobine et gardent ainsi l'aspect d'un hémolysat frais.

	Méthémoglobine (%)	
	+4°C	-20°C
Temoin	54,5	47,5
Glycérol 30%	4,5	1
Ethylène glycol 20%	6,5	1
DMSO 10%	9	6
DMF 5%	53	

Tableau n°VI: Taux de méthémoglobine (en %) obtenus dans les différents hémolysats après 13 mois de conservation à +4°C et à -20°C.

Les hémolysats comportants le glycérol 30%, l'éthylène glycol 20% ou le DMSO 10%, préparés en présence du NADP 0,5 mmol/l, gardent une activité G6PD stable pendant 13 mois de conservation à -20°C et jusqu'à 7 mois à +4°C. Ces solutions gardent un taux faible de méthémoglobine au cours de toute la

période de conservation. En présence du DMF 5% l'hémolysat montre une activité G6PD stable pendant 9 mois à +4°C et un taux de méthémoglobine identique au témoin sans protecteur.

3.3.2- Solution de contrôle de la PK:

Les concentrations en glycérol, éthylène glycol et DMSO utilisées pour la conservation de la PK sont différentes de celles utilisées pour la G6PD. En effet nous avons observé, contrairement à la G6PD que la PK se montre plus stable dans les hémolysats comportants des concentrations plus faibles en glycérol et en présence de plus grandes concentrations d'éthylène glycol et de DMSO. Ces solutions ont été placées à +4°C et à -20°C pour une conservation à long terme en même temps qu'un hémolysat témoin sans conservateur. Seul l'hémolysat comportant 30% d'éthylène glycol est sous forme liquide à -20°C. Les autres hémolysats en présence de glycerol 20% ou de DMSO 15% sont sous forme congelée ; leurs points de congélation très bas leur permettent de devenir liquides quelques minutes après la sortie du congélateur.

a- Stabilité de la PK en l'absence de protecteurs

Contrairement à la G6PD, cette enzyme est moins stable à -20°C qu'à +4°C dans l'hémolysat témoin en l'absence de protecteurs. Elle présente une demi-vie de 5 mois et demi à -20°C et de 8 mois à +4°C (figure 24).

b - Glycérol (Figure 25) :

Les résultats de l'activité de la PK en fonction du temps dans l'hémolysat comportant le glycérol 20%, le PEP 0,5 mmol/l et du glutathion réduit 0,1 mmol/l sont présentés sur le graphique 25 a. Dans le tableau n°VII nous montrons par l'étude de régression linéaire qu'à -20°C il n'y a pas de variation significative (au risque de 5%) d'activité enzymatique au cours des 12 mois d'étude. Par contre à +4°C on montre une diminution significative à partir du 9^e mois de conservation.

c - Ethylène glycol (Figure 25)

L'hémolysat comportant l'éthylène glycol 30%, du PEP 0,5 mmol/l et du glutathion réduit 0,1 mmol/l présente une stabilité de la PK identique à celle en présence du glycérol à +4°C et à -20°C. Le tableau n°VII montre que l'hémolysat conservé à -20°C ne présente pas de variation significative d'activité au cours des 12 mois de conservation, alors qu'à +4°C une diminution significative est observée à partir de 9 mois de conservation seulement.

d - DMSO (Figure 25) :

Le DMSO 15% associé au PEP 0,5 mmol/l et au glutathion réduit 0,1 mmol/l est aussi un bon protecteur de la PK. Les résultats des dosages enzymatiques au cours du temps sont présentés sur le graphique 25 c. Dans le tableau n° VII nous observons qu'à -20°C cet hémolysat est stable et ne présente pas de variation significative au cours de toute la période d'étude. L'hémolysat conservé à +4°C peut être considéré comme stable pendant 9 mois de conservation seulement.

On remarque que, contrairement au témoin sans conservateur, l'enzyme en présence des protecteurs est plus stable à -20°C qu'à +4°C.

e - Recherche de la méthémoglobine

Les résultats des dosages de la méthémoglobine, après 13 mois de conservation, sont indiqués dans le tableau n° VIII.

	Méthémoglobine (en%)	
	+4°C	-20°C
Temoin	45	47
Glycérol 20%	6,5	4,5
ethylène glycol 30 %	23	4
DMSO 15%	52	8

Tableau n° VIII : Taux de méthémoglobine obtenus après 13 mois de conservation dans les hémolysats destinés à la conservation de la PK.

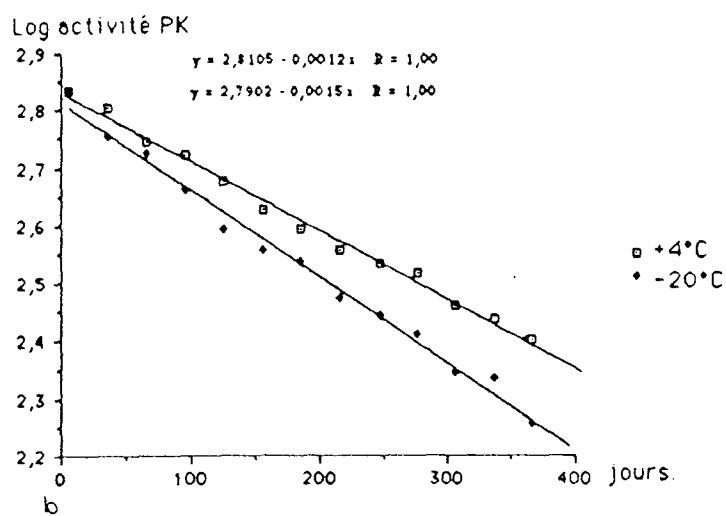
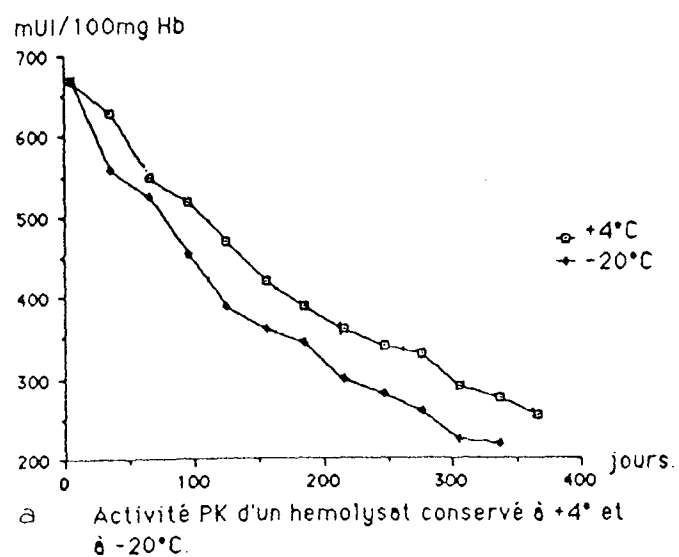
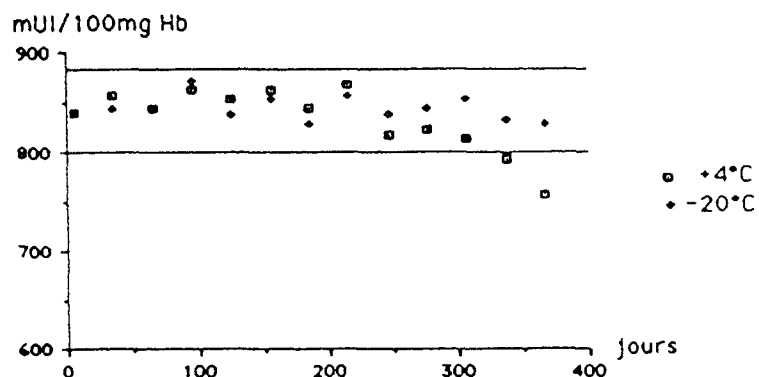
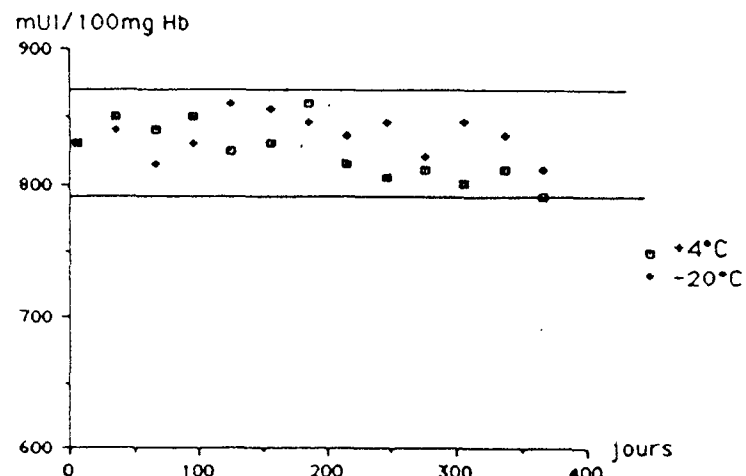


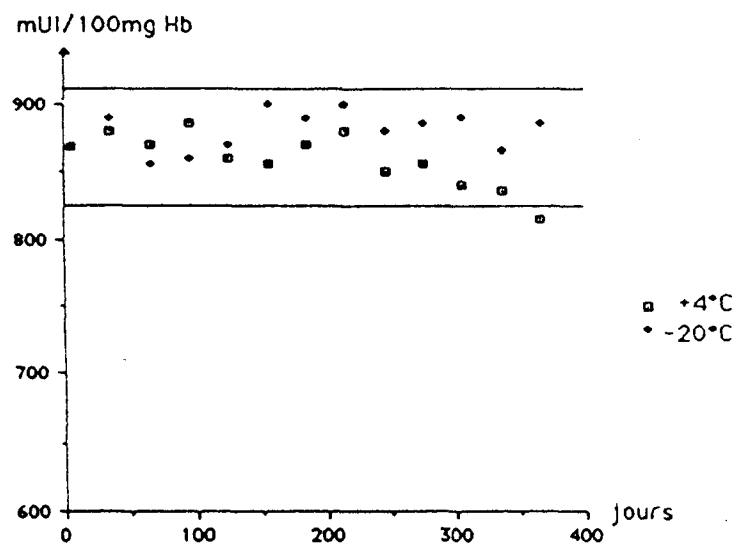
Figure 24 : a : activité en fonction du temps de la PK d'un hémolysat sans protecteur conservé à +4°C et à -20°C. b : logarithme de l'activité enzymatique en fonction du temps.



a: conservation de la PK en presence de glycerol 20% à +4 et à -20°C.



b: conservation de la PK en presence de DMSO 15% à +4 et à -20°C.



c: conservation de la PK en presence d'éthylène glycol 30% à +4 et à -20°C.

Figure 25 : conservation à long terme à +4°C et à -20°C de la PK d'un hémolysat comportant : a: glycérol 20% + PEP 0,5mM + glutathion réduit 0,1mM ; b: éthylèneglycol 30% + PEP 0,5mM + glutathion réduit 0,1mM ; c: DMSO 15% + PEP 0,5mM + glutathion réduit (GSH) 0,1mM.

protecteur	température	durée de conservation (mois)	moyenne (m) mUI/100 mgHb	écart- type (m)	penté(a)	écart- type(a)	p=0,05
Glycérol	4°C	12	825	32	-0,214	0,052	n.st
"	"	9	840	16,8	-0,087	0,058	st
"	-20°C	12	835	12,6	-0,039	0,030	st
Ethylène glycol	4°C	12	855	20,5	-0,145	0,03	n.st
"	"	9	863	12,3	-0,079	0,040	st
"	-20°C	12	875	14,5	0,031	0,036	st
DMSO	4°C	12	820	21,65	-0,147	0,034	n.st
"	"	9	827	18,5	-0,127	0,056	st
"	-20°C	12	830	14,75	-0,025	0,037	st

Tableau n°VII : Conservation de la PK érythrocytaire dans l'hémolysat en présence des solvants (Glycérol 20%, Ethylène-glycol 30%, DMSO 15%) à +4°C et à -20°C. Estimation de la stabilité par régression linéaire. st.= stable ; n.st.= non stable.

A -20°C , les hémolysats en présence des 3 protecteurs montrent des taux très faibles de méthémoglobine. Seul le glycérol 20 % apporte une bonne protection à $+4^{\circ}\text{C}$.

Les hémolysats comportants le glycérol 20%, l'éthylène glycol 30% ou le DMSO 15%, préparés en présence du PEP 0,5 mmol/l et du glutathion réduit 0,1 mmol/l, présentent une activité PK stable pendant 12 mois de conservation à -20°C et jusqu'à 9 mois à $+4^{\circ}\text{C}$. Ces solutions montrent des taux faibles de méthémoglobine à -20°C . A $+4^{\circ}\text{C}$ ces taux sont relativement très élevés en présence du DMSO 15% ou de l'éthylène glycol 30%. Ces deux composés montrent par contre un effet protecteur de l'hémoglobine aux concentrations plus faibles comme celles utilisées pour la conservation de la G6PD.

3.3.3 - Solution de contrôle des deux enzymes

Nous avons observé que certains produits présentent un maximum de pouvoir protecteur simultanément vis-à-vis de la G6PD et de la PK. Ce sont :

- Les polyalcools : saccharose, sorbitol
- Les acides aminés : alanine, glutamate de sodium, aspartate de magnésium et proline
- Les dérivés d'acides aminés : TMAO, sarcosine et bétaine.

L'étude simultanée de ces protecteurs est réalisée dans le but de proposer une solution de contrôle enzymatique utilisable simultanément pour la mesure d'activité de la G6PD et la PK.

a - Les polyalcools

Le saccharose et le sorbitol sont utilisés à une concentration de 20 % pour la conservation à long terme. Les deux activités enzymatiques G6PD et PK sont mesurées dans les deux solutions conservées aux températures de $+4^{\circ}\text{C}$ et -20°C

*Saccharose (Figure 26)

Les résultats des dosages enzymatiques de la G6PD et de la PK dans l'hémolysat comportant le saccharose 20%, le NADP 0,5 mmol/l, le PEP 0,5 mmol/l et le glutathion réduit 0,1 mmol/l sont présentés sur les graphiques 26 a - b. L'hémolysat conservé à +4°C présente une activité G6PD stable pendant les 12 mois de conservation. Les valeurs d'activité enzymatique en fonction du temps ont une corrélation linéaire $y = 500 - 0,089 x$. Dans le tableau n°IX nous montrons que cette variation n'est pas significative (au risque de 5%).

Dans ce même hémolysat conservé à +4°C, l'activité de la PK s'écarte beaucoup de la valeur initiale dès le 7^e mois de conservation. Les résultats du tableau n°IX montrent que la variation de cette activité est significative (au risque de 5%) après 6 mois de conservation.

A -20°C les deux enzymes sont plus stables qu'à +4°C. Les équations de corrélation linéaires sont : $y = 485 + 0,009 x$ et $y = 672 - 0,22 x$ respectivement pour la G6PD et pour la PK. La variation de l'activité enzymatique de la G6PD n'est pas significative au cours des 12 mois de conservation, tandis que l'activité PK peut être considérée comme stable jusqu'à 9 mois seulement.

* Sorbitol (Figure 26) :

Les résultats des activités enzymatiques G6PD et PK en fonction du temps dans l'hémolysat comportant le sorbitol 20%, le NADP 0,5 mmol/l, le PEP 0,5 mmol/l et le glutathion réduit 0,1 mmol/l sont présentés sur les graphiques 26 c - d.

A +4°C les deux enzymes dans cet hémolysat sont moins stables qu'en présence du saccharose. Dans le tableau IX l'étude de la pente de régression linéaire montre des variations significatives des deux activités enzymatiques dès les premiers mois de conservation pour la G6PD et à partir du 5^e mois pour la PK.

A -20°C les deux enzymes sont plus stables qu'à +4°C. Nous confirmons (Tableau IX) par étude de régression linéaire que les deux enzymes sont stables et ne présentent pas de variation significatives pendant 9 mois de conservation.

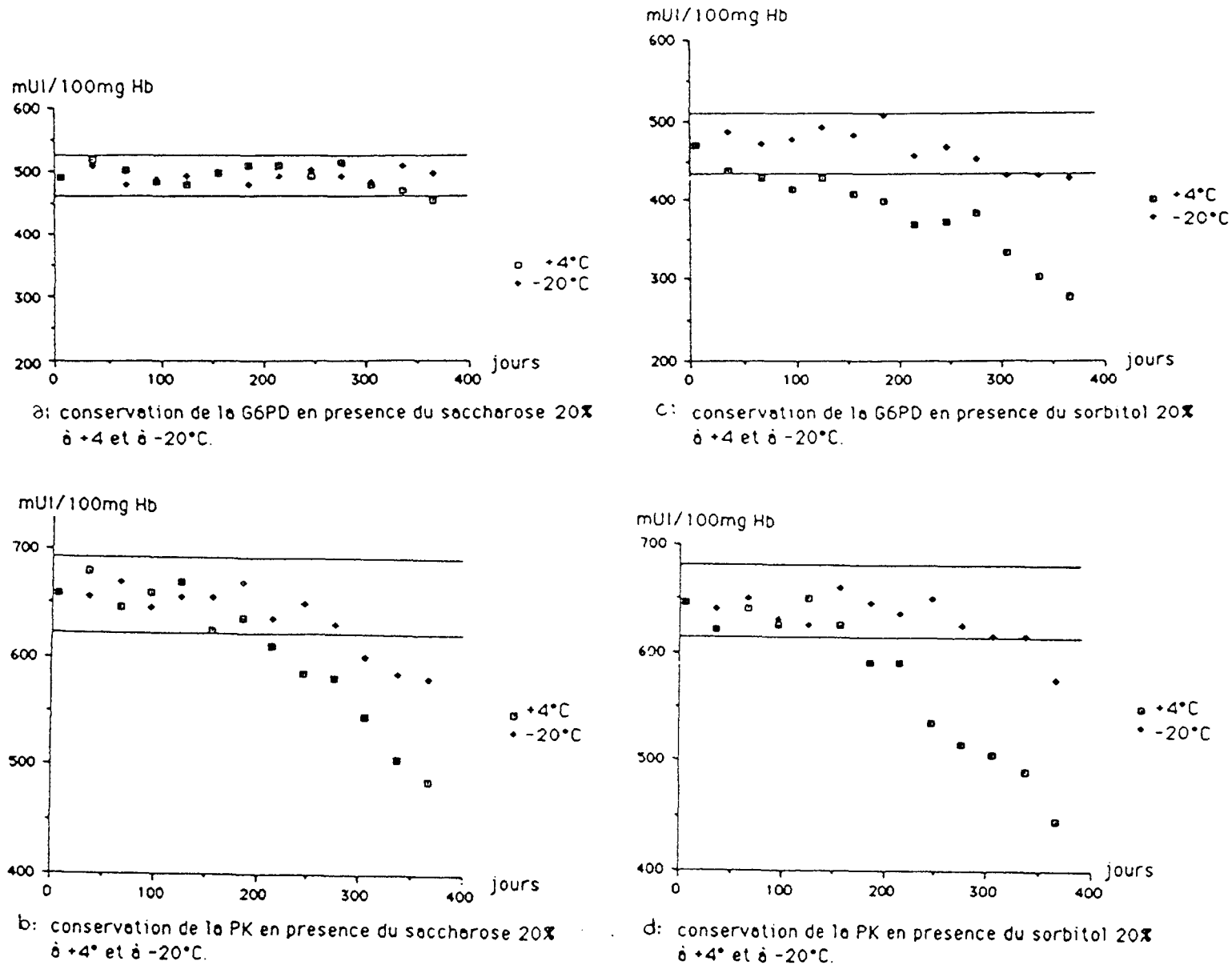


Figure 26 : conservation à +4°C et à -20°C de la G6PD et la PK d'un hémolysat comportant:
 -saccharose 20% + NADP 0,5mM + PEP 0,5mM + glutathion réduit 0,1mM (a et b).
 -sorbitol 20% + " + " + " + " (c et d).

protecteur	tempéra- ture	enzyme	durée de conservati- on (mois)	moyenne (m)	écart- type (m)	pente(a)	écart- type (a)	p = 0,
Saccharose	4°C	G6PD	12	485	19	-0,089	0,041	st
	"	PK	12	600	63	-0,503	0,059	n.st
	"	PK	6	650	19,5	-0,190	0,104	st
	-20°C	G6PD	12	485,5	10	0,009	0,025	st
	"	PK	12	633	30,5	-0,217	0,044	n.st
	"	PK	9	647,5	13	-0,081	0,042	st
Sorbitol	4°C	G6PD	12	380	56	-0,457	0,045	n.st
	"	G6PD	7	412	32	-0,402	0,068	n.st
	"	PK	12	570	68,5	-0,546	0,064	n.st
	"	PK	5	630	12,5	-0,024	0,110	st
	-20°C	G6PD	12	460	25	-0,162	0,042	n.st
	"	G6PD	9	470	16,3	-0,072	0,058	st
	"	PK	12	626,5	22	-0,123	0,042	n.st
	"	PK	9	635	11,6	-0,021	0,044	st

Tableau n°IX: Conservation des enzymes G6PD et PK érythrocytaires dans l'hémolysat en présence du saccharose 20% et du sorbitol 20% aux températures de +4°C et -20°C. Estimation de la stabilité par régression linéaire. st = stable ; n.st.= non stable.

*Recherche de la méthémoglobine

Les taux de méthémoglobine sont faibles dans les deux solutions après 13 mois de conservation. On remarque que, paradoxalement, les taux de méthémoglobine des solutions conservées à -20°C sont plus importants qu'à $+4^{\circ}\text{C}$. Cela peut être dû au passage de la congélation à la décongélation.

	Méthémoglobine (en %)	
	$+4^{\circ}\text{C}$	-20°C
Temoin	4 5	6 5
saccharose 20%	9	1 2
Sorbitol 20%	1	3,5

Tableau n° X : Taux de méthémoglobine (en %) obtenus après 13 mois de conservation dans les hémolysats préparés en présence du saccharose 20% et du sorbitol 20% à $+4^{\circ}\text{C}$ et à -20°C .

b - Les acides aminés

Nous avons vu dans le chapitre précédent l'effet protecteur très important de l'alanine et du glutamate de sodium aux températures de 50°C et 56°C . D'autres acides aminés sont connus pour leur effet essentiellement cryoprotecteurs, c'est le cas de l'aspartate de magnésium et de la proline. Ces deux acides aminés sont étudiés au même titre que l'alanine et le glutamate de sodium pour une conservation à long terme aux concentrations de 0,5 mol/l.

* L'alanine (Figure 27)

Les résultats des activités enzymatiques G6PD et PK au cours de la conservation à long terme en présence d'alanine 0,5 mol/l, du NADP 0,5 mmol/l, du PEP 0,5 mmol/l et du glutathion réduit 0,1 mmol/l sont présentés sur les graphiques 27 a - b.

A $+4^{\circ}\text{C}$ on observe une diminution très importante d'activité PK dès les premiers mois de conservation ; cependant l'activité de la G6PD est plus stable en présence de ce protecteur et ne montre

pas de variation significative jusqu'à 8 mois de conservation (tableau n° XI).

A -20°C , en présence d'alanine, les deux enzymes sont plus stables qu'à $+4^{\circ}\text{C}$. La G6PD ne montre pas de variation significative pendant au moins 12 mois de conservation ; la PK peut être considérée comme stable pendant 10 mois seulement.

*Glutamate de sodium (Figure 27)

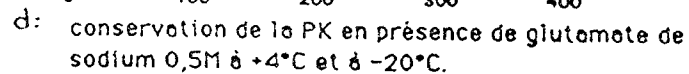
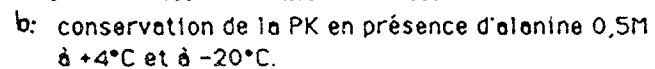
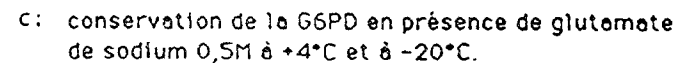
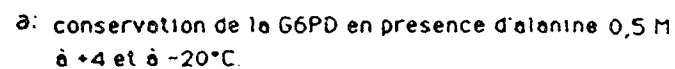
Les activités enzymatiques G6PD et PK de l'hémolysat additionné de glutamate de sodium 0,5 mol/l, du NADP 0,5 mmol/l, du PEP 0,5 mmol/l et du glutathion réduit 0,1 mmol/l sont présentés sur les graphiques 27 c - d. A $+4^{\circ}\text{C}$ on observe une diminution des deux activités dès les premiers mois de conservation. Par contre à -20°C les deux enzymes sont plus stables et ne montrent pas de variations significatives jusqu'à 7 mois pour la PK et pendant 12 mois de conservation pour la G6PD (tableau n° XI).

*L'aspartate de magnésium (Figure 28)

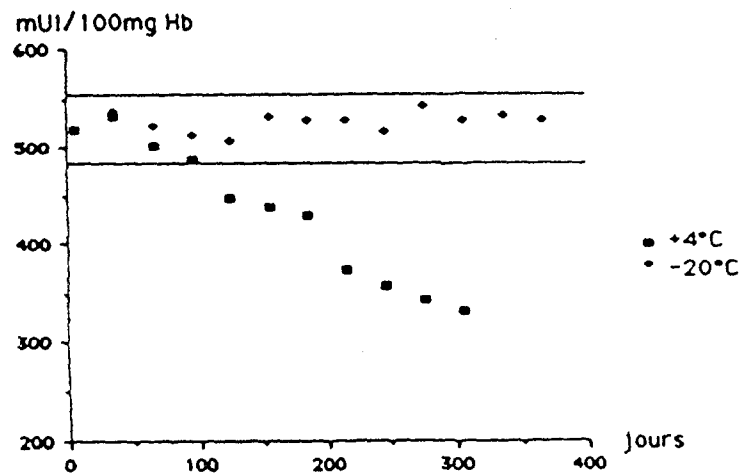
Les résultats des activités enzymatiques en fonction du temps au cours de la conservation en présence de ce protecteur sont présentés sur les graphiques 28 a - b. On constate, comme pour les deux premiers acides aminés, une bonne stabilité des deux activités enzymatiques à -20°C (jusqu'à 12 mois de conservation pour la G6PD et jusqu'à 10 mois de conservation pour la PK). Cependant à $+4^{\circ}\text{C}$, on note une diminution significative des deux activités après 3 et 4 mois de conservation seulement (Tableau XI).

*La proline (Figure 28)

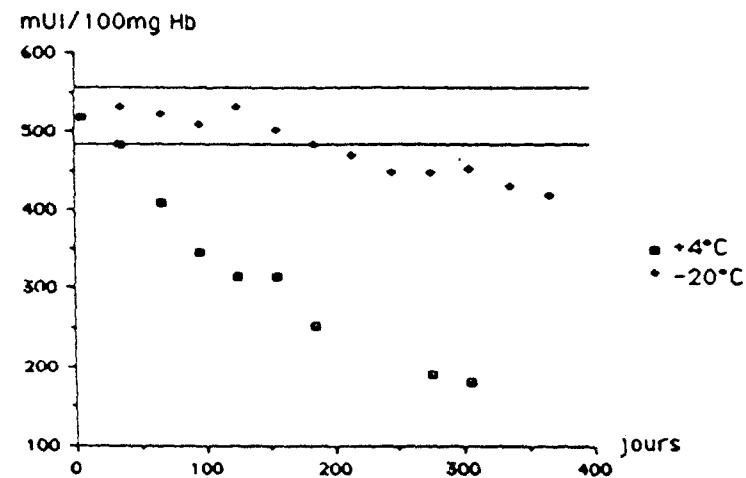
En solution à 0,5 mol/l en présence du NADP 0,5 mmol/l, du PEP 0,5 mmol/l et du glutathion réduit 0,1 mmol/l dans un hémolysat, la proline possède un faible effet protecteur par rapport aux composés précédents. Elle permet une conservation sans variation significative de l'activité de la G6PD jusqu'à 5 mois à -20°C (Figure 28 c-d). A $+4^{\circ}\text{C}$ cette activité diminue rapidement à dès le premier mois de conservation.



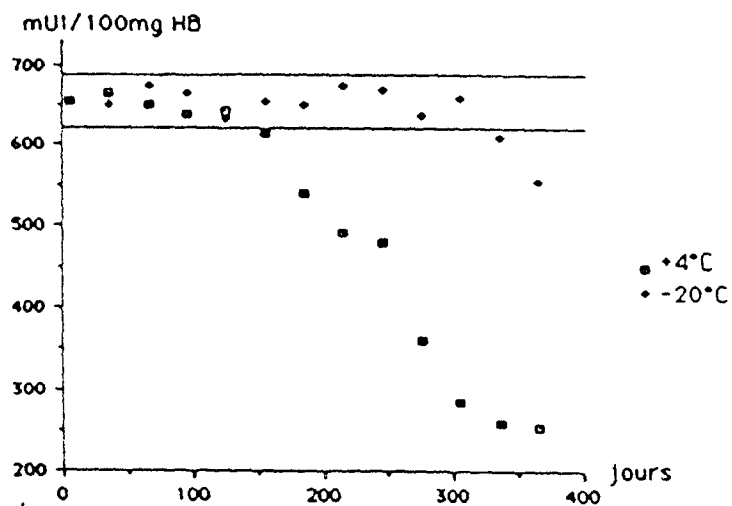
- glutamate de sodium 0.5M + " " " + " " " (c et d).



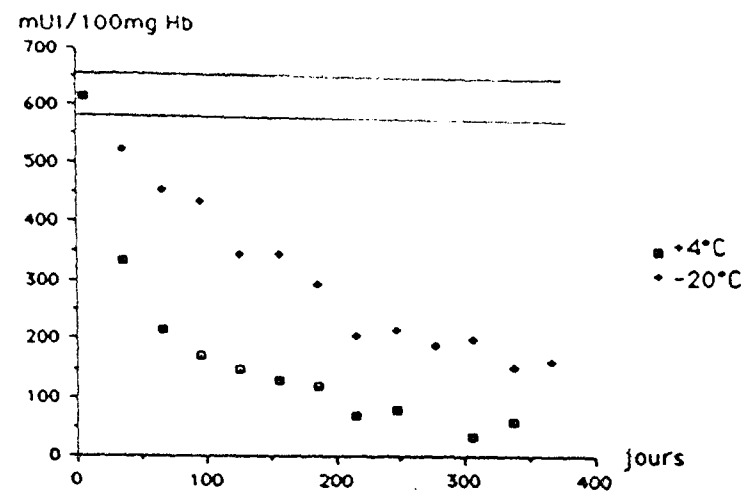
a: conservation de la G6PD en présence d'aspartate de magnésium à +4 et à -20°C.



c: conservation de la G6PD en présence de proline à +4 et à -20°C.



b: conservation de la PK en présence d'aspartate de magnésium à +4° et à -20°C.



d: conservation de la PK en présence de proline 0,5M à +4° et à -20°C.

Figure 28 : conservation à +4°C et à -20°C de la G6PD et la PK d'un hémolysat comportant:
 -l'aspartate de magnésium 0,5M + NADP 0,5mM + PEP 0,5mM + glutathion réduit 0,1mM (a et b).
 -la proline 0,5M + " " " " " " (c et d).

protecteur	tempéra- -ture	enzyme	durée de conservati- on (mois)	moyenne (m)	écart- type (m)	pente(a)	écart- type (a)	p = 0,(
Alanine	4°C	G6PD	12	467	43,6	-0,300	0,067	n.st
	"	G6PD	8	491	13,5	-0,036	0,061	st
	"	PK	12	483,5	90	-0,754	0,046	n.st
	"	PK	5	556,6	62,5	-1,114	0,021	n.st
	-20°C	G6PD	12	500	13,5	-0,023	0,034	st
	"	PK	12	626,5	24	-0,126	0,048	n.st
	"	PK	10	635	12,25	-0,022	0,040	st
Glutamate de sodium	-20°C	G6PD	12	494	13,67	0,005	0,035	st
	"	PK	12	616	25	-0,164	0,041	n.st
	"	"	9	627,5	10	-0,039	0,036	st
Aspartate de magné- sium.	-20°C	G6PD	12	520	9,6	0,018	0,024	st
	"	PK	12	636	32,5	-0,155	0,070	n.st
	"	PK	10	647	13,3	0,001	0,044	st
Proline	-20°C	G6PD	12	475	41,3	-0,339	0,030	n.st
	"	G6PD	5	513	13	-0,133	0,094	st

Tableau n°XI :Conservation des enzymes G6PD et PK érythrocytaires dans l'hémolysat en présence d'acides aminés (Alanine 0,5mol/l, Glutamate de sodium 0,5mol/l, Aspartate de magnésium 0,5mol/l et proline 0,5mol/l) à +4°C et à -20°C. Estimation de la période de stabilité par régression linéaire. st.= stable ; n.st.= non stable.

La proline ajoutée à la même concentration dans l'hémolysat ne permet pas la stabilisation de la PK ni à -20°C ni à $+4^{\circ}\text{C}$.

*Recherche de la méthémoglobine

Les taux de méthémoglobine ont été mesurés dans ces solutions après 13 mois de conservation ; les résultats du dosage sont présentés dans le tableau XII. Ces composés présentent un effet protecteur de l'hémoglobine plus important à -20°C qu'à $+4^{\circ}\text{C}$.

	Méthémoglobine (en %)	
	$+4^{\circ}\text{C}$	-20°C
Temoin	45	65
Alanine 0,5 mol/l	22	1
Glutamate de sodium 0,5 mol/l	40	4
Aspartate de magnésium 0,5mol/l	56	5,5
Proline 0,5 mol/l	28	2

Tableau n° XII : Taux de méthémoglobine obtenus dans les hémolysats préparés en présence de différents acides aminés après 13 mois de conservation à $+4^{\circ}\text{C}$ et à -20°C .

c - Dérivés d'acides aminés

Le triméthylamine-N-oxide (TMAO), le N-triméthylglycine (bétaine) et le N-méthylglycine (sarcosine) sont parfois utilisés à des concentrations relativement fortes (50 à 500 mmol/l), comme protecteurs des protéines au même titre que le glycérol (46, 87). Nous avons observé au cours de la conservation à court terme ($50-56^{\circ}\text{C}$) que ces composés ont un effet protecteur très important contre la dénaturation thermique de la G6PD et de la PK érythrocytaires. Nous avons étudié au cours d'une

conservation à long terme (+4°C et -20°C) ces composés à une concentration de 1 mol/l.

* TMAO (Figure 29)

Les résultats des activités enzymatiques G6PD et PK en fonction du temps au cours de la conservation en présence de ce protecteur sont présentés sur les graphiques 29 a - b. Les valeurs observées au cours des 12 mois de conservation à +4°C et à -20°C sont proches de la valeur du temps zéro. A +4°C nous montrons par étude de régression linéaire (Tableau n°XIII) que les deux activités enzymatiques G6PD et PK sont stables pendant 9 et 12 mois de conservation. A -20°C les deux enzymes sont stables et ne montrent pas de variation significative au cours de toute la période d'étude.

* Sarcosine (Figure 29)

Les résultats des dosages d'activités enzymatiques dans les hémolysats comportant la sarcosine 1 mol/l, le NADP 0,5 mmol/l, le PEP 0,5 mmol/l et le glutathion réduit 0,1 mmol/l sont présentés sur les graphiques 29 c-d. Nous montrons (Tableau XIII) qu'à +4°C en présence de sarcosine les activités enzymatiques sont stables jusqu'à 10 mois pour la G6PD et pendant 4 mois seulement pour la PK. A -20°C les deux enzymes sont plus stables qu'à +4°C. La G6PD ne montre pas de variation significative au cours des 12 mois de conservation ; cependant la PK montre une diminution significative d'activité à partir de 9 mois de conservation seulement.

* La bétaine (Figure 30)

L'étude de la conservation à long terme d'un hémolysat en présence de bétaine 1 mol/l, du NADP 0,5 mmol/l, du PEP 0,5 mmol/l et du glutathion réduit 0,1 mmol/l montre que ce composé est un mauvais conservateur des activités enzymatiques G6PD et PK érythro-cytaires à +4°C et à -20°C.

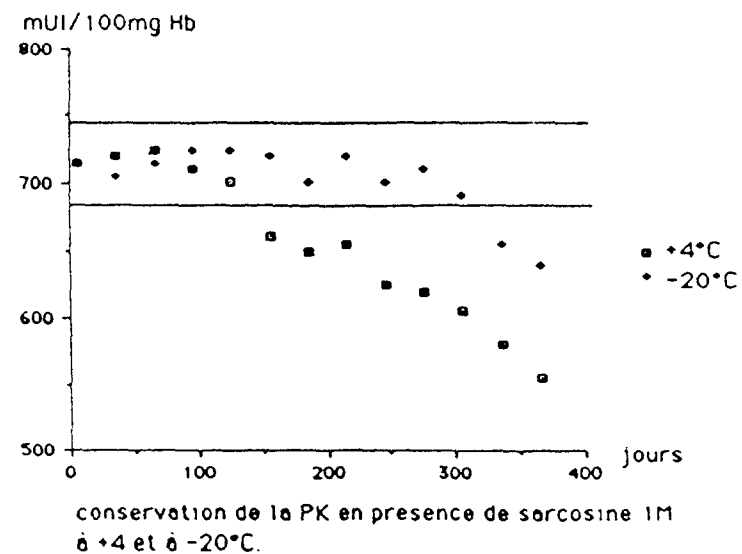
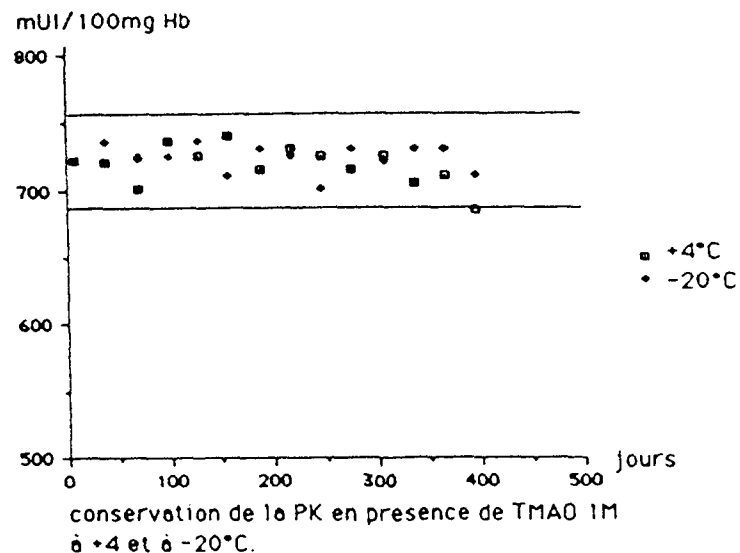
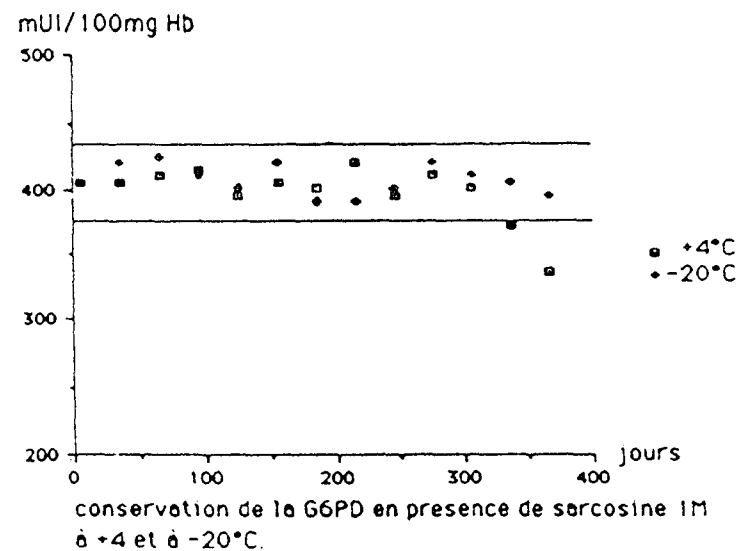
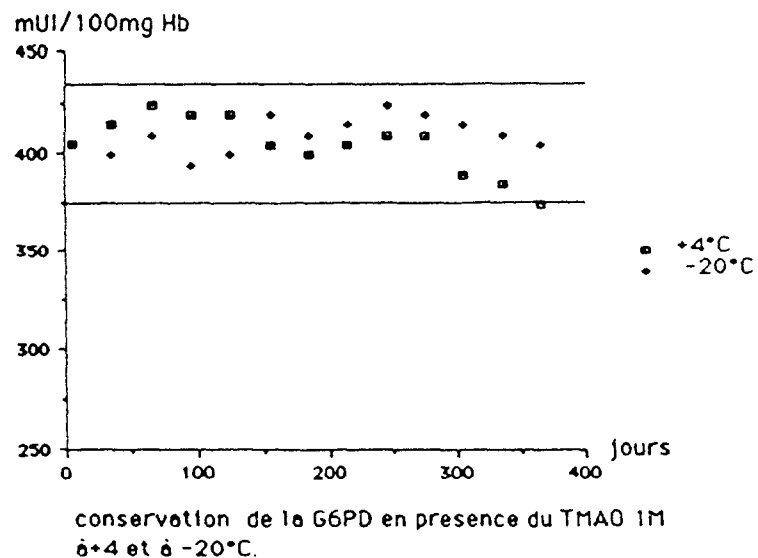


Figure 29 : conservation à +4°C et à -20°C de la G6PD et la PK d'un hémolysat comportant:
 -le TMAO 1M + NADP 0,5mM + PEP 0,5mM + glutathion réduit 0,1mM (a et b).
 -la sarcosine 1M + " + " + " (c et d).

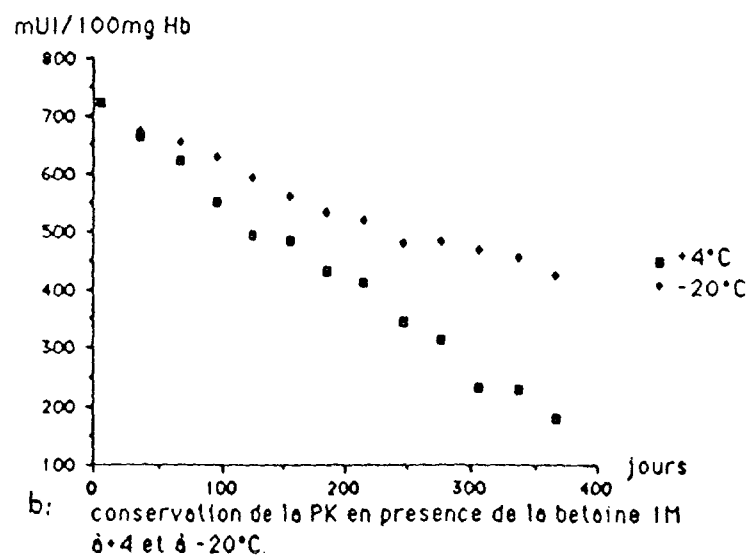
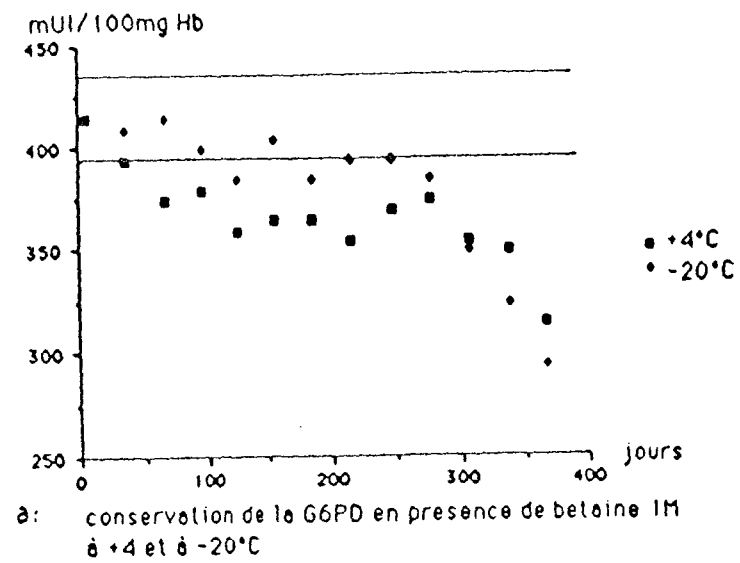


Figure 30 : activité catalytique de : a: la G6PD et b: la PK d'un hémolysat comportant la bétaine 1M à +4°C et à -20°C.

protecteur	tempéra- -ture	enzyme	durée de conservati- -on (mois)	moyenne (m)	écart- type (m)	pente(a)	écart- type (a)	p = 0,0
TMAO	4°C	G6PD	12	400	14,6	-0,100	0,022	n.st
	"	G6PD	9	407	8	-0,042	0,027	st
	"	PK	12	716	11,5	-0,024	0,029	st
	-20°C	G6PD	12	405	8,7	0,029	0,021	st
	"	PK	12	720	10	-0,010	0,025	st
	"	"	"	"	"	"	"	"
Sarcosine	4°C	G6PD	12	392,7	22,5	-0,121	0,045	n.st
	"	G6PD	10	400	8	-0,018	0,026	st
	"	PK	12	650	56	-0,470	0,032	n.st
	"	PK	4	709	9,6	-0,133	0,088	st
	-20°C	G6PD	12	402	12	-0,041	0,028	st
	"	PK	12	696,5	26,3	-0,164	0,046	n.st
	"	PK	9	708,5	9,5	-0,027	0,035	st
	"	"	"	"	"	"	"	"

Tableau n°XIII :Conservation des enzymes G6PD et PK érythrocytaires dans l'hémolysat en présence des dérivés d'acides aminés (TMAO 1mol/l, Sarcosine 1mol/l) à +4°C et à -20°C. Estimation de la période de stabilité par régression linéaire. st.= stable ; n.st.= non stable.

* Recherche de la méthémoglobine

Les résultats des dosages réalisés après 13 mois de conservation sont présentés dans le tableau n°XIV.

Parmi ces protecteurs, seul le TMAO se présente comme protecteur de l'hémoglobine.

	Méthémoglobine (en %)	
	+4°C	-20°C
Temoin	44	62
TMAO 1 mol/l	11	7,7
Sarcosine 1 mol/l	35	14
Bétaïne 1 mol/l	59	56

Tableau n° XIV : Taux de méthémoglobine obtenus dans les hémolysats préparés en présence des dérivés d'acides aminés après 13 mois de conservation à +4°C et à -20°C.

En présence des protecteurs, la G6PD est généralement plus stable que la PK. Les hémolysats sont additionnés à chaque fois de NADP 0,5 mmol/l, de PEP 0,5 mmol/l et de glutathion réduit 0,1 mmol/l. Les deux solutions comportant le saccharose ou le TMAO présentent les effets protecteurs les plus importants et permettent la conservation des deux enzymes G6PD et PK sans variation significative d'activité pendant 12 mois à -20°C et jusqu'à 9 et 7 mois à +4°C. Les autres composés testés, à l'exception de la proline et de la bétaïne, sont des cryoprotecteurs ; ils permettent la conservation des deux enzymes pendant une période de 7 à 12 mois à -20°C. Les solutions d'alanine et de sarcosine ont un effet protecteur particulièrement plus important pour la G6PD et permettent de stabiliser cette enzyme pendant 8 et 12 mois respectivement à +4°C et à -20°C. Toutes ces solutions à l'exception de la bétaïne montrent des taux très faibles de méthémoglobine à -20°C. A +4°C, seules les

solutions de saccharose, du sorbitol et du TMAO présentent des taux relativement faibles de méthémoglobines.

3.3.4- Autres enzymes

Le but de notre étude est de préparer une solution de contrôle enzymatique applicable dans un premier temps à la mesure des activités de la G6PD et de la PK érythrocytaires. Après avoir étudié l'effet des différents protecteurs sur la stabilité à long terme de ces deux enzymes nous avons tenté de savoir si cette solution de contrôle peut dans un deuxième temps s'étendre au dosage d'autres enzymes érythrocytaires. C'est ainsi que d'autres enzymes d'intérêt clinique (la glutathion réductase, la glutathion peroxydase, la galactose1-phosphate uridyl transferase) ont été mesurées après 13 mois de conservation dans les hémolysats comportant les protecteurs où les deux enzymes G6PD et PK sont stables: saccharose 20%, TMAO 1 mol/l à +4°C et à -20°C, sorbitol 20%, sarcosine 1 mol/l, alanine 0,5 mol/l, glutamate de sodium 0,5 mol/l et aspartate de magnésium 0,5 mol/l à -20°C. Les résultats sont résumés dans le tableau n°XV.

A +4°C, après 13 mois de conservation tous ces hémolysats présentent des activités enzymatiques très faibles ou nulles. A -20°C, ces activités sont légèrement plus faibles que les valeurs normales. On note l'effet cryoprotecteur du glutamate de sodium et de l'aspartate de magnésium. Le saccharose et le TMAO, permettant la stabilisation de la G6PD et de la PK, n'ont qu'un faible effet protecteur des trois autres enzymes à +4°C. Comme pour la conservation de la G6PD et la PK on peut penser que la conservation de ces enzymes en solution liquide et congelée pourrait être améliorée en présence de leurs substrats et coenzymes.

	Glutathion réductase		Glutathion peroxydase		Galactosyl-P- Uridyltransferase	
	+4°C	-20°C	+4°C	-20°C	+4°C	-20°C
valeurs normales (n= 12)	280 $\pm$ 35 mUI/100mg Hb (pH 6,6 - 25°C)		2 $\pm$ 0,4 mUI/100mg Hb (pH 7- 25°C)		21 $\pm$ 4 UI/g Hb (pH 8,7 - 37°C)	
hémolysat sans protecteurs	75	75	0,55	0,82	0	0
+ saccharose	110	210	0,94	1,4	7,3	15,2
+ sorbitol		95		1,1		17
+ TMAO	100	220	0,5	1,2	5	16
+ sarcosine		205		0,95		13
+ Alanine		185		1,4		15,3
+ Glutamate de sodium		200		1,9		17,5
+ Aspartate de Mg		210		1,65		21

Tableau n°XV : Activités catalytiques de la glutathion reductase, glutathion peroxydase, galactosyl-P-uridylyltransferase obtenues dans les hémolysats liquides en présence et en absence de stabilisateurs après 13 mois de conservation à +4°C et à -20°C.

3.3.5- Discussion:

Dans un hémolysat sans conservateurs, la G6PD est plus stable en solution congelée à -20°C qu'en solution liquide à +4°C, contrairement à la PK qui devient moins stable après congélation à -20°C. Cela peut s'expliquer par la différence de composition en acides aminés des deux enzymes. La PK plus hydrophobe que la G6PD fait intervenir plus de liaisons hydrophobes dont l'intensité diminue en congélation contrairement aux liaisons hydrogènes dont l'intensité augmente.

Aucune de ces deux enzymes en absence de protecteurs ne montre une diminution d'activité après une simple congélation-décongélation de l'hémolysat. La diminution d'activité enzymatique survient au cours de la conservation.

Après étude à 22°C, 50°C et à 56°C, nous avons réalisé des conservations à long terme avec différents composés stabilisateurs aux températures de +4°C et -20°C et en présence du NADP⁺ 0,5 mmol/l pour la conservation de la G6PD, du PEP 0,5 mmol/l et du glutathion réduit 0,1 mmol/l pour la conservation de la PK.

En présence des conservateurs à -20°C le point de congélation diminue, mais seuls les hémolysats comportant le glycérol 30% ou l'éthylène glycol 30% sont liquides à -20°C. Tous les autres hémolysats sont sous forme congelée.

La G6PD est stable en présence du glycérol 30%, d'éthylène glycol 20% ou du DMSO 10% pendant 12 mois de conservation à -20°C et durant 7 mois à +4°C.

La PK est relativement stable jusqu'à 9 mois de conservation à +4°C et pendant une période de 12 mois à -20°C en présence du glycérol 20%, d'éthylène glycol 30% ou du DMSO 15%.

La conservation d'une solution comportant les deux enzymes peut être réalisée en présence des polyalcools (saccharose 20%, sorbitol 20%), des acides aminés (alanine 0,5 mol/l, glutamate de sodium 0,5 mol/l, aspartate de magnésium

0,5 mol/l, proline 0,5 mol/l) ou des dérivés d'acides aminés (TMAO 1 mol/l, sarcosine 1 mol/l, betaine 1 mol/l).

Dans toutes ces solutions la G6PD se conserve généralement mieux que la PK. Les solutions de saccharose et de TMAO présentent les effets protecteurs les plus importants et permettent une conservation des deux enzymes pendant 12 mois à -20°C et jusqu'à 7 et 9 mois à +4°C. Tous les autres composés, à l'exception de la proline et de la betaine, ont un effet essentiellement cryoprotecteur et permettent la conservation des deux enzymes pendant au moins 7 mois à -20°C.

Les solutions d'alanine et de sarcosine ont un effet particulièrement plus important pour la G6PD et permettent de stabiliser cette enzyme pendant 8 et 12 mois respectivement à +4°C et à -20°C.

L'effet protecteur d'un composé dépend non seulement de la nature de l'enzyme étudiée mais aussi de la température de conservation utilisée. En effet certains composés (glutamate de sodium, sarcosine) ont montré des effets protecteurs relativement importants à 50 et 56°C par contre ils sont moins efficaces à faibles températures. D'autres (TMAO), au contraire, ont un effet protecteur relativement faible aux températures élevées (50°C, 56°C) et sont des bons conservateurs à +4°C et à -20°C.

Tous ces composés sont des protecteurs d'hémoglobine, les hémolysats présentent pour la plupart une coloration rouge et un taux relativement faible de méthémoglobine.

Selon Timasheff et col., l'effet protecteur de ces composés en solution aqueuse est dû à leur exclusion de la surface de contact de la protéine. Celle ci devient alors préférentiellement hydratée. Ainsi, l'ajout des composés stabilisateurs à la solution protéique aqueuse est thermodynamiquement non favorable. La structure protéique est stabilisée car une dénaturation conduit à une plus grande surface de contact entre la protéine et le solvant et aura pour conséquence une augmentation de cet effet non favorable.

Les composés ayant un effet protecteur en solution aqueuse sont souvent des cryoprotecteurs mais il n'a pas été montré que l'effet stabilisateur de ces composés en solution aqueuse peut s'appliquer de la même façon à la stabilité en congélation ; c'est le cas du glutamate de sodium. L'effet cryoprotecteur de ce composé, comme l'explique Matsumoto (143), s'effectue de la manière suivante: les molécules de glutamate de sodium, à l'état ionisé, sont associées à la surface de la molécule protéique conduisant alors à une augmentation de la charge nette et ainsi à l'augmentation de l'hydratation de la protéine. Ce facteur agit en réduisant la transconformation et l'agrégation des molécules protéiques induites par l'élimination d'eau résultant de la congélation.

Nous avons mesuré les activités catalytiques de la glutathion réductase, la glutathion peroxydase et la galactose-1.P-Uridyltransferase après 13 mois de conservation. A $+4^{\circ}\text{C}$, *en présence des protecteurs des deux enzymes G6PD et PK ces hémolysats présentent des activités enzymatiques très faibles. A -20°C ces enzymes sont relativement plus stables et possèdent des activités légèrement plus faibles que les valeurs normales. Le glutamate de sodium et l'aspartate de magnésium montrent plus particulièrement des résultats encourageants.* La stabilité de ces enzymes à -20°C peut probablement être améliorée en présence de protecteurs spécifiques comme leurs substrats et/ou leurs coenzymes.

4- SOLUTION DE CONTROLE LYOPHILISEE

La lyophilisation est le procédé le plus communément utilisé dans la conservation des matériaux biologiques et notamment des enzymes. En effet la plupart des solutions de contrôle commercialisées sont sous forme lyophilisée. Cette technique nécessite l'apport d'adjuvants protecteurs pour stabiliser les enzymes.

— Parmi ces lyoprotecteurs, nous utilisons certains d'entre eux connus comme protecteurs des enzymes et de l'hémoglobine. Ces composés sont variés et appartiennent à différentes classes :

- des polyalcools : lactose, saccharose, sorbitol, maltose, tréhalose, raffinose, utilisés à une concentration de 10 %,
- des sels d'acides aminés : Aspartate de Lysine 250 mmol/l,
- des sels d'EDTA : EDTA disodium, EDTA disodium magnésium et EDTA disodium zinc à des concentrations de 250 mmol/l.

Les sels d'acides aminés et les sels d'EDTA sont surtout connus comme protecteurs de l'hémoglobine (69, 126).

— Ces différents composés, agissant essentiellement à des concentrations relativement grandes, sont additionnés à des protecteurs utilisés à faibles concentrations : NADP 0,5 mmol/l, PEP 0,5 mmol/l (déjà essayés en solutions liquides), le N-acétylcystéine 0,25 mmol/l utilisé comme réducteur et l'azide de sodium 0,01 % comme bactériostatique.

Lyoprotecteur + NADP 0,5 mmol/l + PEP 0,5 mmol/l + N-acétylcystéine 0,25 mmol/l + azide de sodium 0,01%

Les hémolysats sont additionnés de protecteurs aux concentrations finales choisies. La répartition dans les flacons et les procédés de lyophilisation sont décrits dans le chapitre I.

Ces solutions, préparées en même temps qu'un hémolysat témoin sans conservateur, sont lyophilisées puis placées à +4°C et

à 22°C pour une étude de la conservation à long terme. Un autre lot est placé à 45°C et à 56°C pour le test de dégradation accélérée.

L'activité enzymatique est mesurée avant et après lyophilisation. La reconstitution de l'hémolysat est difficile et se fait très lentement. Les dosages d'activités G6PD et PK réalisés sur un hémolysat témoin sans protecteur, montrent une diminution des activités enzymatiques (de 25 % et 15 % respectivement pour la G6PD et la PK) et la formation de méthémoglobine.

4.1 - CONSERVATION A LONG TERME

Nous constatons qu'après lyophilisation les hémolysats en présence d'additifs gardent une coloration rouge, sont plus faciles à reconstituer et la diminution des activités enzymatiques est faible (-3 % environ), contrairement au témoin sans protecteur.

4.1.1 - Polyalcools

Les résultats des dosages d'activités enzymatiques au cours du temps sont présentés dans les figures 31-32-33.

- A 22°C, au cours des premiers mois de conservation on observe une diminution très importante des activités enzymatiques G6PD et PK des hémolysats comportant du lactose, du maltose ou du sorbitol. Les hémolysats comportant le saccharose, le tréhalose ou le raffinose présentent des activités plus stables. Dans le tableau n°XVI nous montrons, par étude de régression linéaire que la G6PD ne présente pas de variation significative au cours de toute la période de conservation en présence du saccharose ou du tréhalose et pendant 10 mois en présence du raffinose. La PK, moins stable, présente une diminution significative au cours des premiers mois de conservation dans tous les hémolysats.

- A +4°C, les deux enzymes montrent une stabilité satisfaisante en présence de tous les lyoprotecteurs testés. Nous observons, par étude de régression linéaire (Tableau n°XVI), que la G6PD ne présente pas de variation significative au cours des douze mois de conservation en présence de tous ces

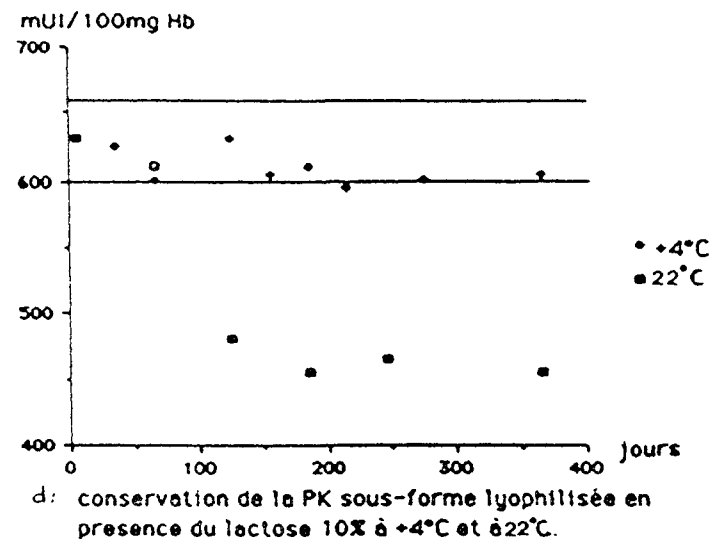
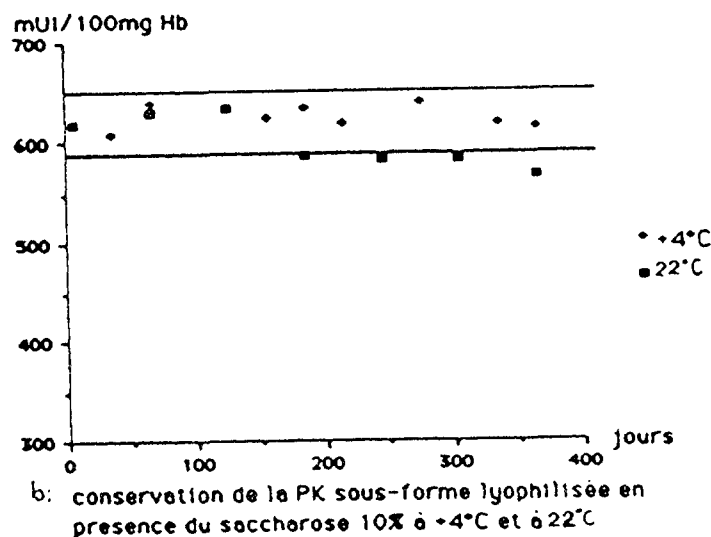
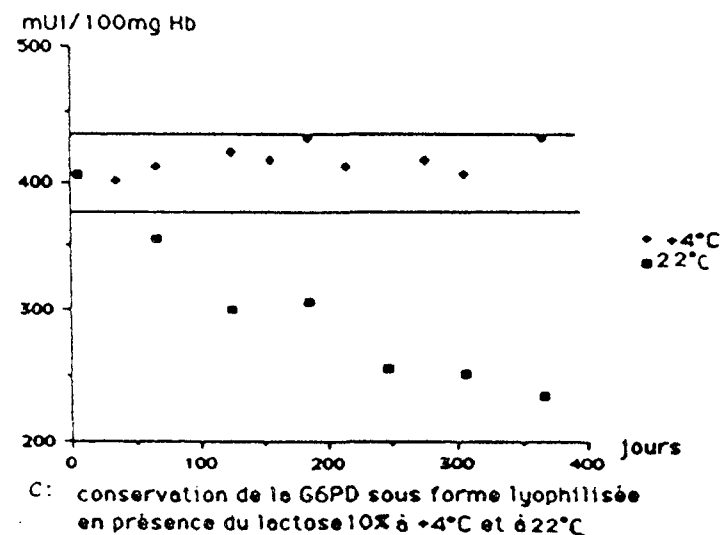
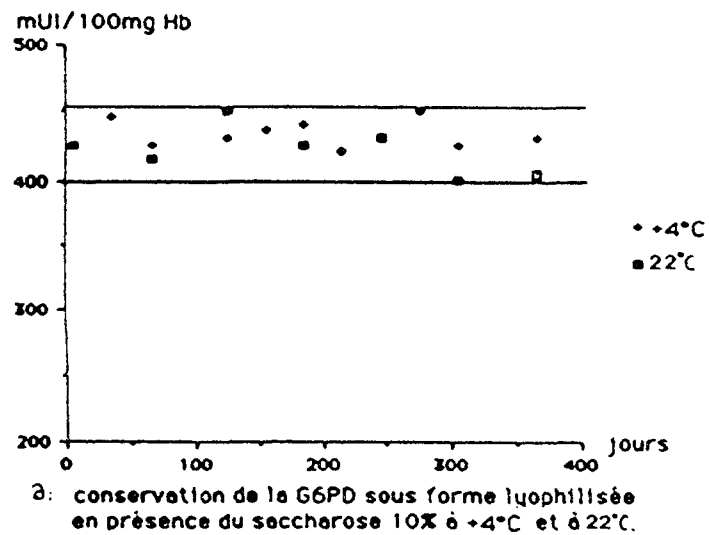


Figure 31 : conservation à +4°C et à 22°C de la G6PD et la PK d'un hémolysat lyophilisé comportant :
 -du saccharose 10% + NADP 0,5mmol/l + PEP 0,5mmol/l + N-acétylcystéine 0,25mmol/l + azide de sodium 0,01%.
 -du lactose 10% + " + " + " + " + "

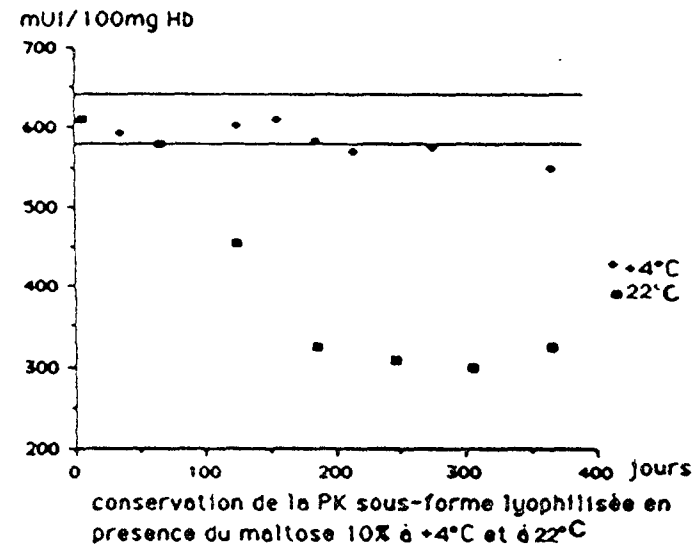
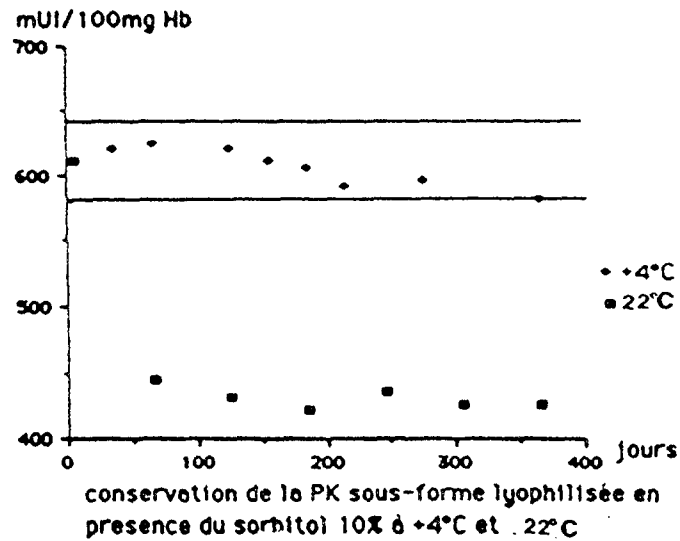
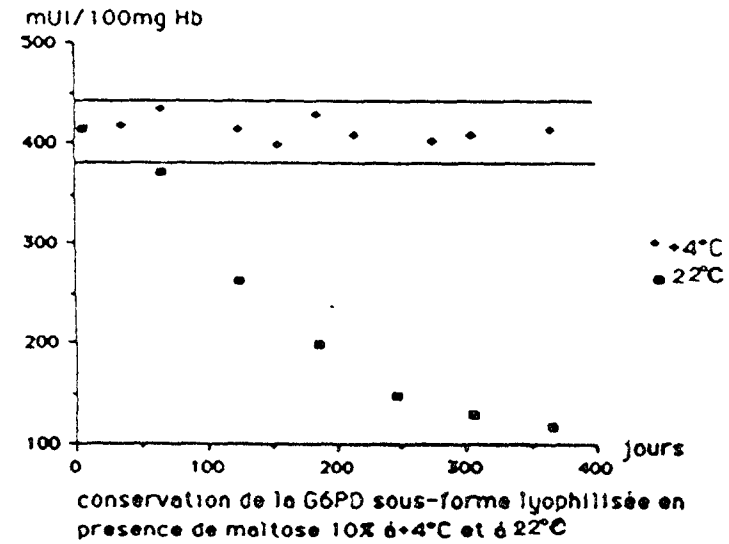
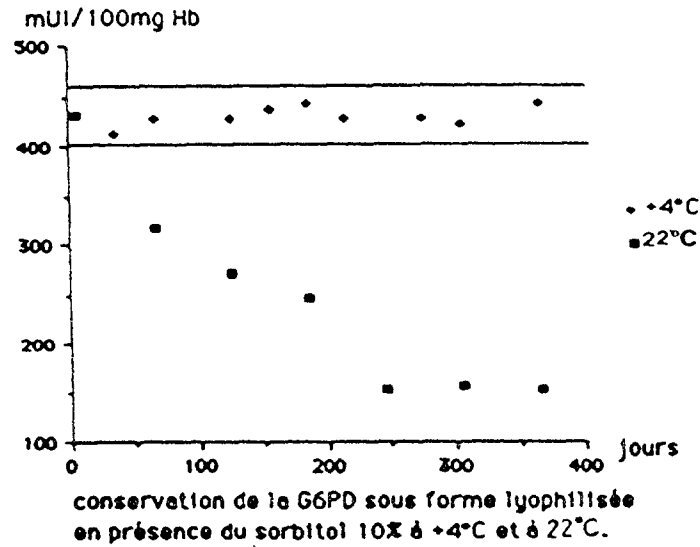


Figure 32 : conservation à +4°C et à 22°C de la G6PD et la PK d'un hémolysat lyophilisé comportant :
 - du sorbitol 10% + NADP 0,5mmol/l + PEP 0,5mmol/l + N-acétylcystéine 0,25mmol/l + azide de sodium 0,01%.
 - du maltose 10%

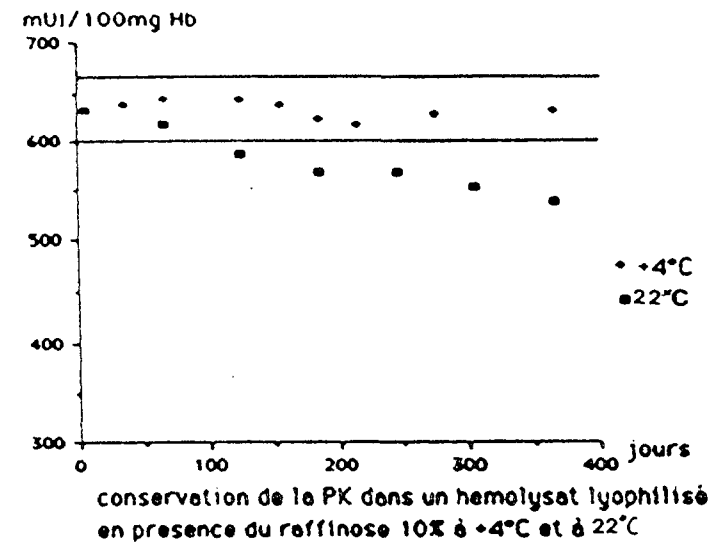
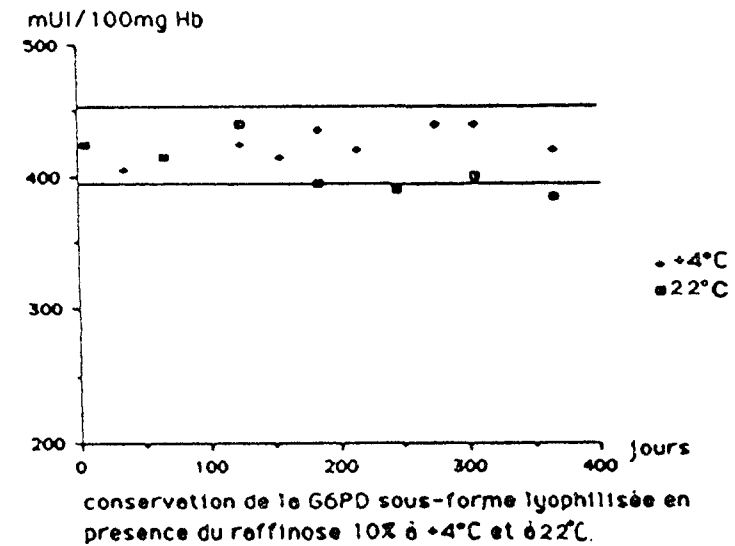


Figure 33 : conservation à +4°C et à 22°C de la G6PD et la PK d'un hémolysat lyophilisé comportant :
 -du trehalose 10% + NADP 0,5mmol/l + PEP 0,5mmol/l + N-acétylcystéine 0,25mmol/l + azide de sodium 0,01%.
 -du raffinose 10% + " + " + " + " + "

protecteur	tempéra- -ture	enzyme	durée de conservat- ion	moyenne	écart- type (m)	pente (a)	écart- type (a)	p = 0,05
lactose	4°C	G6PD	12	409	10,22	0,043	0,026	st
	"	PK	12	606	13,64	-0,070	0,035	st
Saccharose	22°C.	G6PD	12	416,5	16,76	-0,065	0,05	st
	"	PK	12	592	25,63	-0,172	0,043	n.st
	4°C	G6PD	12	427,5	9,8	0,0023	0,029	st
	"	PK	12	616	11,18	0,005	0,036	st
sorbitol	4°C	G6PD	12	422,5	9,2	0,027	0,025	st
	"	PK	12	601	15,16	-0,112	0,025	n.st
	"	PK	7	606	11,8	0,100	0,049	st
maltose	4°C	G6PD	12	406	11,73	-0,037	0,032	st
	"	PK	12	576,6	20,31	-0,134	0,042	n.st
	"	PK	9	581	16	-0,100	0,057	st
tréhalose	22°C	G6PD	12	416,5	11	-0,056	0,028	st
	"	PK	12	590	19	-0,128	0,032	n.st
	4°C	G6PD	12	426,5	12	0,053	0,030	st
	"	PK	12	617	16,6	-0,060	0,049	st
raffinose	22°C.	G6PD	12	402	20,2	-0,119	0,045	n.st
	"	G6PD	10	405,8	19,3	-0,116	0,063	st
	"	PK	12	573	34,4	-0,260	0,026	n.st
	4°C	G6PD	12	419	11,5	0,050	0,029	st
	"	PK	12	625	8,66	-0,033	0,025	st

Tableau n°XVI:conservation des enzymes G6PD et PK érythrocytaires dans l'hémolysat lyophilisé en présence de polyalcools à 22°C et à +4°C. Estimation de la période de stabilité par régression linéaire. st.= stable ; n.st.= non stable.

lyoprotecteurs ; quant à la PK, elle est stable pendant cette période dans les lyophilisats comportants le saccharose, le lactose, le trehalose ou le raffinose et pendant 8 et 9 mois seulement dans les lyophilisats comportants le sorbitol ou le maltose. On peut remarquer qu'en présence des polyalcools, la G6PD est plus stable que la PK.

Les polyalcools ont été testé en présence de NADP 0,5 mmol/l, de PEP 0,5 mmol/l, de N-acétylcystéine 0,25 mmol/l et d'azide de sodium 0,01%.

En présence de ces lyoprotecteurs les deux enzymes sont stables à +4°C pendant 8 à 12 mois de conservation.

Le saccharose, le trehalose et le raffinose sont les plus efficaces parmi les composés testés ; ils permettent la conservation de la G6PD pendant 8 à 12 mois à 22°C ; quant à la PK, elle est moins stable à cette température.

4.1.2 - Aspartate de lysine - Sels d'EDTA

Nous avons testé d'autres lyoprotecteurs utilisés dans la conservation de l'hémoglobine, notamment des sels d'EDTA (EDTA disodium, EDTA disodium-magnésium et EDTA disodium-zinc) et un sel d'acide aminé : l'aspartate de lysine.

La lyophilisation des différents échantillons est effectuée en même temps que celle d'un hémolysat témoin sans protecteur. Les lyophilisats en présence d'additifs gardent une coloration rouge, sont plus faciles à reconstituer et présentent une activité enzymatique légèrement plus faible que celle obtenue avant lyophilisation (-3 % environ).

Les activités enzymatiques des lyophilisats ont été suivies pendant douze mois de conservation à +4°C et à 22°C. Les résultats sont présentés dans les figures 34-35.

- A 22°C en présence des lyoprotecteurs, on observe une très forte diminution des activités enzymatiques dès les premiers mois de conservation. La courbe de dégradation en fonction du temps est de type exponentiel.

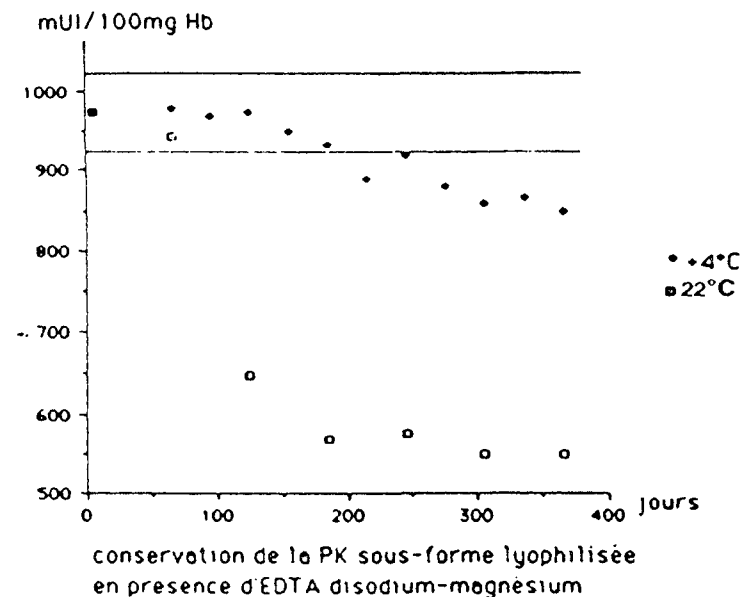
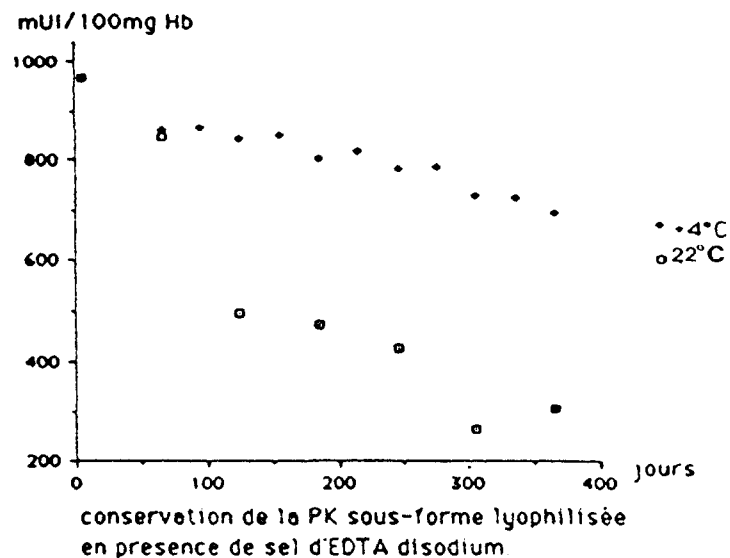
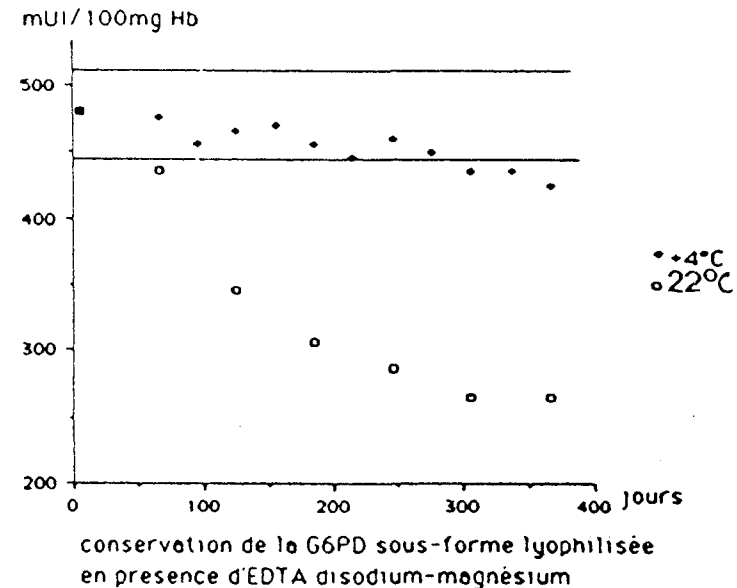
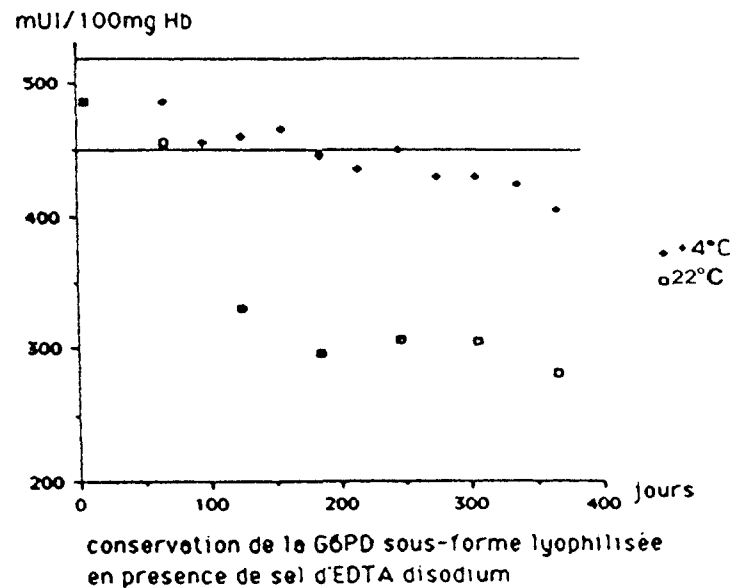


Figure 34 : conservation à +4°C et à 22°C de la G6PD et la PK d'un hémolysat lyophilisé comportant :
 -EDTA disodium 0,25mol/l + NADP 0,5mmol/l + PEP 0,5mmol/l + N-acétylcystéine 0,25mmol/l + azide de sodium 0,01%.
 -EDTA disodium-Mg 0,25mol/l + " + " + " + " + "

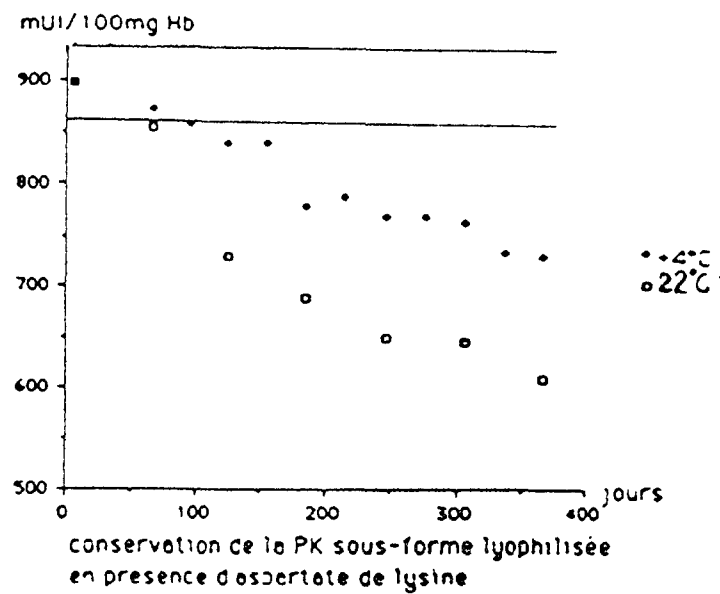
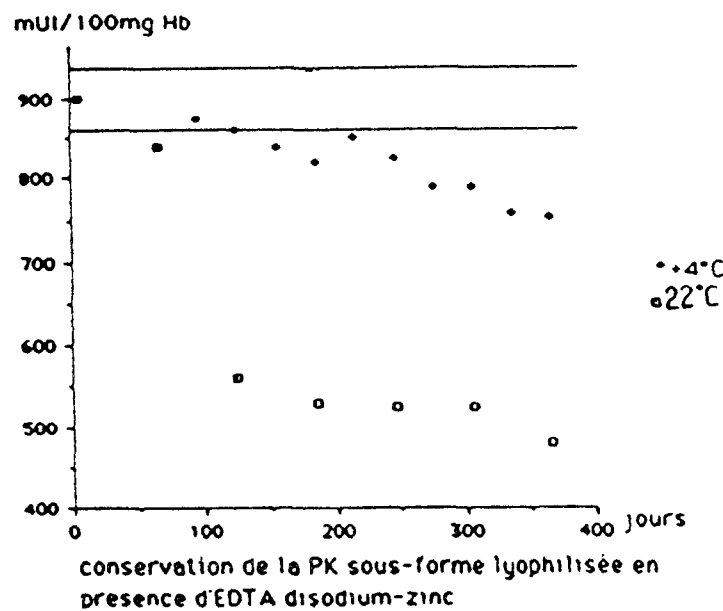
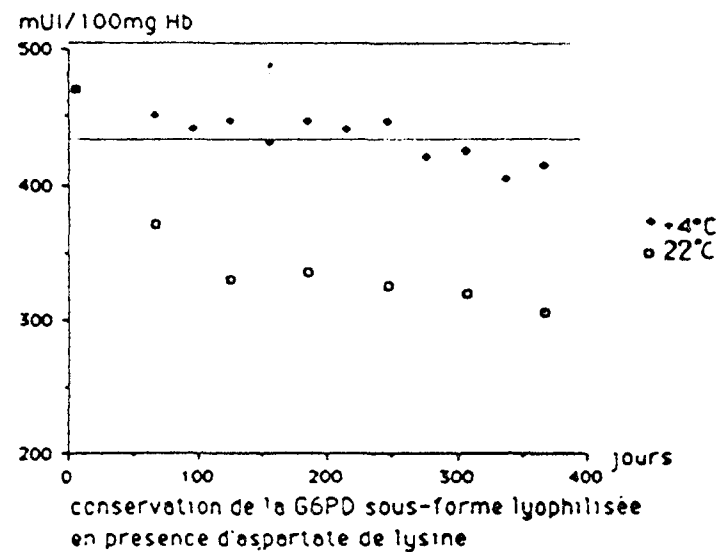
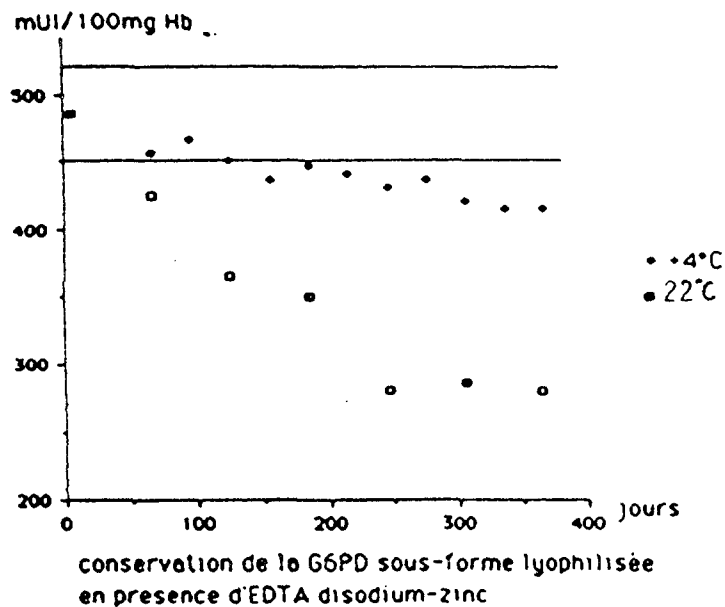


Figure 35 : conservation à +4°C et à 22°C de la G6PD et la PK d'un hémolysat lyophilisé comportant :
-EDTA disodium-Zn 0,25mmol/l + NADP 0,5mmol/l + PEP 0,5mmol/l + N-acétylcystéine 0,25mmol/l + azide de sodium 0,01%.

protecteur	tempéra- ture	enzyme	durée de conserva- -tion	moyenne (m)	écart- type (m)	pente (a)	écart- type (a)	p = 0,05
EDTA Na	4°C	G6PD	12	442,5	24,17	-0,201	0,023	n.st
	"	"	5	465	14,14	-0,180	0,096	st
	"	PK	12	794	74	-0,636	0,054	n.st
	"	"	5	861	50,67	-0,763	0,250	st
EDTA Mg	4°C	G6PD	12	450	17	-0,137	0,020	n.st
		"	6	461	10,33	-0,112	0,056	st
		PK	12	910	50	-0,419	0,044	n.st
		PK	6	954	17,72	-0,219	0,082	st
EDTA Zn	4°C	G6PD	12	436	20,87	-0,175	0,019	n.st
	"	"	5	453	18,57	-0,297	0,071	n.st
	4°C	PK	12	815	45	-0,368	0,047	n.st
	"	"	5	853	25,4	-0,308	0,181	st
Asp-Lys.	4°C	G6PD	12	431	17,68	-0,136	0,024	n.st
		"	8	440,5	11,5	-0,091	0,045	st

Tableau n°XVII : Conservation des enzymes G6PD et PK érythrocytaires dans l'hémolysat lyophilisé en présence des sels d'EDTA et d'aspartate de lysine. Estimation de la période de stabilité par régression linéaire. st.= stable ; n.st.= non stable.

- A $+4^{\circ}\text{C}$ et en présence d'aspartate de lysine et des sels d'EDTA, la diminution des activités enzymatiques G6PD et PK est plus faible mais ne permet pas une stabilité satisfaisante des enzymes. On observe une baisse significative des activités enzymatiques après 5 à 6 mois de conservation (Tableau XVII).

Les hémolysats sont additionnés, avant la lyophilisation, de lyoprotecteurs, du NADP 0,5 mmol/l, du PEP 0,5 mmol/l, du N-acétylcystéine 0,25 mmol/l et d'azide de sodium 0,01%.

En présence d'aspartate de lysine et des sels d'EDTA les deux enzymes sont stables pendant 5 à 6 mois de conservation seulement à $+4^{\circ}\text{C}$.

4.2 - TEST DE DEGRADATION ACCELEREE :

Afin d'évaluer la stabilité des lyophilisats à de basses températures, nous avons pratiqué des tests de dégradation accélérée à 22°C , 45°C et à 56°C et calculé par extrapolation la stabilité à $+4^{\circ}\text{C}$ et à -20°C .

4.2.1 - Polyalcools

Les résultats des activités enzymatiques restantes (exprimés en % par rapport à la valeur au temps zéro) des hémolysats placés aux températures de 45°C et 56°C sont présentés dans les tableaux XVIII et XIX. Ils montrent une dégradation enzymatique exponentielle en fonction du temps (figure 36).

Nous avons calculé les constantes de vitesse de dénaturation des enzymes à 22°C , 45°C et à 56°C . Par extrapolation à l'aide de l'équation d'Arrhénius, nous en avons déduit la constante de vitesse de dénaturation à $+4^{\circ}\text{C}$ et à -20°C . Ces résultats sont résumés dans les tableaux XX et XXI.

Ainsi, à partir des constantes de vitesse, nous pouvons estimer l'activité enzymatique restante après un an de conservation à $+4^{\circ}\text{C}$ ou à -20°C . Nous observons que les diminutions d'activités enzymatiques calculées à $+4^{\circ}\text{C}$ en présence de tous les lyoprotecteurs étudiés sont très faibles. Elles sont

G6PD	Lactose 10%	Saccha- rose 10%	Sorbitol 10%	Maltose 10%	Trehalose 10%	Raffinose 10%
45°C j0	100%	100%	100%	100%	100%	100%
j30	46%	83%	31%	48%	83%	78,5%
j60	30%	78%	10,5%	30,5%	79%	73%
j90	11%	58,5%	4%	15%	52,5%	48,5%
56°C j0	100%	100%	100%	100%	100%	100%
j3	50,5%	80,5%	14%	52%	82%	78,5%
j5	31,5%	71,5%	4%	37%	74%	69%
j10	11%	49%	-	13%	55,5%	47%

Tableau n°XVIII : Activité enzymatique restante de la G6PD (exprimée en % de la valeur du lyophilisat obtenue au temps j0) au cours de la conservation des lyophilisats à 45°C et à 56°C.

PK	Lactose 10%	Saccha- rose 10%	Sorbitol 10%	Maltose 10%	Trehalose 10%	Raffinose 10%
45°C j0	100%	100%	100%	100%	100%	100%
j30	75%	89%	44,5%	67%	85%	82%
j60	56%	80%	20%	45%	71%	70%
j90	45%	75%	16%	30%	58,5%	59%
56°C j0	100%	100%	100%	100%	100%	100%
j3	63%	80%	44%	47%	75%	79%
j5	45%	66%	25%	27%	63%	64%
j10	20%	43%	-	8%	35%	40%

Tableau n°XIX : Activité enzymatique restante de la PK (exprimée en % de la valeur du lyophilisat obtenue au temps j0) au cours de la conservation des lyophilisats à 45°C et à 56°C.

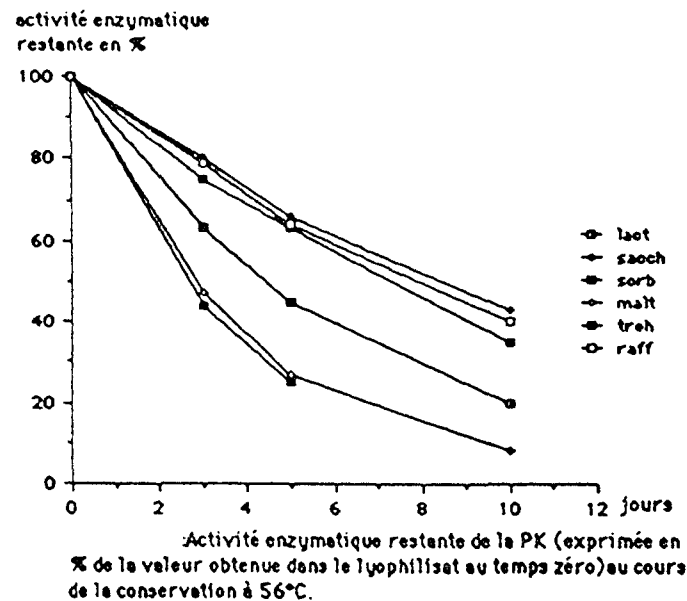
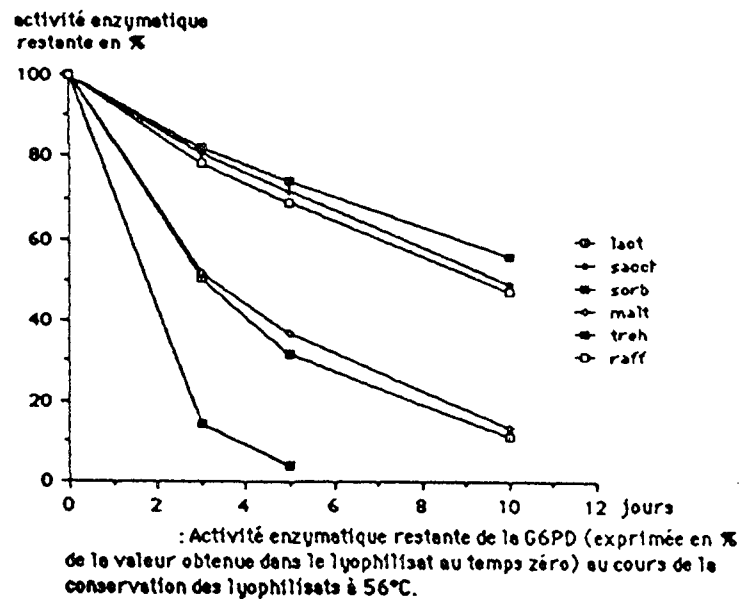
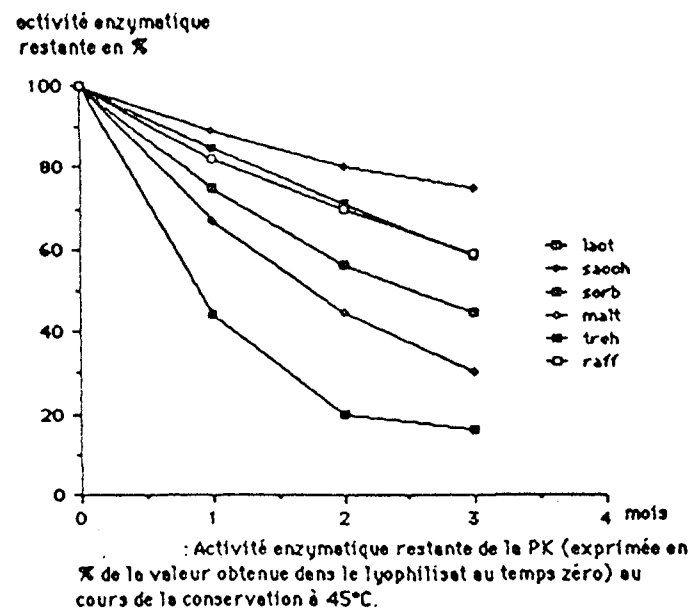
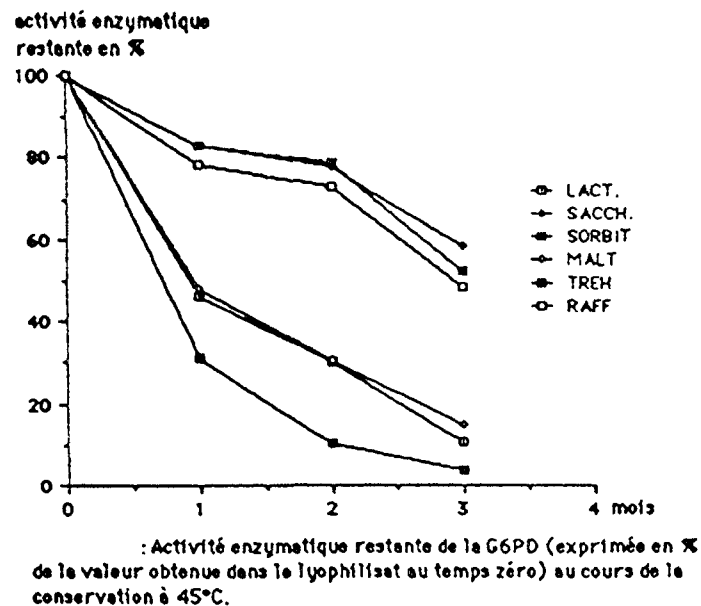


Figure 36 : activité enzymatique restante de la G6PD et de la PK en fonction du temps dans les hémolysats lyophilisés comportant du lactose, du saccharose, du sorbitol, du maltose, du trehalose ou du raffinose placés aux températures de 45°C (a et b) et 56°C (c et d).

G6PD	Lactose 10%	Saccharose 10%	Sorbitol 10%	Maltose 10%	Trehalose 10%	Raffinose 10%
k(56°C) mois ⁻¹	6,61	2,13	19,34	6,07	1,75	2,25
k(45°C) mois ⁻¹	0,705	0,167	1,074	0,614	0,2	0,224
k(22°C) mois ⁻¹	0,045	0,005	0,094	0,12	0,004	0,009
k(+4°C) mois ⁻¹ calculée	$1,91 \cdot 10^{-3}$	$1,02 \cdot 10^{-4}$	$3,19 \cdot 10^{-3}$	$9,7 \cdot 10^{-3}$	$8,7 \cdot 10^{-5}$	$2,7 \cdot 10^{-4}$
activité restante calculée après un an de conservation à +4°C en %	97,73	99,87	96,24	89	99,89	99,67
k(-20°C) mois ⁻¹ calculée	$1,74 \cdot 10^{-5}$	$3,17 \cdot 10^{-7}$	$2,4 \cdot 10^{-5}$	$2,75 \cdot 10^{-4}$	$2,48 \cdot 10^{-7}$	$1,43 \cdot 10^{-6}$
activité restante calculée après un an de conservation à -20°C en %	99,97	99,99	99,97	99,67	99,99	99,99

Tableau n°XX: Constantes de vitesse de dénaturation de la G6PD k(56°C), k(45°C), k(22°C) (exprimées en mois⁻¹) mesurées à 56°C, 45°C et à 22°C. k(+4°C) et k(-20°C) sont les constantes de vitesse de dénaturation de la G6PD calculées à partir des constantes précédentes à l'aide de l'équation d'Arrhénius.

PK	Lactose 10%	Saccharose 10%	Sorbitol 10%	Maltose 10%	Trehalose 10%	Raffinose 10%
k(56°C) mois ⁻¹	4,84	2,55	8,45	7,6	3,15	2,77
k(45°C) mois ⁻¹	0,268	0,097	0,80	0,40	0,18	0,17
k(22°C) mois ⁻¹	0,029	0,0087	0,02	0,065	0,0064	0,013
k(+4°C) mois ⁻¹ calculée	1,1.10 ⁻³	2,3.10 ⁻⁴	4,37.10 ⁻⁴	3,1.10 ⁻³	1,26.10 ⁻⁴	4,3.10 ⁻⁴
activité restante calculée après un an de conservati on à +4°C en %	98,68	99,72	99,47	96,34	99,84	99,5
k(-20°C) mois ⁻¹ calculée	1,04.10 ⁻⁵	1,31.10 ⁻⁶	1,35.10 ⁻⁶	4,27.10 ⁻⁵	3,78.10 ⁻⁷	3,1.10 ⁻⁶
activité restante calculée après un an de conservati on à -20°C en %	99,98	99,99	99,99	99,94	99,99	99,99

Tableau n°XXI : Constantes de vitesse de dénaturation de la PK: k(56°C), k(45°C), k(22°C) (exprimées en mois-1) mesurées à 56°C, 45°C et à 22°C. k(+4°C) et k(-20°C) sont les constantes de vitesse de dénaturation de la PK calculées à partir des constantes précédentes à l'aide de l'équation d'Arrhénius.

inférieures à 1 % en présence du saccharose, du tréhalose ou du raffinose pour les deux enzymes et correspondent à ce que nous avons observé au cours de la conservation à long terme à +4°C (chap.4.1).

Les diminutions d'activité de la PK observées à +4°C sont légèrement supérieures à celles calculées par extrapolation. Cela peut être dû au fait qu'à la dénaturation thermique de l'enzyme à +4°C s'ajoute un autre type de dénaturation (chimique, biologique,...) au cours de la conservation.

La dénaturation thermique des protéines diminue au fur et à mesure que la température baisse. Ainsi, les constantes de vitesse calculées à -20°C à l'aide de l'équation d'Arrhénius sont plus faibles, les diminutions d'activités enzymatiques après un an de conservation sont inférieures à 0,1 %. Ces résultats, évalués à -20°C, sont valables à une seule condition, celle que la dénaturation des protéines à -20°C soit toujours exponentielle et suive le modèle d'Arrhénius.

Nous observons, à partir de ces résultats, qu'en présence du saccharose, du trehalose ou du raffinose les lyophilisats conservés à +4°C ou à -20°C présentent des activités enzymatiques très stables de la G6PD et de la PK érythrocytaires.

4.2.2 - Aspartate de lysine - Sels d'EDTA :

Les lyophilisats préparés en présence d'aspartate de lysine et des sels d'EDTA et placés à 45°C et à 56°C montrent, comme dans le cas des polyalcools, une dégradation enzymatique exponentielle au cours de la conservation (Figure 37).

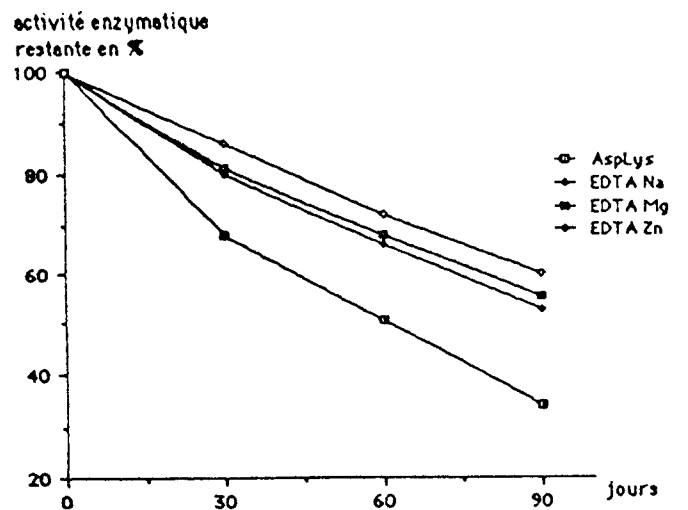
Nous avons calculé les constantes de vitesse de dénaturation des enzymes à 22°C, à 45°C et à 56°C. Par extrapolation à l'aide de l'équation d'Arrhénius, nous en avons déduit la constante de vitesse de dénaturation à +4°C et à -20°C. Ces résultats sont résumés dans les tableaux n°XXIV et XXV. A partir de ces constantes de vitesse, nous pouvons estimer l'activité enzymatique restante après un an de conservation à +4°C et à -20°C:

G6PD	Aspartate de lysine	EDTA disodium	EDTA disodium-Mg	EDTA disodium-Zn
45°C j0	100%	100%	100%	100%
j30	68%	80%	81%	86%
j60	50,5%	66%	68%	72%
j90	34%	53%	55,5%	60%
56°C j0	100%	100%	100%	100%
j3	75%	73%	81%	87%
j5	65%	63%	67%	81%
j10	45%	40%	50,5%	61%

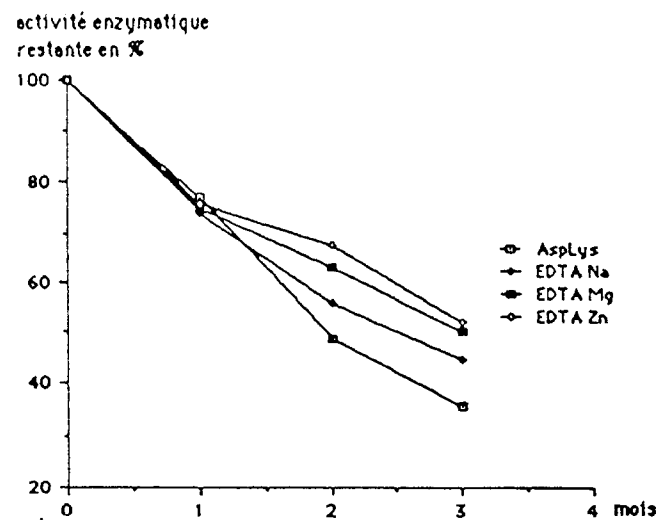
Tableau n°XXII : Activité enzymatique restante de la G6PD (exprimée en % de la valeur au temps j0) au cours de la conservation des lyophilisats à 45°C et à 56°C.

PK	Aspartate de lysine	EDTA disodium	EDTA disodium-Mg	EDTA disodium-Zn
45°C j0	100%	100%	100%	100%
j30	77%	74%	75%	76%
j60	48,5%	56%	63%	67,5%
j90	35,5%	44,5%	50%	52%
56°C j0	100%	100%	100%	100%
j3	68%	54,5%	87%	81%
j5	55%	41%	80%	72%
j10	35%	17%	64%	45%

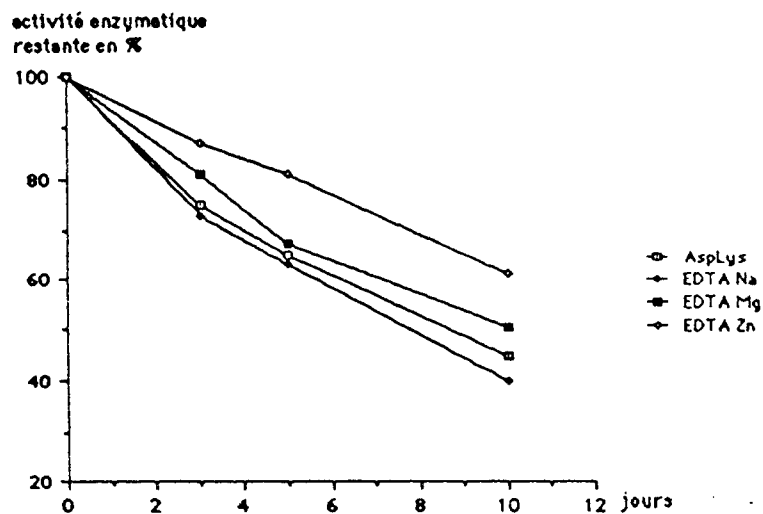
Tableau n°XXIII : Activité enzymatique restante de la PK (exprimée en % de sa valeur au temps j0) au cours de la conservation des lyophilisats à 45°C et à 56°C.



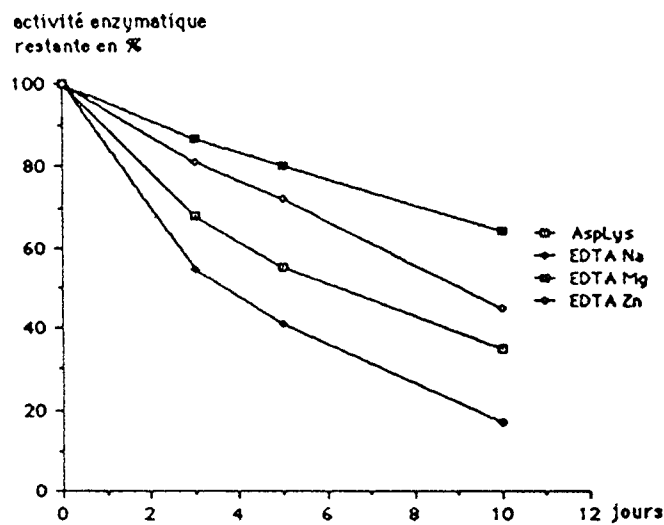
a : Activité enzymatique restante de la G6PD (exprimée en % de la valeur obtenue dans le lyophilisat au temps zéro) au cours de la conservation des lyophilisats à 45°C.



b : Activité enzymatique restante de la PK (exprimée en % de la valeur obtenue dans le lyophilisat au temps zéro) au cours de la conservation à 45°C.



c : Activité enzymatique restante de la G6PD (exprimée en % de la valeur obtenue dans le lyophilisat au temps zéro) au cours de la conservation des lyophilisats à 56°C.



d : Activité enzymatique restante de la PK (exprimée en % de la valeur obtenue dans le lyophilisat au temps zéro) au cours de la conservation à 56°C.

Figure 37 : activité enzymatique restante de la G6PD et de la PK en fonction du temps dans les hémolysats lyophilisés comportant l'EDTA disodium, l'EDTA disodium-Mg, l'EDTA disodium-Zn ou l'aspartate de lysine placés aux températures de 45°C (a et b) et 56°C (c et d).

G6PD	Aspartate de lysine	EDTA disodium	EDTA disodium-Mg	EDTA disodium-Zn
$k(56^{\circ}\text{C})$ mois^{-1}	2,36	2,72	2,06	1,5
$k(45^{\circ}\text{C})$ mois^{-1}	0,35	0,21	0,19	0,17
$k(22^{\circ}\text{C})$ mois^{-1}	0,03	0,045	0,054	0,05
$k(+4^{\circ}\text{C})$ mois^{-1} calculée	$1,9 \cdot 10^{-3}$	$3,3 \cdot 10^{-3}$	$5,2 \cdot 10^{-3}$	$5,6 \cdot 10^{-3}$
activité restante calculée après un an de conservation à $+4^{\circ}\text{C}$ en %	97,7	96,11	94	93,5
$k(-20^{\circ}\text{C})$ mois^{-1} calculée	$3,1 \cdot 10^{-5}$	$8,2 \cdot 10^{-5}$	$2,05 \cdot 10^{-4}$	$2,7 \cdot 10^{-4}$
activité restante calculée après un an de conservation à -20°C en %	99,96	99,90	99,75	99,67

Tableau n°XXIV: Constantes de vitesse de dénaturation de la G6PD : $k(22^{\circ}\text{C})$, $k(45^{\circ}\text{C})$, $k(56^{\circ}\text{C})$ (exprimées en mois^{-1}) mesurées à 22°C , 45°C et à 56°C . $k(+4^{\circ}\text{C})$ et $k(-20^{\circ}\text{C})$ sont les constantes de vitesse de dénaturation de la G6PD calculées à partir des constantes précédentes à l'aide de l'équation d'Arrhénius.

PK	Aspartate de lysine	EDTA disodium	EDTA disodium-Mg	EDTA disodium-Zn
$k(56^{\circ}\text{C})$ mois^{-1}	3,11	5,25	1,33	2,4
$k(45^{\circ}\text{C})$ mois^{-1}	0,36	0,27	0,22	0,21
$k(22^{\circ}\text{C})$ mois^{-1}	0,033	0,11	0,04	0,052
$k(+4^{\circ}\text{C})$ mois^{-1} calculée	$1,8 \cdot 10^{-3}$	$9,15 \cdot 10^{-3}$	$4,3 \cdot 10^{-3}$	$4,5 \cdot 10^{-3}$
activité restante calculée après un an de conservation à $+4^{\circ}\text{C}$ en %	97,86	89,6	95	94,7
$k(-20^{\circ}\text{C})$ mois^{-1} "calculée"	$2,6 \cdot 10^{-5}$	$3,2 \cdot 10^{-4}$	$1,7 \cdot 10^{-4}$	$1,5 \cdot 10^{-4}$
activité restante calculée après un an de conservation à -20°C en %	99,96	99,61	99,80	99,82

Tableau n°XXV: Constantes de vitesse de dénaturation de la PK (exprimées en mois^{-1}) mesurées à 22°C , 45°C et à 56°C . $k(+4^{\circ}\text{C})$ et $k(-20^{\circ}\text{C})$ sont les constantes de vitesse dénaturation calculées à partir des précédentes à l'aide de l'équation d'Arrhénius.

A $+4^{\circ}\text{C}$, la diminution de l'activité de la G6PD est comprise entre 2,5 % (Aspartate de lysine) et 6,5 % (EDTA disodium zinc) de sa valeur au temps zéro, celle de la PK est de 2,2 % (aspartate de lysine) à 10,5 % (EDTA disodium).

Ces valeurs calculées par extrapolation sont plus faibles que celles observées au cours de la conservation à $+4^{\circ}\text{C}$ (chap. 4.1). Cela peut être dû au fait qu'à la dénaturation thermique des enzymes s'ajoute un autre type de dégradation (chimique, biologique,...) au cours de la conservation à long terme à $+4^{\circ}\text{C}$.

A -20°C les diminutions d'activités enzymatiques calculées après un an de conservation sont relativement faibles (inférieures à 1 %) sous entendu que la dénaturation des enzymes soit de type exponentiel et réponde au modèle d'Arrhénius.

En présence d'aspartate de lysine et des sels d'EDTA, la diminution des activités enzymatiques G6PD et PK est faible, mais ne permet pas une stabilité satisfaisante des enzymes. Ces lyoprotecteurs sont nettement moins efficaces que les polyalcools testés précédemment.

4.3 - RECHERCHE DE LA METHEMOGLOBINE

4.3.1 - Polyalcools

Les résultats du dosage de la méthémoglobine après 13 mois de conservation à $+4^{\circ}\text{C}$ sont résumés dans le tableau n° XXVI. Les lyophilisats ont une coloration rouge et présentent un taux très faible de méthémoglobine. Ces composés sont connus comme protecteurs de l'hémoglobine (122).

	méthémoglobine (en %)
Témoin lyophilisé	73,5
Lactose	3,5
Saccharose	1,2
Sorbitol	2,3
Maltose	2,4
Trehalose	6,3
Raffinose	6

Tableau n° XXVI : Taux de méthémoglobine (en %) obtenus dans les lyophilisats après 13 mois de conservation à +4°C.

4.3.2 - Aspartate de lysine - Sels d'EDTA

Les lyophilisats préparés en présence d'aspartate de lysine et placés à +4°C conservent, contrairement au témoin, une coloration rouge après un an de conservation ; ils possèdent un taux de méthémoglobine plus faible que celui du témoin sans lyoprotecteur (Tableau XXVII). Ces taux sont plus importants que ceux trouvés en présence des polyalcools.

	Méthémoglobine (en %)
Témoin lyophilisé	65
Asp-Lysine	24
EDTA disodium	32
EDTAdisodium-Mg	18
EDTA disodium-Zn	24

Tableau n°XXVII : Taux de méthémoglobine (en %) obtenus dans les lyophilisats en présence de sels d'EDTA et d'aspartate de lysine après 13 mois de conservation à +4°C.

4.4 - AUTRES ENZYMES

D'autres enzymes d'intérêt clinique (la glutathion reductase, la glutathion peroxydase, la galactose-1-P-Uridyltransferase) ont été mesurées après 13 mois de conservation à +4°C dans les lyophilisats où la G6PD et la PK sont les plus stables (saccharose 10%, trehalose 10% et raffinose 10%).

L'activité de la glutathion reductase est incluse dans les valeurs normales. La glutathion peroxydase montre une activité normale uniquement en présence du saccharose. La galactose-1-P-Uridyltransferase, moins stable en présence du raffinose, présente une activité normale dans les lyophilisats comportant du saccharose ou du trehalose (Tableau n° XXVIII).

Ainsi le saccharose peut être utilisé comme lyoprotecteur et permet d'obtenir un contrôle lyophilisé conservé à +4°C des enzymes érythrocytaires : G6PD, PK, Glutathion réductase, Glutathion peroxydase et Galactose-1-P-Uridyltransférase.

	Glutathion réductase	Glutathion peroxydase	Galactose-1-P Uridyltransférase
Valeurs normales (n=12)	280±35mUI/100 mgHb (pH 6,6-25°C)	2±0,4UI/100mgHb (pH 7- 25°C)	21±4UI/g Hb (pH 8,7-37°C)
Temoin sans protecteur	230	0,9	2
+Saccharose	260	1,8	18,5
+Trehalose	260	1	20,5
+Raffinose	260	1,2	11

Tableau n°XXVIII : Activités catalytiques de la glutathion reductase, glutathion peroxydase et galactose.1.P Uridyltransferase des solutions lyophilisées en présence du saccharose 10%, du trehalose 10% ou du raffinose 10% après 13 mois de conservation à +4°C.

De cette étude nous constatons que les enzymes G6PD et PK sont plus stables en solutions lyophilisées en présence de lyoprotecteurs qu'en solutions liquides. Afin de permettre une plus grande utilisation de ce produit de contrôle, les solutions lyophilisées doivent rester stables quelques jours après leur reconstitution. Nous étudions ainsi dans le chapitre suivant la stabilité de la G6PD et celle de la PK après reconstitution des lyophilisats comportant le saccharose, le trehalose et le raffinose.

4.5 - STABILITE APRES RECONSTITUTION

Après reconstitution des lyophilisats avec 2 ml d'eau distillée, on obtient une solution dont la concentration en hémoglobine est de 25 g/l. Ces solutions sont ensuite conservées pendant une semaine à +4°C. Les résultats des activités enzymatiques de la G6PD et de la PK en fonction du temps sont portés sur le graphique n°38.

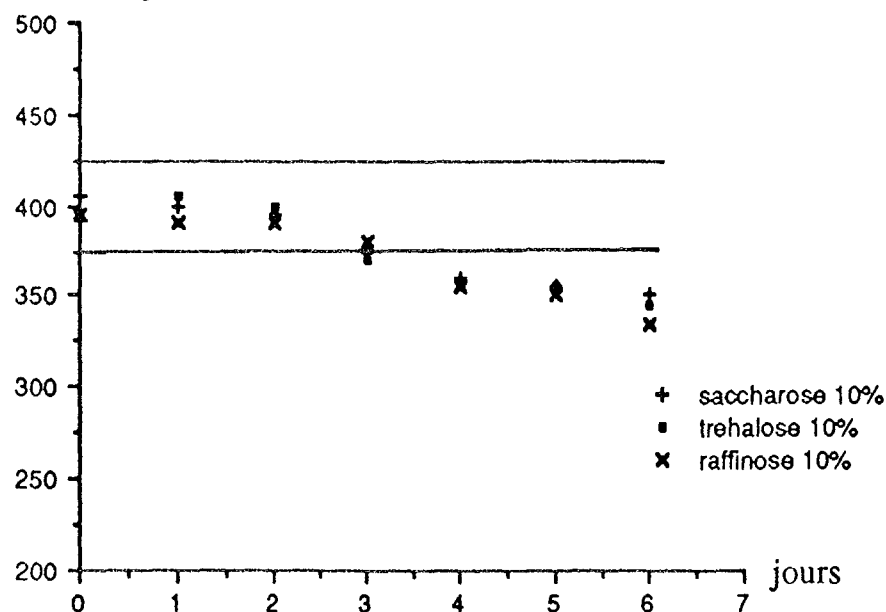
Pendant les deux premiers jours de conservation les valeurs d'activités des deux enzymes sont incluses dans le domaine de stabilité que nous avons défini comme étant égal à la valeur de l'activité obtenue au temps zéro plus ou moins deux fois l'écart type caractérisant la reproductibilité de la méthode du dosage.

Après reconstitution des lyophilisats, la G6PD et la PK sont donc stables pendant deux jours à +4°C.

Après une semaine de conservation les deux activités enzymatiques diminuent de 12% par rapport à leurs activités initiales.

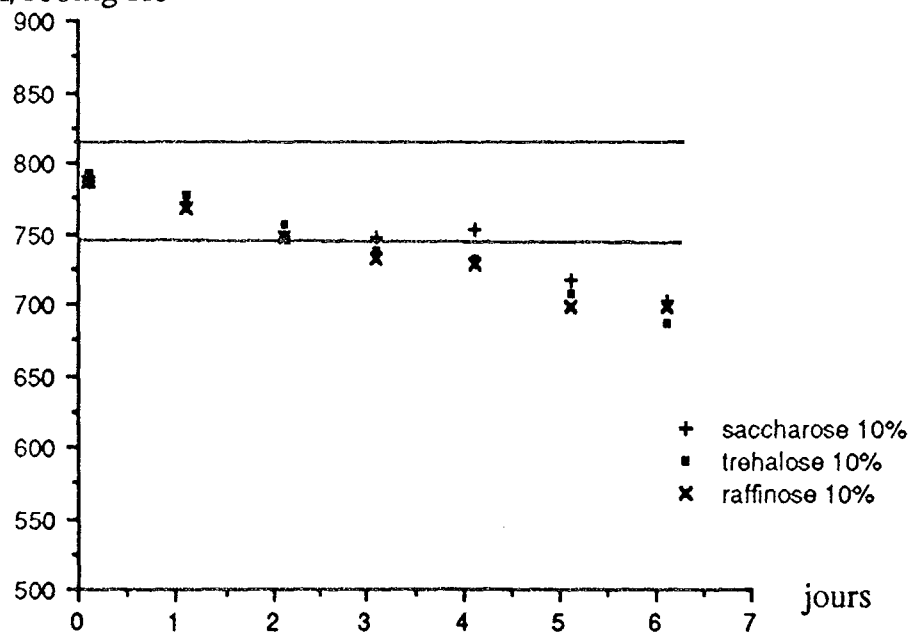
Nous avons mesuré aussi le taux de méthémoglobine dans ces solutions reconstituées, conservées une semaine à +4°C. Les résultats sont résumés dans le tableau n°XXIX. Les trois solutions comportant le saccharose, le trehalose ou le raffinose gardent une coloration rouge au cours de cette période de conservation ; elles présentent des taux maxima de 12% de méthémoglobine.

mUI/100mg Hb



a : conservation à +4°C de la G6PD d'un hémolysat reconstitué comportant le saccharose, le trehalose ou le raffinose.

mUI/100mg Hb



b : conservation à +4°C de la PK d'un hémolysat reconstitué comportant le saccharose, le trehalose ou le raffinose.

Figure 38 : Conservation d'un hémolysat reconstitué contenant le saccharose, le trehalose ou le raffinose. a : étude de la G6PD
b : étude de la PK.

	Méthémoglobine en %
saccharose	7,5
trehalose	11,87
raffinose	8

Tableau n°XXIX: Taux de méthémoglobine obtenus après une semaine de conservation à +4°C dans les lyophilisats reconstitués.

Les enzymes en solution après reconstitution sont nettement moins stables que dans les solutions liquides étudiées précédemment (chap.3). Cela peut être dû au fait que ces solutions reconstituées sont très diluées. En effet, les lyoprotecteurs ont été ajoutés à une concentration de 10% avant la lyophilisation pour une concentration en hémoglobine de 80 g/l. La reconstitution réalisée aboutit à une concentration d'hémoglobine de 25 g/l afin d'effectuer correctement les dosages enzymatiques. Dans ce milieu très dilué les enzymes sont moins stables qu'en solution concentrée en présence d'hydrocarbures (polyalcools, acides aminés et dérivés) et notamment en présence de sucres. D'autre part, ces solutions ne sont pas stériles ; la dénaturation des enzymes dans ces solutions est plus importante que dans des solutions stériles. Ainsi, l'apport d'une solution de reconstitution comportant des concentrations satisfaisantes de polyalcools et d'agents bactériostatiques pourrait être envisagée dans un autre travail.

4.6 DISCUSSION

La structure de l'eau est un facteur primordial dans la conformation d'une protéine. L'extraction de cette eau par cryodessiccation (ou lyophilisation) augmente la stabilité des protéines. Cependant une dessiccation très poussée peut altérer la couche d'hydratation entourant la protéine et conduire à sa dénaturation.

La lyophilisation de l'hémolysat réalisée sans protecteurs conduit à une dénaturation de la molécule d'hémoglobine qui se traduit par une oxydation importante en méthémoglobine et à une baisse d'activité enzymatique de la G6PD et de la PK. La réhydratation du lyophilisat se fait très lentement.

La lyophilisation est le plus souvent pratiquée en présence de composés lyoprotecteurs. Les polyalcools que nous avons utilisés, en majorité des sucres, sont parmi les lyoprotecteurs les premiers identifiés et les plus efficaces contre la dénaturation des enzymes et de l'hémoglobine. Après lyophilisation, les hémolysats en présence d'additifs gardent une coloration rouge, sont faciles à reconstituer et ne montrent qu'une très faible baisse des activités enzymatiques de la G6PD et de la PK.

Les effets protecteurs du saccharose, du trehalose et du raffinose sont plus importants que ceux du lactose, du maltose ou du sorbitol. Le mécanisme de protection de ces composés au cours de la lyophilisation est encore inconnu.

Timascheff et coll. ont montré que la stabilisation par de nombreux protecteurs en solution aqueuse est due à l'exclusion de ces composés de la surface de contact de la protéine. Celle-ci devient préférentiellement hydratée. L'effet lyoprotecteur peut-il s'expliquer par ce même mécanisme: Les composés stabilisateurs, en renforçant la couche d'hydratation des protéines, empêcheraient une très forte dessiccation au cours de la lyophilisation.

Le glycérol et le TMAO, testés à des concentrations respectivement de 5 % (v/v) et 0,5 mol/l, ne montrent pas

d'effets lyoprotecteurs des enzymes ni de l'hémoglobine. Il y' a apparition en quantité très importante de méthémoglobine et une diminution des activités enzymatiques. Des résultats identiques sont obtenus par d'autres auteurs lors de l'étude de la phosphofructokinase en présence du TMAO.

On observe donc qu'au cours de la lyophilisation, d'autres phénomènes interviennent. Ils sont liés notamment aux propriétés physiques des molécules actives et aux modifications qu'elles apportent à celles du milieu à lyophiliser (123, 127).

Les sels d'EDTA et l'aspartate de lysine ont un effet lyoprotecteur plus faible que celui des sucres. Leur effet protecteur peut être lui aussi expliqué par un renforcement de la couche d'hydratation autour des protéines, ou bien par les modifications des propriétés physiques du milieu.

Le mannitol, le Ficoll 70 et l'albumine sont connus par leurs effets lyoprotecteurs. *Ces composés sont inefficaces dans la conservation des activités enzymatiques de la G6PD et de la PK.* Nous remarquons donc que l'effet lyoprotecteur d'un composé dépend non seulement de la nature de ce composé mais aussi de l'enzyme étudiée. En effet, nous avons vu que la G6PD en solution lyophilisée en présence des sucres est généralement plus stable que la PK. Cette différence peut être liée à la différence de composition en acides aminés des deux enzymes : la G6PD étant plus hydrophile, la PK plus hydrophobe. Au cours de la congélation, nous avons fait la même constatation: la G6PD est plus stable que la PK. Ce procédé de conservation correspond en fait à la première étape de la lyophilisation. Nous pouvions nous attendre à un effet lyoprotecteur de certains composés cryoprotecteurs. C'est le cas du saccharose mais il n'en est pas de même pour le TMAO ou le glutamate de sodium.

5 - PROPRIETES CATALYTIQUES ET PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES

La stabilité et un comportement identique aux échantillons cliniques sont les deux propriétés primordiales d'une solution de contrôle. Après avoir défini les meilleurs conservateurs de la G6PD et de la PK érythrocytaires, nous étudions dans ce chapitre quelques propriétés catalytiques des deux enzymes érythrocytaires concernées par cette étude (G6PD et PK) en présence des composés protecteurs que nous avons identifiés précédemment. L'étude porte sur les hémolysats liquides comportant le saccharose 20 % et le TMAO 1 mol/l ainsi que les hémolysats lyophilisés en présence de saccharose 10%, de tréhalose 10% et de raffinose 10%. Les propriétés catalytiques de ces solutions sont comparées à celles d'hémolysats témoins sans protecteurs.

5.1 - GLUCOSE-6-PHOSPHATE DESHYDROGENASE (G6PD)

De nombreux auteurs étudient les propriétés de cette enzyme préalablement purifiée ou semi-purifiée afin d'identifier ses variantes. Dans ce travail, l'étude des propriétés cinétiques est faite directement sur les hémolysats comportant les protecteurs ainsi que sur les hémolysats témoins sans produits de conservation. Nous avons étudié parallèlement les propriétés catalytiques de la solution de contrôle enzymatique de la G6PD commercialisée par SIGMA.

La constante K_m de la G6PD est déterminée en utilisant les mêmes concentrations de réactifs que celles utilisées pour le dosage et en faisant varier la concentration du G6P entre 0,02 mmol/l et 2 mmol/l. Le pH optimum est déterminé en faisant varier le pH du tampon entre 6,5 et 9,5. Les différentes solutions sont testées en présence des analogues de substrat : le galactose-6-phosphate et le 2-desoxyglucose-6-P utilisés à une concentration de 2 mmol/l ; les activités enzymatiques sont exprimées en pourcentage par rapport à l'activité en présence du substrat naturel, le glucose-6-P. Enfin, ces solutions sont testées à

l'aide d'une autre méthode de dosage, celle recommandée par le C.I.S.H. décrite au chap.I.

5.1.1- Constante de Michaelis - Vitesse maximale

Ces deux paramètres ont été calculés à l'aide des courbes de Lineweaver et Burk.

La K_m d'un témoin liquide est variable d'un hémolysat à l'autre ; elle est en moyenne de 25,4 mmol/l ($\sigma = 5,5$; $n = 16$). En ajoutant un protecteur aux hémolysats liquides et lyophilisés, on observe une très faible variation de K_m (Tableau n°XXX). Cette constante a une tendance à augmenter indiquant une diminution d'affinité pour le substrat mais cette variation est non significative.

En présence d'un protecteur, la vitesse maximale a tendance à diminuer (Tableau n°XXX). Cette diminution est très significative en présence de saccharose 20 % en solution liquide ($p > 95\%$), elle est par contre non significative en présence de TMAO 1mol/l et dans les solutions lyophilisées.

La G6PD de la solution de contrôle SIGMA montre une plus grande K_m (66,5 $\mu\text{mol/l}$) et une vitesse maximale très supérieure aux valeurs normales (770 mUI/100 mgHb).

5.1.2- pH optimum

Le pH optimum d'un hémolysat témoin sans protecteur est compris entre 7,5 et 8 ; il reste invariable après addition des protecteurs aussi bien dans les solutions liquides que dans les solutions lyophilisées (Tableau n°XXX). Le pH optimum de la solution SIGMA est nettement plus alcalin, il est compris entre 9 et 9,5.

5.1.3- Analogues du substrat

Dans l'hémolysat témoin sans protecteur, en remplaçant le glucose-6-P par le galactose-6-P ou le 2-desoxyglucose-6-P, l'activité de la G6PD diminue ; elle conserve 20,7% de son activité

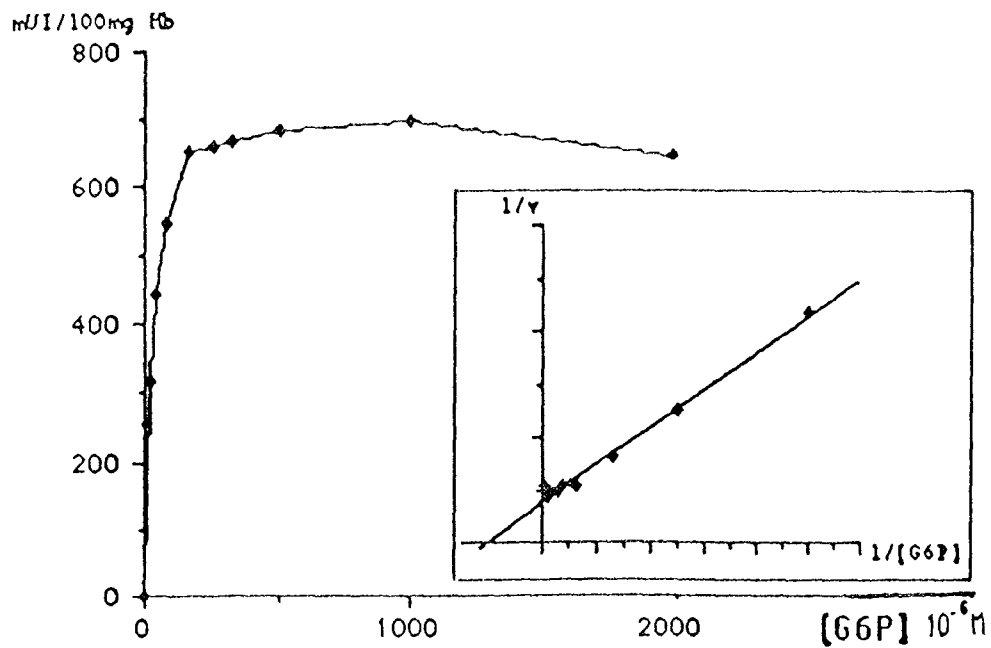


Figure 39 : activité enzymatique de la G6PD en fonction de la concentration du substrat (glucose 6-phosphate) dans un hémolysat témoin sans conservateurs. En encadré : courbe des inverses de Linweaver et Burck.

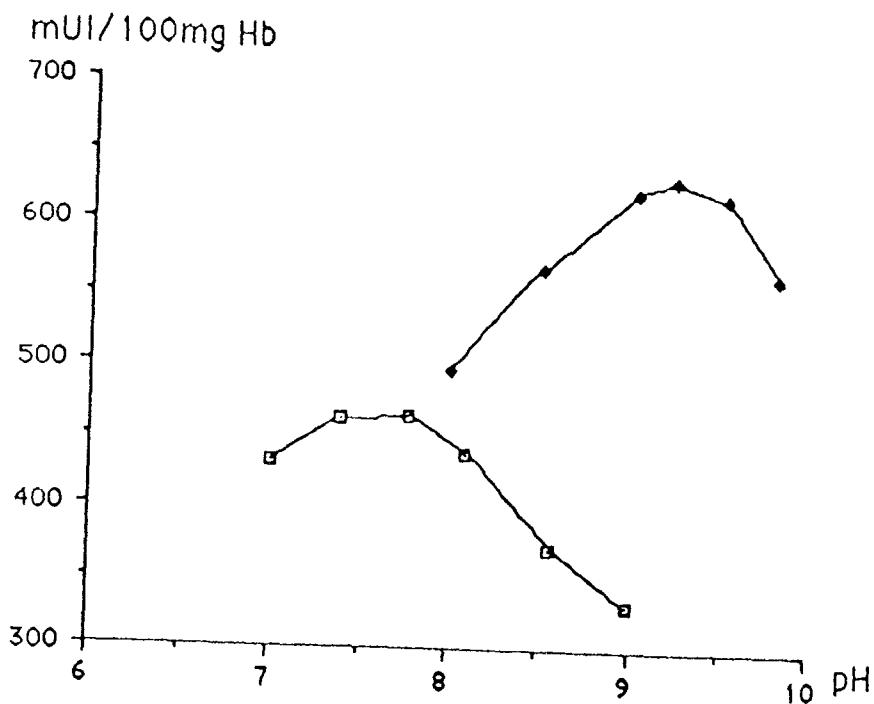


Figure 40 : activité enzymatique de la G6PD en fonction du pH.
a: hémolysat témoin sans conservateur (□—□) ; b: solution Sigma (◆—◆).

G6PD	Km(10^{-6} mol/l)				Vm(mUI/100mg Hb)				pH optimum
	m	s	t	p	m	s	t	p	
Temoin sans protecteur(n=16)	25,4	5,56			505	113			7,5 - 8
Saccharose 20% (n=16)	26,11	6,36	-0,61	n.s	465	91	3,12	s	7,5 - 8
TMAO 1mol/l (n=16)	26,27	5,74	-0,77	n.s	490	105	1,9	n.s	7,5 - 8
Temoin liquide sans protecteur (n= 6)	26,7	4,96			480	52,21			7,5 - 8
Saccharose 10% (n= 6)	25,35	5,85	-0,96	n.s	445	57,42	-0,12	n.s	7,5 - 8
Trehalose 10% (n= 6)	27,67	5,15	-1,18	n.s	452,5	40	0,16	n.s	7,5 - 8
Raffinose 10% (n= 6)	25,78	4,6	-1,09	n.s	437,5	53,5	0,03	n.s	7,5 - 8

s=variation significative

n.s=variation non significative

Tableau n°XXX : Constantes catalytiques de la G6PD mesurées dans les hémolysats liquides en présence du saccharose20% ou du TMAO 1mol/l et dans les hémolysats lyophilisés en présence du saccharose 10%, du trehalose 10% ou du raffinose 10%.

initiale en présence du galactose-6-P et 13% en présence du 2-desoxyglucose-6-P.

Lorsqu'on ajoute des protecteurs à l'hémolysat en solution liquide ou en solution lyophilisée, l'activité de la G6PD en présence de ces deux analogues de substrat diminue légèrement (Tableau n°XXXI).

Ces deux composés sont très faiblement utilisés par la G6PD du contrôle SIGMA. L'activité restante est de 2,5 % et 0,5 % respectivement en présence du galactose-6-P et du 2-desoxyglucose-6-P.

5.1.4- Commutabilité

Les différents hémolysats comportant les protecteurs sont testées à l'aide de deux méthodes de dosage : celle utilisée dans notre travail (méthode de Cartier) et celle recommandée par le Comité International de Standardisation en Hématologie (chap. I). Les dosages effectués sur des témoins sans protecteurs montrent qu'entre les deux méthodes il existe un facteur de conversion égal à 1,9. Ce facteur varie légèrement en présence des différents protecteurs dans les hémolysats conservés sous forme liquide ou lyophilisée (Tableau n°XXXII). Il est à remarquer que ce facteur est plus faible pour la solution de contrôle SIGMA (1,29).

G6PD	Galactose-6-P		2 desoxyglucose-6-P	
	m	σ	m	σ
(n=4) Temoin sans protecteur	20,75%	2,5	12,95%	2
Saccharose 20%	20,1%	0,88	11,72%	1,93
TMAO 1mol/l	20,4%	1,78	12,8%	1
(n=4) Saccharose 10%	20,07%	2,5	11,44%	1,58
Trehalose 10%	18,46%	3,85	11,05%	2,66
Raffinose 10%	18,38%	3,36	10,7%	2,36
Solution SIGMA	2,5%	0,36	0,55%	0,1

Tableau n°XXXI : Activité catalytique de la G6PD en présence d'analogues de substrat exprimée en pourcentage d'activité par rapport à l'activité en présence du substrat naturel (le glucose6P).

	methode de Cartier (25°C)		methode du C.I.S.H.(37°C)		rapport
	m	σ	m	σ	
(n=5) Temoin sans protecteur	487,	36,86	950	64,8	1,94
Saccharose20%	472,5	35,4	843,6	83,7	1,78
TMAO 1 mol/l	482,5	39,4	964	89,7	1,99
(n=4) Saccharose10%	440,75	9,44	852,5	16	1,93
Trehalose 10%	435	9,2	850	18,2	1,95
Raffinose 10%	440	6,12	852,5	15,2	1,93
Solution SIGMA	772,5	83,4	998,5	21,3	1,29

Tableau n° XXXI :Rapports des activités catalytiques de la G6PD des hémolysats liquides et lyophilisés mesurées par la méthode de Cartier et col. (48) et celle préconisée par le C.I.S.H. (15).

5.2 - PYRUVATE KINASE

L'étude cinétique de l'enzyme est faite uniquement sur les hémolysats avec et sans conservateurs. A notre connaissance il n'existe pas de solution de contrôle pour le dosage de la PK érythrocytaire comme c'est le cas pour la G6PD. Les constantes K_m et V_m sont déterminées en utilisant les mêmes concentrations des réactifs que pour son dosage et en faisant varier la concentration du PEP entre $125 \cdot 10^{-3}$ mmol/l et 4 mmol/l. Les pH optimum sont déterminés en faisant varier le pH du tampon entre 5,5 et 9. Les différentes solutions ont été testées en présence et en l'absence de fructose diphosphate 20 μ mol/l. L'activité PK de ces solutions a été mesurée à l'aide d'une autre méthode de dosage, celle recommandée par le C.I.S.H. décrite au chap. I.

5.2.1- Constante de Michaelis (K_m)- Vitesse maximale (V_m):

Les dosages réalisés directement sur un hémolysat montrent une courbe de vitesse en fonction du substrat hyperbolique de type rectangulaire, alors qu'il a été montré que l'enzyme purifiée possède une cinétique allostérique. La K_m a été déterminée à l'aide de la courbe des inverses de Lineweaver et Burk. Les droites de régression linéaires sont tracées à l'aide d'un ordinateur. La K_m , très variable d'un hémolysat à l'autre, est en moyenne de 0,23 mmol/l ($\sigma = 0,1$; $n = 7$). En ajoutant un protecteur aux solutions liquides ou lyophilisées, on n'observe pas de variation de la K_m alors que la vitesse maximale a tendance à diminuer ; cette diminution est cependant non significative (Tableau n°XXXIII).

5.2.2- pH optimum

Le pH optimum d'activation de la PK érythrocytaire est légèrement acide, il est compris entre 6 et 6,5 ; contrairement à celui de la G6PD qui est légèrement alcalin. Il reste invariable en

ajoutant un protecteur aux solutions liquides ou aux solutions lyophilisées.

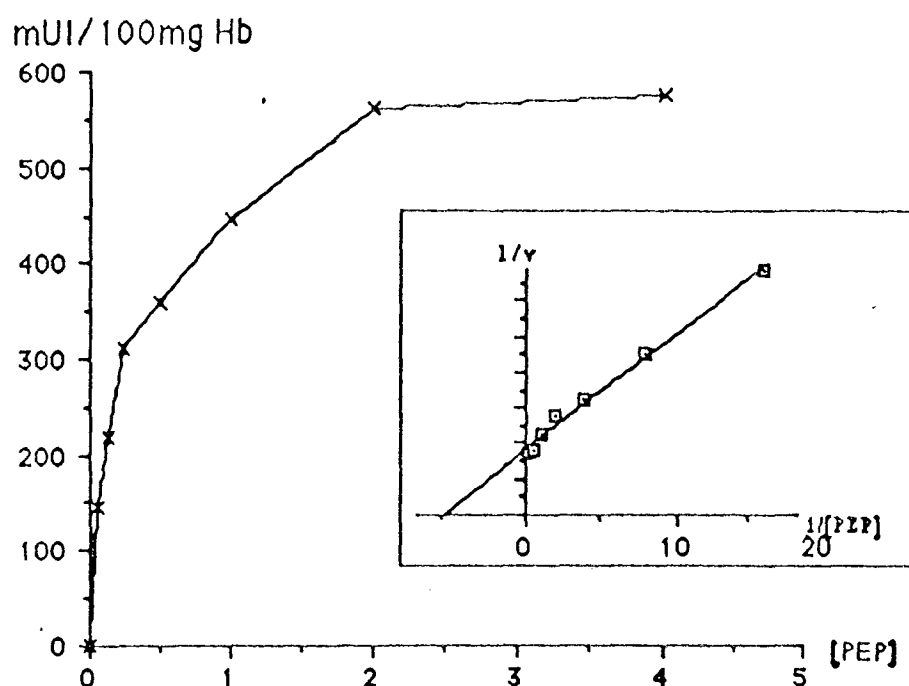


Figure 41 : activité enzymatique de la PK en fonction de la concentration du substrat (PEP) dans un hémolysat témoin sans conservateurs. En encadré : courbe des inverses de Linweaver et Burck.

Pyruvate kinase	Km (mmol/l)				Vm(mUI/100mgHb)				pH optimum
	m	σ	t	p	m	σ	t	p	
(n= 7)									
Temoin sans protecteur	0,23	0,1			830	185	-	-	6 - 6,5
Saccharose 20%	0,21	0,08	0,56	n.s	723	82,75	2,19	n.s	6 - 6,5
TMAO 1mol/l	0,25	0,09	0,85	n.s	747	132	1,4	n.s	6 - 6,5
Temoin sans protecteur (non lyophilisé)	0,28	0,05			790	62,5	-	-	6 - 6,5
Saccharose 10%	0,3	0,02	0,49	n.s	762	76	1,17	n.s	6 - 6,5
Trehalose 10%	0,29	0,04	-1,12	n.s	740	92	1,07	n.s	6 - 6,5
Raffinose 10%	0,31	0,05	-2,23	n.s	757	72	1,2	n.s	6 - 6,5

n.s= variation non significative

Tableau n° XXXIII: Constantes catalytiques de la pyruvate kinase mesurées dans les hémolysats liquides (saccharose 20%, TMAO 1mol/l) et dans les hémolysats lyophilisés (saccharose 10%, trehalose 10% et raffinose 10%).

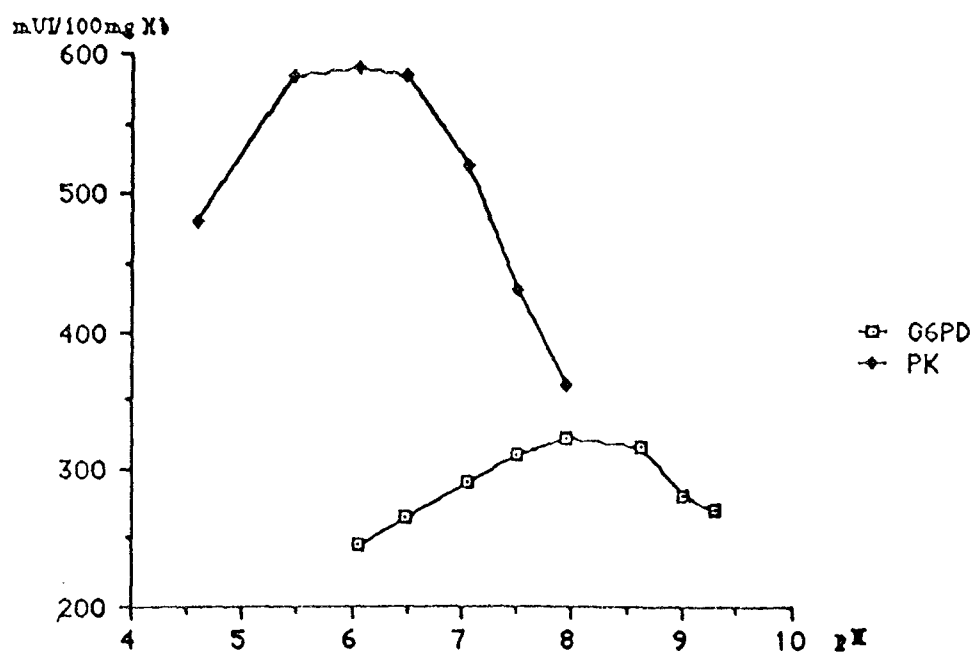


Figure 42 : activité enzymatique de la G6PD et de la PK en fonction du pH dans un hémolysat témoin sans conservateurs.

5.2.3- Activation par le fructose diphosphate

La PK a été mesurée en présence et en l'absence du fructose 1,6 diphosphate 20 mmol/l ainsi que de faibles concentrations de substrats (PEP 0,2 mmol/l- ADP 0,5 mmol/l). L'activité enzymatique dans les hémolysats témoins augmente d'environ 47% en présence du fructose diphosphate. Cette augmentation est plus faible dans les solutions de contrôle comportant les protecteurs (Tableau XXXIV).

5.2.4- Commutabilité

L'étude faite sur des témoins sans protecteur montre un facteur de conversion entre les deux méthodes de dosage voisin de 1,1. Ce facteur varie peu en présence de protecteurs aussi bien en solutions liquides qu'en solutions lyophilisées (Tableau XXXV).

5.3 - VISCOSITE

Nous avons déterminé la viscosité des hémolysats liquides et des hémolysats lyophilisés (ayant été reconstitués) à l'aide d'un viscosimètre Low shear 30 (à 37°C). Les résultats sont résumés dans le tableau n°XXXVI:

Les hémolysats liquides comportant le saccharose 20% ou le TMAO 1mol/l montrent des viscosités relativement plus grandes que celle de l'hémolysat témoin sans conservateur (de 1,30 et 1 cP). Ces viscosités sont néanmoins plus faibles que celles des hémolysats comportant du glycérol 20% ou 30% souvent utilisé dans la stabilisation des protéines.

Les hémolysats lyophilisés en présence du saccharose 10% du tréhalose 10% ou du raffinose 10% montrent après leur reconstitution des viscosités légèrement supérieures à celle du témoin sans protecteur.

Pyruvate Kinase	Activation par le FDP 20 μ mol/l (en %)	
	m	σ
(n=4)		
Temoin sans protecteur	46,77	4,04
Saccharose 20%	42,97	1,67
TMAO 1mol/l	42,78	2,9
Saccharose 10%	40,63	2,04
Trehalose 10%	41,75	2,3
Raffinose 10%	42,76	2,95

Tableau n°XXXIV : Activation de la pyruvate kinase par le fructose 1.6-diphosphate 20 μ mol/l (FDP) dans les hémolysats liquides en présence du saccharose 20% ou du TMAO 1mol/l et dans les hémolysats lyophilisés en présence du saccharose, du tréhalose ou du raffinose 10%.

Pyruvate Kinase	méthodes de dosage				Rapport
	Cartier (25°C)		CISH (37°C)		
	m	σ	m	σ	
(n= 4)					
Temoin sans protecteurs	800	53	867	36	1,08
Saccharose 20%	743	61	850	32,5	1,14
TMAO 1mol/l	762	67,5	846	59	1,10
Saccharose 10%	760	23,2	840	9,6	1,10
Trehalose 10%	760	16,2	834	12,4	1,09
Raffinose 10%	745	14,4	833	16	1,11

Tableau n°XXXV : Activité catalytique de la PK mesurée par la méthode de Cartier et col. (25°C) et par la méthode du C.I.S.H.(37°C).

		viscosité η (37°C) mPa.s (cP)
Hémolysat témoin		0,80
Solutions liquides	Saccharose 20%	1,30
	Glycérol 20%	1,63
	Glycérol 30%	2,37
	TMAO 1mol/l	1,00
Solutions lyophilisées	Saccharose 10%	0,92
	Trehalose 10%	0,93
	Raffinose 10%	0,97

Tableau n° XXXVI : mesure de la viscosité des hémolysats liquides contenant le saccharose, le TMAO ou le glycérol et des hémolysats lyophilisés contenant le saccharose, le trehalose ou le raffinose.

5.4 - DISCUSSION

Après avoir défini les meilleurs conservateurs de la G6PD et de la PK érythrocytaires, nous avons étudié les propriétés catalytiques de ces enzymes dans les hémolysats comportant le saccharose 20 % ou le TMAO 1 mol/l ainsi que dans les hémolysats lyophilisés en présence de saccharose 10%, de tréhalose 10% ou de raffinose 10%.

Dans les hémolysats témoins sans protecteurs, la G6PD possède une cinétique de Michaelis-Menten. En ajoutant un protecteur aux hémolysats liquides ou lyophilisés, on observe une très faible augmentation de la K_m . La vitesse maximale de l'enzyme montre une diminution non significative (sauf en présence du saccharose 20 % en solution liquide).

La PK d'un hémolysat témoin présente une courbe de vitesse en fonction du substrat hyperbolique de type rectangulaire témoignant d'une cinétique de Michaelis-Menten. Cependant les études faites par différents auteurs qui ont travaillé sur l'enzyme purifiée montrent une cinétique allostérique. La représentation $1/v$ en fonction de $1/S$ dans l'hémolysat est en général une droite. La constante de Michaelis (K_m) est variable d'un hémolysat à l'autre. Elle est en moyenne de 0,25 mmol/l. Ces résultats sont en accord avec ceux de Boivin et col. (25) qui ont étudié cette enzyme dans l'hémolysat. Ils montrent, que dans tous les hémolysats étudiés, en l'absence d'effecteurs, la courbe de vitesse de la réaction en fonction de la concentration en PEP a aussi l'aspect général d'une hyperbole selon la représentation de Michaelis-Menten avec une K_m comprise entre 0,12 et 0,22 mmol/l. Selon les auteurs la valeur de $K_{0.5}$ dans les préparations purifiées est très variable comme dans le cas de la G6PD et dépend de la méthode et du degré de purification de l'enzyme et des conditions du dosage.

En ajoutant un agent protecteur dans les hémolysats liquides ou lyophilisés, on n'observe pas de variation significative

du K_m de la PK ; la vitesse maximale d'activité a tendance à diminuer. Cependant des tests statistiques montrent que cette diminution n'est pas significative.

Ainsi, l'ajout de protecteurs n'apporte pas de variations significatives des K_m et des V_m des deux enzymes sauf en présence du saccharose 20% en solution liquide. Généralement les K_m ont tendance à augmenter tandis que les vitesses maximales ont tendance à diminuer. Cela signifie que ces protecteurs exercent une sorte d'inhibition compétitive sur les activités catalytiques des deux enzymes. Le même effet a été observé (156) avec le glycérol 30 % testé en présence de différentes enzymes. La variation des constantes catalytiques en présence de ces protecteurs peut être liée à l'hydratation de la molécule protéique, à la viscosité ou à la constante diélectrique du milieu. L'augmentation de l'hydratation de la protéine en présence des stabilisateurs crée une tension dans la molécule protéique native qui serait à l'origine de la diminution de son activité.

En présence du saccharose 20% la variation de la viscosité est très importante ; elle est moins importante en présence du TMAO et dans les lyophilisats reconstitués. Ces hémolysats présentent tous des viscosités plus faibles par rapport à celle d'un hémolysat en présence du glycérol aux concentrations généralement utilisées pour la stabilisation des enzymes (20-30 %).

Il a été montré qu'il n'existe pas de corrélation entre la constante diélectrique du milieu et la variation des constantes catalytiques des enzymes même dans les systèmes où les interactions électrostatiques enzyme-substrat sont les plus dominants. L'effet d'un cosolvant par contre se prononce plus dans des systèmes où les interactions enzyme-substrat sont essentiellement hydrophobes (144).

Nous avons étudié d'autres propriétés catalytiques des enzymes, notamment l'activité en fonction du pH, l'activité de la G6PD en présence des analogues de substrat et l'activité de la PK en présence d'un activateur allostérique, le fructose 1,6 diphosphate. *Nous constatons que, dans tous les cas, en utilisant*

les méthodes de dosages de Cartier et col., les hémolysats contenant les protecteurs ont un comportement identique à celui d'un hémolysat sans protecteurs.

Dans les hémolysats liquides et lyophilisés comportant les protecteurs, le rapport d'activité entre deux méthodes de dosage est le même que celui d'un témoin en l'absence de protecteurs.

D'autre part, les propriétés catalytiques de la G6PD des hémolysats ont été comparées à celles de la solution de contrôle SIGMA. Nous constatons que la G6PD de cette solution possède une K_m plus grande, un pH optimum d'activité plus alcalin (9-9,5), une commutabilité différente de celle d'un hémolysat sans protecteurs et enfin, elle ne possède qu'une très faible affinité pour les analogues du substrat étudiés (galactose-6-phosphate et le 2-desoxyglucose-6-phosphate). Ces propriétés catalytiques différentes sont dues à l'origine exogène de l'enzyme. Cette solution est préparée, en effet, à partir d'un hémolysat humain auquel est ajoutée une enzyme bactérienne s'identifiant ainsi à celle décrite par Bonderman et col. (28). Cette solution, sous forme lyophilisée, présente des propriétés catalytiques différentes de celles de l'enzyme humaine.



IV - CONCLUSION

L'apport constant de residents étrangers en France et la mobilité accrue des populations en général font que les laboratoires d'analyses biologiques sont confrontés de plus en plus au diagnostic des érythroenzymopathies, examen délicat en l'absence de tout contrôle.

Ceci nous a amené à rechercher un matériel de contrôle pour la détermination des déficits enzymatiques érythrocytaires les plus fréquents, la G6PD et la PK en particulier.

Nos résultats expérimentaux ont permis de stabiliser, par différentes méthodes, les enzymes endogènes d'un hémolysat humain à l'aide de protecteurs communément utilisés pour les enzymes et l'hémoglobine et ainsi de préparer une solution liquide prête à l'emploi et une solution lyophilisée. Les résultats peuvent être classés en trois rubriques principales:

1 - Solution de contrôle prête à l'emploi :

Les solutions liquides ont l'avantage d'éliminer les problèmes liés à la reconstitution et offrent une meilleure reproductibilité mais elles sont souvent moins stables que les solutions lyophilisées.

Afin de sélectionner les différents "protecteurs" nous avons testé, dans une première approche, plusieurs composés appartenant à différentes classes chimiques et avons mesuré leur effet protecteur aux températures de 50°C pour la G6PD et de 56°C pour la PK lorsqu'ils sont ajoutés à l'hémolysat à différentes concentrations.

Dans un deuxième temps, nous avons effectué des conservations à long terme, à +4°C et à -20°C, avec les "protecteurs" choisis précédemment et ajoutés à l'hémolysat. Ces résultats sont résumés dans le tableau suivant :

Protecteurs		Stabilité de la G6PD (en mois)		Stabilité de la PK (en mois)	
		+4°C	-20°C	+4°C	-20°C
NADP 0,5 mmol/l	+ glycérol 30%	7	13		
	+ éthylène glycol 20%	7	13		
	+ DMSO 10%	7	13		
	+ DMF 5%	9	n.st.		
PEP 0,5 mmol/l GSH 0,1 mmol/l	+ glycérol 20%			9	12
	+ éthylène glycol 30%			9	12
	+ DMSO 15 %			9	12
NADP 0,5 mmol/l PEP 0,5 mmol/l GSH 0,1 mmol/l	+ saccharose 20%	12	12	6	9
	+ sorbitol 20%	n.st.	9	5	9
	+ alanine 0,5 mol/l	8	12	n.st.	10
	+ glutamate de Na 0,5 mol/l	n.st.	12	n.st.	9
	+ aspartate de Mg 0,5 mol/l	n.st.	12	n.st.	10
	+ proline 0,5 mol/l	n.st.	5	n.st.	n.st.
	+ TMAO 1 mol/l	9	12	12	12
	+ sarcosine 1 mol/l	10	12	4	9

Durée de stabilité des enzymes en présence de différents protecteurs.
n.st.= non stable.

Dans nos conditions expérimentales, plusieurs types d'associations de protecteurs peuvent être retenus et ajoutés à un hémolysat pour réaliser un contrôle de la G6PD et PK erythrocytaires (associations comportant du saccharose, du TMAO, du sorbitol, de l'alanine, du glutamate de sodium, de l'aspartate de magnésium, ou de la sarcosine).

Des enzymes d'intérêt clinique (la glutathion réductase, la glutathion peroxydase, la galactosyl-phosphate uridyl transferase) ont été mesurées après 13 mois de conservation dans ces hémolysats. Nous avons constaté que dans nos conditions opératoires seuls le glutamate de sodium et l'aspartate de magnésium ont un effet protecteur à -20°C mais la stabilité de ces enzymes en solution liquide et congelée pourrait certainement être améliorée par addition de leurs substrats et coenzymes.

2 - Solution de contrôle lyophilisée :

Les hémolysats lyophilisés sans précaution montrent une diminution nette des activités enzymatiques et la formation en quantité importante de méthémoglobine.

Nous avons étudié plusieurs lyoprotecteurs déjà connus pour stabiliser les enzymes ou l'hémoglobine (polyalcools, sels d'acides aminés et sels d'EDTA) combinés à des composés protecteurs utilisés à faibles concentrations (NADP⁺ 0,5 mmol/l, PEP 0,5 mmol/l, N-acétylcystéine 0,25 mmol/l, azide de sodium 0,01%). Les résultats sont résumés dans le tableau suivant :

Lyoprotecteurs		Stabilité de la G6PD (mois)		Stabilité de la PK (mois)
		+4°C	22°C	+4°C
NADP 0,5mmol/l PEP 0,5mmol/l N-acétyl- cystéine 0,25mmol/l azide de Na 0,01%	+ lactose 10 %	12	n.st.	12
	+ saccharose 10 %	12	12	12
	+ sorbitol 10 %	12	n.st.	7
	+ maltose 10 %	12	n.st.	9
	+ tréhalose 10 %	12	12	12
	+ raffinose 10 %	12	10	12
	+ asp. de lys. 250mmol/l	8	n.st.	n.st.
	+ EDTA diNa 250mmol/l	5	n.st.	5
	+ EDTA diNa-Mg 250mmol/l	6	n.st.	6
	+ EDTA diNa-Zn 250mmol/l	n.st.	n.st.	5

Durée de stabilité des enzymes en présence des différents lyoprotecteurs.

n.st.= non stable.

asp.lys.= aspartate de lysine

Nous avons complété cette étude à long terme par une étude de dégradation accélérée aux températures de 22°C, 45°C et 56°C et, par extrapolation, nous avons confirmé la stabilité de ces enzymes après un an de conservation à +4°C et à -20°C.

Nos résultats montrent que le saccharose, le trehalose et le raffinose sont les meilleurs protecteurs de la G6PD et la PK d'un hémolysat lyophilisé.

Après reconstitution de ces lyophilisats la G6PD et la PK sont stables pendant deux jours à +4°C.

D'autres enzymes d'intérêt clinique (la glutathion reductase, la glutathion peroxydase, la galactose-1-P-Uridyltransferase) ont été mesurées après 13 mois de conservation à +4°C dans ces lyophilisats. Seul le saccharose peut être reconnu comme lyoprotecteur capable de stabiliser ces cinq enzymes érythrocytaires sous la forme d'un contrôle lyophilisé conservé à +4°C.

3 - propriétés catalytiques et commutabilité :

Une solution de contrôle doit, si possible, posséder un comportement très proche de celui des échantillons cliniques. Ainsi, après avoir déterminé les meilleurs protecteurs de la G6PD et de la PK érythrocytaires, nous avons étudié les propriétés catalytiques (K_m , V_m , analogues du substrat, action d'un effecteur, pH optimum) et la commutabilité des enzymes des hémolysats liquides comportant le saccharose 20 % ou le TMAO 1 mol/l ainsi que celles des hémolysats lyophilisés en présence du saccharose 10 %, du tréhalose 10 % ou du raffinose 10 % :

- L'ajout des composés protecteurs dans l'hémolysat n'influence pas le comportement catalytique des deux enzymes à l'exception du saccharose 20 % en solution liquide qui entraîne une diminution de V_m de la G6PD.
- Le rapport des activités, obtenu par deux méthodes de mesure dans les hémolysats comportant les protecteurs, est le même que celui d'un hémolysat témoin.
- Tous les hémolysats en présence de protecteurs, à l'exception du saccharose 20%, présentent une viscosité relativement faible par rapport à celle d'un hémolysat comportant du glycérol 20 ou 30% souvent proposé dans la littérature pour la conservation des enzymes.

En conclusion, de l'ensemble de nos résultats nous pouvons retenir préférentiellement deux types de solutions de contrôle possédant des activités G6PD et PK stables, un comportement et une commutabilité très proches de celles des échantillons des patients :

-solution de contrôle liquide prête à l'emploi :

hémolysat additionné de TMAO 1 mol/l, du NADP⁺ 0,5 mmol/l, de PEP 0,5 mmol/l et de glutathion réduit 0,1 mmol/l.

-solution de contrôle lyophilisée :

hémolysat additionné de saccharose 10%, (ou tréhalose 10% ou raffinose 10%), NADP⁺ 0,5 mmol/l, PEP 0,5 mmol/l, N-acétylcystéine 0,25 mmol/l et l'azide de sodium 0,01% (p/v).

Le développement au niveau industriel d'un contrôle en enzymologie erythrocytaire est dès à présent envisageable mais nos résultats actuels doivent être enrichis des études prospectives suivantes:

-L'addition de composés protecteurs ayant une action spécifiques permettrait d'étendre ce contrôle à d'autres enzymes erythrocytaires.

-L'apport d'une solution de reconstitution comportant des concentrations satisfaisantes de composés protecteurs (ex. polyalcools) et d'agents bactériostatiques permettrait d'augmenter la durée de stabilité de l'hémolysat lyophilisé après reconstitution.

-Contrairement à un apport d'enzymes exogènes, la conservation d'enzymes endogènes ne permet pas d'avoir un contrôle contenant des activités subnormales. Une purification partielle, destinée à augmenter l'activité spécifique pourrait sans doute être envisagée pour pallier à cet inconvénient avant d'effectuer la stabilisation des enzymes.

1. - ALFANI F. The use of synthetic polymers for preventing enzyme thermal inactivation. *Biotechnol. Lett.*, 1984, 6, 345-350.
2. - ANDERSON E.P., KALCKAR H.M., KURAHASHI K., ISSELBACHER K.J. A specific enzymatic assay for the diagnosis of congenital galactosemia. I. The consumption test. *J. Lab. Clin. Med.*, 1957, 50, 469-477.
3. - ANSTALL H.B., TRUJILLO J.M. Glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Amer. J. Clin. Pathol.*, 1967, 47, 296-302.
4. - ARAKAWA T., GODDETTE D. The mechanism of helical transition of proteins by organic solvents. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1985, 240, 21-32.
5. - ARAKAWA T., TIMASHEFF S.N. Mechanism of poly(ethylene glycol) interaction with proteins. *Biochemistry*, 1987, 24, 6756-6762.
6. - ARAKAWA T., TIMASHEFF S.N. Preferential interactions of proteins with salts in concentrated solutions. *Biochemistry*, 1982, 21, 6545-6552.
7. - ARAKAWA T., TIMASHEFF S.N. Preferential interactions of proteins with solvent components in aqueous amino acid solutions. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1983, 224, 169-177.
8. - ARAKAWA T., TIMASHEFF S.N. Stabilization of protein structure by sugars. *Amer. Chem. Soc.*, 1982, 21, 6536-6544.
9. - ARAKAWA T., TIMASHEFF S.N. Theory of protein solubility. *Meth. Enzymol.*, 1985, 114, 49-77.
10. - ARGOS P., ROSSMANN M.G., GRAU U.M., ZUBER H., FRANK G., TRATSCHIN J.D. Thermal stability and protein structure. *Biochemistry*, 1979, 18, 5698-5703.
11. - AYALA G., DE GOMEZ-PUYOU M.T., GOMEZ-PUYOU A., DARSZON A. Thermostability of membrane enzymes in organic solvents. *Febs Lett.*, 1986, 203, 41-43.
12. - BAILLY M. Situation et évolution du contrôle de qualité. *Ann. Biol. Clin.*, 1978, 36, 156-158.
13. - BAIS R., O'LOUGHLIN P.D., PHILCOX J.C., EDWARDS J.B. Preparation and characterization of a human serum matrix suitable for quality control or reference materials. *Pathology*, 1983, 15, 15-19.
14. - BETKE K., BREWER G.J., KIRKMAN H.N., LUZZATO L., MOTULSKY A.G., RAMOT B., SINISCALCO M. Rapport d'un Groupe scientifique de l'OMS. *Org. mond. Santé Sér. Rapp. techn.*, 1966, 338, 5-55.
15. - BEUTLER E., BLUME K.G., KAPLAN J.C., LOHR G.W., RAMOT B., VALENTINE W.N. International committee for standardization in haematology: recommended methods for red-cell enzyme analysis. *Brit. J. Haematol.*, 1977, 35, 331-340.
16. - BEUTLER E., BLUME K.G., KAPLAN J.C., LOHR G.W., RAMOT B., VALENTINE W.N. International committee for standardization in haematology: recommended screening test for glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PD) deficiency. *Brit. J. Haematol.*, 1979, 43, 469-477.
17. - BEUTLER E., FORMAN L., RIOS-LARRAIN E. Elevated pyruvate kinase activity in patients with hemolytic anemia due to red cell pyruvate kinase "deficiency". *Am. J. Med.*, 1987, 83, 899-904.
18. - BEUTLER E., GAETANI G., DER KALOUSTIAN V., LUZZATTO L., NIWA S., PANNICH V., SODEINDE O. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. WHO Working group. *Bull. Wor. Heal. Org.*, 1989, 67, 601-611.
19. - BEUTLER E. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Amer. J. Clin. Pathol.*, 1967, 47, 303-309.
20. - BEUTLER E. Glucose-6-phosphate dehydrogenase: new perspectives. *J. Amer. Soc. Hematol.*, 1989, 73, 1397-1401.
21. - BEUTLER E., LISKER R., KUHL W. Molecular biology of G6PD variants. *Biomed. Biochim. Acta*, 1990, 49, 236-241.

22. - BEUTLER E., MATHAI C.K., SMITH J.E. Biochemical variants of glucose-6-phosphate dehydrogenase giving rise to congenital nonspherocytic hemolytic disease. *Blood*, 1968, XXXI, 131-150.
23. - BLUME K.G., ARNOLD H., LOHR G.W., BEUTLER E. Additional diagnostic procedures for the detection of abnormal red cell pyruvate kinase. *Clin. Chim. Acta.*, 1973, 43: 443-446
24. - BLUME K.G., HOFFBAUER R.W., BUSCH D., ARNOLD H., LÖHR G.W. Purification and properties of pyruvate kinase in normal and in pyruvate kinase deficient human red blood cells. *Biochim.Biophys.Acta*, 1971, 227: 364-372
25. - BOIVIN P., GALAND C., DEMARTIAL M.C. Etudes sur la pyruvate kinase érythrocytaire. I- Quelques propriétés de l'enzyme humaine *Path.Biol.*, 1972, 20, 11-12/13-14: 583-594
26. - BOIVIN P., GALAND C. Signification des anomalies cinétiques de la pyruvate kinase érythrocytaire dans les déficits congénitaux. *Path. Biol.*, 25, 3: 161-167
27. - BOIVIN P., HAKIM J. Les variantes de la glucose-6-phosphate-déhydrogénase. *Path. Biol.*, 1969, 17, 629-636.
28. - BONDERMAN D.P., PROKSCH G.J., BONDERMAN P.W. Lyophilised control for determination of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in hemolysates. *Clin. Chem.*, 1979, 25, 815-816.
29. - BONINI P.A., FRANZINI C., MOSCA A. Stabilized haemolysates as control materials in haemoglobin-related investigations. *Ann. Biol. Clin.*, 1985, 43, 419-438.
30. - BOOTH E., CROFTON P., ROBERTS L.B. The influence of standards on interlaboratory quality control programmes. *Clin. Chim. Acta*, 1974, 55, 367-375.
31. - BRETAUDIERE J.P., DUMONT G., REJ R., BAILLY M. Suitability of control materials. General principles and methods of investigation. *Clin. Chem.*, 1981, 27, 798-805.
32. - BRETAUDIERE J.P., REJ R., DRAKE P., VASSAULT A., BAILLY M. Suitability of control materials for determination of α -amylase activity. *Clin. Chem.*, 1981, 27, 806-815.
33. - BRUSCHI M., CAMBILLAU C., BOVIER-LAPIERRE G., BONICEL J., FORGET P. Sequence determination and three-dimensional modelling of *Clostridium thermocellum* ferredoxin: structural considerations for its high thermal stability. *Biochim. Biophys. Acta*, 1986, 873, 31-37.
34. - BUCKWITZ D., SCHONIAN G., HOLZHUTTER H.G. Kinetic model of glucose-6-phosphate dehydrogenase from red blood cells. Parameter estimation from progress curves and simulation of regulatory properties. *Biomed. Biochim. Acta*, 1986, 45, 429-439.
35. - BUC H., NAJMAN A., COLUMELLI S., CARTIER P. Déficit en congénital pyruvate kinase érythrocytaire: Etude cinétique de l'enzyme et conséquences métaboliques. *Clin. Chim. Acta*, 1972, 38, 131-140
36. - BURLEY S.K., PETSKO G.A. Weakly polar interactions in proteins. *Adv. Prot. Chem.*, 1988, 39, 125-189.
37. - BUTTNER J., BORTH R., BOUTWELL J.H., BROUGHTON M.G., BOWYER R.C. Provisional recommendation on quality control in clinical chemistry. *Clin. Chem.*, 1977, 23, 1784-1789.
38. - CALAM D.H., TARELLI E. Additives to biological substances. V - The stability of lactose as a carrier for biological standards. *J. Biol. Stand.*, 1988, 16, 63-66.
39. - CALDWELL P., LUK D.C., WEISSBACH H., BROT N. Oxidation of the methionine residues of *Escherichia coli* ribosomal protein L12 decreases the protein's biological activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1978, 75, 5349-5352.

40. - CAMARDELLA L., CARUSO C., RUTIGLIANO B., ROMANO M., DI PRISCO G., DESCALZI-CANCEDDA F. Human erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.*, 1988, 171, 485-489.
41. - CAMBOU B., LAURENT M., HERVAGAUT J.F., THOMAS D. Modulation of phosphofructokinase behavior by chemical modifications during the immobilization process. *Eur. J. Biochem.*, 1981, 121, 99-104.
42. - CAM G., HUU K.H., TAIEB H., TRIVIN F., LEMONNIER A. Pour une standardisation du contrôle de qualité en enzymologie. *Biologie prospective*. II^e Colloque de Pont-à-Mousson, 1972, 443-450.
43. - CAMPBELL P.J. International biological standards and reference preparations. I. Preparation and presentation of materials to serve as standards and reference preparations. II. Procedures used for the production of biological standards and reference preparations. *J. Biol. Stand.*, 1974, 2, 249-272.
44. - CARPENTER J.F., CROWE J.H. The mechanism of cryoprotection of proteins by solutes. *Cryobiology*, 1988, 25, 244-255.
45. - CARPENTER J.F., CROWE L.M., CROWE J.H. Stabilization of phosphofructokinase with sugars during freeze-drying: characterization of enhanced protection in the presence of divalent cations. *Biochim. Biophys. Acta*, 1987, 923, 109-115.
46. - CARPENTER J.F., HAND S.C., CROWE L.M., CROWE J.H. Cryoprotection of phosphofructokinase with organic solutes: characterization of enhanced protection in the presence of divalent cations. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1986, 250, 505-512.
47. - CARREA G., PASTA P., VECCHIO G. Effect of the lyotropic series of anions on denaturation and renaturation of 20 β -hydroxysteroid dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta*, 1984, 784, 16-23.
48. - CARTIER P., LEROUX J.P., MARCHAND J.Cl. Techniques de dosage des enzymes glycolytiques tissulaires. *Ann. Biol. Clin.*, 1967, 25, 109-136.
49. - CHAILLOT B., LABRUDE P., VIGNERON C., SIMATOS D. Freeze-drying of hemoglobin solutions without adjuvant and in presence of glucose, tris, and β -alanine: a study by electron spin resonance of the oxidized compounds produced. *Am. J. Hematol.*, 1981, 10: 319-326
50. - CHEFTEL J.C., CUQ J.L., LORIENT D. Dénaturation des protéines. *Protéines alimentaires*, TEC et DOC, 1985, pp. 35-53.
51. - CLARK P.I., KOSTUK W.J., HENDERSON A.R., The human red cell hemolysate : A source of LDH isoenzymes. *Clin. Chim. Acta*, 1976, 73, 207-211.
52. - CLARK P.M.S., KRICKA L.J., WHITEHEAD T.P. Matrix effects in clinical analysis: commutability of control materials between the Ektachem, Beckman and SMA 12/60 glucose and urea methods. *Clin. Chim. Acta*, 1981, 113, 293-303.
53. - CLERC Y., HERMAN J.P., BRUNET N., SAINT-BLANCARD J. Conservation del'hémoglobine dans plusieurs conditions: à l'état liquide (+4°C), à l'état congelé (-30°C) et à l'état cryodesseché (+4°C et 22°C).
54. - COHEN P., ROSEMEYER M.A. Human glucose-6-phosphate dehydrogenase : purification of the erythrocyte enzyme and the influence of ions on its activity. *Eur. J. Biochem.*, 1969, 8, 1-7.
55. - COHEN P., ROSEMEYER M.A. Subunit interactions of glucose-6-phosphate dehydrogenase from human erythrocytes. *Eur. J. Biochem.*, 1969, 8, 8-15.
56. - COLTRERA M., ROSENBLATT M., POTTS J.T. Analogues of parathyroid hormone containing D-amino acids: Evaluation of biological activity and stability. *Biochemistry*, 1980, 19, 4380-4385.
57. - COMBES D., YE W.N., ZWICK A., MONSAN P. Effect of salts on enzyme stability. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1988, 842, 1-5.
58. - COMBES D., YOOVIDHYA T., GIRBAL E., WILLMOT R.M., MONSAN P. Mechanism of enzyme stabilization. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1987, 501, 59-62.

59. - DANOY B., ESTEVE M., FOBY M.C. Etude de quatre sérums de contrôle liquides : exactitude - reproductibilité - conservation. Feuillet de Biologie, 1976, XVII, 81-91.
60. - DEMCHENKO A.P., RUSYN O.I., SABUROVA E.A. Kinetics of the lactate dehydrogenase reaction in high-viscosity media. Biochim. Biophys. Acta, 1989, 998, 196-203.
61. - DOMENECH C., BOZAL X., MAZO A., CORTES A., BOZAL J. Factors affecting malate dehydrogenase activity in freezing-thawing processes. Comp. Biochem. Physiol., 1987, 88B, 461-466.
62. - DRABKIN D.L. The standardisation of hemoglobin measurement. Amer. J. Med. Sci., 1949, 217, 710-711.
63. - DREYFUS M., VANDENBUNDER B., BUC H. Stabilization of a phosphorylase *b* active , conformation by hydrophobic solvents. Febs Lett., 1978, 95, 185-189.
64. - DUNCAN P.H., McKNEALLY S.S., MACNEIL M.L., FAST D.M., BAYSE D.D. Development of a reference material for alkaline phosphatase. Clin. Chem., 1984, 30, 93-97.
65. - EDSALL J.T., MCKENZIE H.A. Water and proteins. I. The significance and structure of water ; its interactions with electrolytes and non-electrolytes. Adv. Biophys., 1978, 10, 137-207.
66. - ENGSTRÖM L., EKMAN P., HUMBLE E., ZETTERQVIST Ö. Pyruvate kinase The enzymes , 1987, 18: 47-75
67. - EVELYN K.A., MALLOY H.I., Microdetermination of oxyhemoglobin, methemoglobin and sulfhemoglobin in a single sample of blood. J. Biol. Chem., 1938, 126, 655-682.
68. - FASCE C.F., REJ R., COPELAND W.H., VANDERLINDE R.E., A discussion of enzyme reference materials: Applications and specifications. Clin. Chem., 1973, 19, 5-9.
69. - FAUVEL A., LABRUDE P., VIGNERON C. Freez-drying of hemoglobin: Protection against oxydation in the presence of EDTA salts, sulfonic acid buffers, and pantothenic acid derivatives. J. Pharma. Sci., 1984, 73, 6: 784-787
70. - FINK A.L. Effects of cryoprotectants on enzyme structure. Cryobiology, 1986, 23, 28-37.
71. - FINNEY J.L. The organization and function of water in protein crystals. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B, 1977, 278, 3-32.
72. - FONT DE VALDEZ G., SAVOY DE GIORI G., PESCE DE RUIZ HOLGADO A., OLIVER G. Comparative study of the efficiency of some additives in protecting lactic acid bacteria against freeze-drying. Cryobiology, 1983, 20, 560-566.
73. - FOOTE C.S. Mechanisms of photosensitized oxidation. Science, 1968, 162, 963-970.
74. - FRANKS F., EAGLAND D., LUMRY R. The role of solvent interactions in protein conformation. Crit. Rev. Biochem., 1975, 8, 165-219.
75. - FRANZINI C. Ethylene glycol-stabilised haemolysates as control material in haemoglobinometry. Clin. Chim. Acta, 1983, 135, 175-179.
76. - GEKKO K. Mechanism of protein stabilization by polyols: Thermodynamics of transfer of amino acids and proteins from water to aqueous polyol solutions. in : Tanaka N., Ohtaki H. and Tamamushi (Eds.), Studies in physical and theoretical chemistry, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, 1982, Vol. 27, pp. : 339-358.
77. - GEKKO K., TIMASHEFF S.N. Mechanism of protein stabilization by glycerol: Preferential hydration in glycerol-water mixtures. Biochemistry, 1981, 20, 4667-4676.
78. - GEKKO K., TIMASHEFF S.N. Thermodynamic and kinetic examination of protein stabilization by glycerol. Biochemistry, 1981, 20, 4677-4686.

79. - GEORGE H., GARRET P.E., KURTZ S.R. Two liquid and lyophilized control materials compared. *Clin. Chem.*, 1983, 29, 1999-2000.
80. - GERHARDT W., LOUDERBACK A., WALDENSTRÖM J. Stabilized liquid control sera for creatine kinase isoenzymes. *Clin. Chem.*, 1982, 28, 719-720.
81. - GERLSMA S.Y., STUUR E.R. The effect of polyhydric and monohydric alcohols on the heat-induced reversible denaturation of lysozyme and ribonuclease. *Int. J. Peptide Protein Res.*, 1972, 4, 377-383.
82. - GHELIS C., YON J. *Protein folding*, Academic Press, New York and London, 1982.
83. - GOLDENBERG D.P., CREIGHTON T.E. Energetics of protein structure and folding. *Biopolymers*, 1985, 24, 167-182.
84. - GOTTSCHALK N., JAENICKE R. Chemically crosslinked lactate dehydrogenase : stability and reconstitution after glutaraldehyde fixation. *Biotech. Appl. Biochem.*, 1987, 9, 389-400.
85. - GRUBER W., MOLLER H., PERRAS L. Isolation, pH-optima and apparent Michaelis constants of highly purified enzymes from human and animal sources. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 1977, 15, 565-573.
86. - HAGELAUER U., FAUST U. The importance of thermal equilibration for quality control in clinical enzyme analysis. *Biomed. Technik*, 1985, 30, 264-271.
87. - HAND S.C., SOMERO G.N. Urea and methylamine effects on rabbit muscle phosphofructokinase. *J. Biol. Chem.*, 1982, 257, 734-740.
88. - HARDIN E. et coll. The use of "clear" enzyme control materials. *Amer. J. Med. Technol.*, 1979, 43, 183-185.
89. - HARTMANN A.E., JUEL R.D., BARNETT R.N. Long-term stability of a stabilized liquid quality-control serum. *Clin. Chem.*, 1981, 27, 1448-1452.
90. - HORA J. Stabilization of bacillus subtilis α -amylase by amino group acylation. *Biochim. Biophys. Acta*, 1973, 310, 264-267.
91. - HORN H.D. Glutathione reductase. in Bergmeyer H.U. *Methods of enzymatic analysis*. Ed. Academic Press / New York and London, 1965, 875-879.
92. - INGHAM K.C. Polyethylene glycol in aqueous solution: solvent perturbation and gel filtration studies. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1977, 184, 59-68.
93. - INGLIS A.S. Cleavage at aspartic acid. *Biochem.*, 1960, 77, 324-332.
94. - INOUE H., NOGUCHI T., TANAKA T. Complete amino acid sequence of rat L-type pyruvate kinase deduced from the cDNA sequence. *Eur. J. Biochem.*, 1986, 154, 465-469.
95. - ISHIDA H., MORI M., TATIBANA M. Effects of dimethyl sulfoxide and glycerol on catalytic and regulatory properties of glutamine-dependent carbamoyl phosphate synthase from rat liver and dual effects of uridine triphosphate. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1977, 182, 258-265.
96. - ISSELBACHER K.J. Galactose-1-phosphate uridyl transferase. in Bergmeyer H.U. *Methods of enzymatic analysis*. Ed. Academic Press / New York and London, 1965, 863-866.
97. - JAENICKE R. Enzymes under extremes of physical conditions. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, 1981, 10, 1-67.
98. - JAENICKE R. Stability and self-organization of proteins. *Naturwissenschaften*, 1988, 75, 604-610.
99. - JARABAK J., SEEDS E., TALALAY P. Reversible cold inactivation of a 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase of human placenta: protective effect of glycerol. *Biochemistry*, 1966, 5, 1269-1278.
100. - JERNE N.K., PERRY W.L.M. The stability of biological standards. *Bull. Org. mond. Santé*, 1956, 14, 167-182.
101. - JUNG K., GRUTZMANN K.D., PERGANDE M., NEUMANN R. On the suitability of control materials for the quality control of enzyme activity determinations. *Z. Med. Lab. Diagn.*, 1984, 25, 108-114.

102. - JUNG K., GRUTZMANN K.D. Temperature-conversion factors for enzyme activities in commercial control sera. *Clin. Chem.*, 1987, 33, 200.
103. - KAHN A., LAGNEAU J., BOIVIN P., HAKIM J. Importance et rôle des groupes imidazole et sulphydrique dans l'activité catalytique de la glucose-6-phosphate deshydrogénase érythrocytaire humaine. *Biochimie*, 1972, 54, 997-1004.
104. - KAHN A., MARIE J., GARREAU H., SPRENGERS E.D. The genetic system of the L-type pyruvate kinase forms in man. *Biochim. Biophys. Acta*, 1978, 523, 59-74.
105. - KAHN A., MARIE J. Pyruvate kinases from human erythrocytes and liver. *Method Enzymol.*, 1982, 90, 131-139.
106. - KAHN A., MARIE J., VIVES-CORRONS J.L., MAIGRET P., NAJMAN A., Search of relationship between molecular anomalies of the mutant erythrocyte pyruvate kinase variants and their pathological expression. *Human. Genet.*, 1981, 57, 172-175.
107. - KAHNE D., STILL W.C. Hydrolysis of a peptide bond in neutral water. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1988, 110, 7529-7534.
108. - KAISER E.T., LAWRENCE D.S., EDWARD S. The chemical modification of enzymatic specificity. *Ann.Rev.Biochem.*, 1985, 54, 565-595.
109. - KANJI M.I., TOEWS M.L., CARPER W.R. A kinetic study of glucose-6-phosphate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.*, 1976, 251, 2258-2262.
110. - KANJI M.I., TOEWS M.L., CARPER W.R. Glucose-6-phosphate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.*, 1976, 251, 2255-2257.
111. - KAPMEYER W., PFLEIDERER G. Characterisation of a highly hydrophobically modified lactate dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta*, 1977, 481, 328-339.
112. - KAYNE F.J. Pyruvate kinase. *The Enzymes* Ed. Boyer, vol. VIII, Academic Press, New-York (1973), pp 353-382.
113. - KIRKMAN H.N., GAETANI G.F. Regulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase in human erythrocytes. *J. Biol. Chem.*, 1986, 261, 4033-4038.
114. - KIRKMAN H.N., WILSON W.G., CLEMONS E.H. Regulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase. I. Intact red cells. *J. Lab. Clin. Med.*, 1980, 95, 877-887.
115. - KIRKWOOD T.B.L. Design and analysis of accelerated degradation tests for the stability of biological standards III. Principles of design. *J. Biol. Stand.*, 1984, 12, 215-224.
116. - KIRKWOOD T.B.L. Predicting the stability of biological standards and products. *Biometrics*, 1977, 33, 736-742.
117. - KLIBANOV A.M. Review: enzyme stabilization by immobilization. *Anal. Biochem.*, 1979, 93, 1-25.
118. - KLIBANOV A.M. Stabilisation of enzymes against thermal inactivation. *Adv. Appl. Microbiol.*, 1983, 29, 1-28.
119. - KOSSIAKOFF A.A. Tertiary structure is a principal determinant to protein deamidation. *Science*, 1988, 240, 191-194.
120. - KUWAJIMA K., MITANI M., SUGAI S. Characterization of the critical state in protein folding. Effects of guanidine hydrochloride and specific Ca²⁺ binding on the folding kinetics of α -lactalbumin. *J. Mol. Biol.*, 1989, 206, 547-561.
121. - LABRUDE P., BONNEAUX F., VIGNERON C. An attempt to freeze-dry haemoglobin in the presence of macromolecules. *J. Pharm. Pharmacol.*, 1981, 33, 115-117.
122. - LABRUDE P., CHAILLOT B., BONNEAUX F., VIGNERON C. Freeze-drying of haemoglobin in the presence of carbohydrates. *Communications, J. Pharm. Pharmacol.*, 1980, 32, 588-589.
123. - LABRUDE P., CHAILLOT B., VIGNERON C. Problems of haemoglobin freeze-drying: evidence that water removal is the key to iron oxidation. *J. Pharm. Pharmacol.*, 1987, 39, 344-348.

124. - LABRUDE P., CHUM C., PELGRIMS F., VIGNERON C. Functional properties of lyophilized hemoglobin in the presence of amino acids after 13 months of conservation. *Experientia*, 1981, 37, 1020-1021.
125. - LABRUDE P., LOPPINET V., VIGNERON C. Molécules protectrices de l'hémoglobine au cours de la lyophilisation. *Ann. Pharm. Franç.*, 1976, 34, 143-149.
126. - LABRUDE P., VIGNERON C., ARTUR Y., SAINT-BLANCARD J. Lyophilisation de l'hémoglobine en présence d'amino-acides et de leurs dérivés. *Ann. Pharm. Franç.*, 1980, 38, 271-277.
127. - LABRUDE P., VIGNERON C. La lyophilisation de l'hémoglobine : Molécules protectrices. Essai de compréhension de leur mode d'action. XV Congrès International du Froid, Venise, 23-29 sept. 1979.
128. - LAKOMEK M., TILLMANN W., SCARNETZKY M., WINKLER H., Erythrocyte pyruvate kinase deficiency : A kinetic study of the membrane-localised and cytoplasmic enzyme from six patients. *Enzyme*, 1983, 29, 189-197;
129. - LEE L.L.Y., LEE J.C. Thermal stability of proteins in the presence of poly(ethylene glycols). *Biochemistry*, 1987, 26, 7813-7819.
130. - LEVY H.R. Glucose-6-phosphate dehydrogenases. *Adv. Enzymol.*, 1979, 48, 97-192.
131. - LOHR G.W., WALLER H.D. Glucose-6-phosphate dehydrogenase. In *Methods in analytic analysis*. Bergmeyer Ed., Academic Press, 1974.
132. - LOTT J.A., THOLEN D.W., MASSION C.G., Survey of serum enzyme analysis: Human tissues as a source of enzymes. *Arch. Pathol. Lab; Med.*, 1984, 108, 949-953.
133. - LOTT J.A., WENGER W.C., MASSION C.G., HOMBURGER H.A., Interlaboratory survey of enzyme analysis IV: Human versus porcine tissue as source of Creatine Kinase for survey serum. *Am. J. Clin. Pathol.*, 1982, 78, 626-633.
134. - LUM G. Preparation and stability of a liquid creatine kinase isoenzyme control from rabbit serum. *Clin. Chem.*, 1979, 25, 873-876.
135. - LUZZATTO L., AFOLAYAN A. Genetic variants of human erythrocyte glucose 6-phosphate dehydrogenase. II. In vitro and in vivo function of the A- variant. *Biochemistry*, 1971, 10, 420-423.
136. - MANNING M.C., PATEL K., BORCHARDT R.T. Stability of protein pharmaceuticals. *Pharmaceut. Res.*, 1989, 6, 903-918.
137. - MARIE B., KAHN A., BOIVIN P. Human erythrocyte pyruvate kinase: Total purification and evidence for its antigenic identity with L-type enzyme. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1977, 481, 96-104
138. - MARIE J., KAHN A. Proteolytic processing of human erythrocyte pyruvate kinase: study of normal and deficient enzymes. *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 1979, 91, 123-129
139. - MARIK T., BRABEC V., KODICEK M., JAROLIM P., Pyruvate kinase-deficiency anemia : membrane approach. *Biochem. Med. Metab. Biol.*, 1988, 39, 55-63.
140. - MARSHALL J.J., RABINOWITZ M.L. Preparation and characterization of a dextran-trypsin conjugate. *J. Biol. Chem.*, 1976, 251, 1081-1087.
141. - MARSHALL J.J., RABINOWITZ M.L. Enzyme stabilization by covalent attachment of carbohydrate. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1975, 167, 777-779.
142. - MARUHN D., WEHLING K., METZ U. A stable liquid control material for urinary enzyme assays. *Clin. Chim. Acta*, 1986, 160, 119-122.
143. - MATSUMOTO J.J. Denaturation of fish muscle proteins during frozen storage. in: Fennema O. *Advances in Chemistry Series*. Ed. Am. Chem. Soc., Washington, 1979, 180, 205-224.
144. - MAUREL P. Relevance of dielectric constant and solvent hydrophobicity to the organic solvent effect in enzymology. *J. Biol. Chem.*, 1978, 253, 1677-1683.

145. - MELANDER W., HORVATH C. Salt effects on hydrophobic interactions in precipitation and chromatography of proteins: An interpretation of the lyotropic series. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1977, 183, 200-215.
146. - MELIK-NUBAROV N.S., MOZHAEV V.V., SIKSNIS S., MARTINEK K. Protein stabilization via hydrophilization: stabilization of α -chymotrypsin by reductive alkylation with glyoxylic acid. *Biotechnol. Lett.*, 1987, 9, 725-730.
147. - MILLER A.W., ROBYT J.F. Stabilization of dextransucrase from *leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F by nonionic detergents, poly(ethylene glycol) and high-molecular-weight dextran. *Biochim. Biophys. Acta*, 1984, 785, 89-96.
148. - MIWA S., BOIVIN P., BLUME K.G., ARNOLD H., BLACK J.A., KAHN A., STAAL G.E.J., NAKASHIMA K., TANAKA K.R., PAGLIA D.E., VALENTINE W.N., YOSHIDA A., BEUTLER E. Recommended methods for the characterization of red cell pyruvate kinase variants. *Brit. J. Haematol.*, 1979, 43, 275-286.
149. - MODROVICH I.E. The liquid form: the performance and advantages in using liquid enzyme reagents and controls in the clinical laboratory. *Biologie prospective. 5° Colloque International de Pont-à-Mousson*, Masson éd., 1983, pp. 537-541.
150. - MOSS D.W., BARON D.N., WALDER P.G., WILKINSON J.H. Standardization of clinical enzyme assays. *J. Clin. Path.*, 1971, 24, 740-743.
151. - MOSS D.W. Dilemmas in quality control of enzyme determinations. *Clin. Chem.*, 1970, 16, 500-502.
152. - MOSS D.W., SCHIELE F., SIEST G., COLINET E. Matériaux de référence en enzymologie clinique. *Ann. Biol. Clin.*, 1986, 44, 1-3.
153. - MOSS D.W., SCHIELE F., SIEST G., COLINET E. Reference materials for clinical enzymology: the work of the community bureau of reference of the european community. *Clin. Chem.*, 1986, 32, 556-558.
154. - MOSS D.W. The place of reference materials in clinical enzymology. *Clinica. Chimica. Acta.*, 1988, 173, 1-8.
155. - MOZHAEV V.V., KHMELNITSKY Y.L., SEREEVA M.V., BELOVA A.B., KLYACHKO N.L., LEVASHOV A.V., MARTINEK K. Catalytic activity and denaturation of enzymes in water/organic cosolvent mixtures. *Eur. J. Biochem.*, 1989, 184, 597-602.
156. - MYERS J.S., JAKOBY W.B. Effect of polyhydric alcohols on kinetic parameters of enzymes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1973, 51, 631-636.
157. - NAKAMURA M., ITOH T., MIYATA K., UCHISAKA T., TANABE T., AONO M., KIMURA K. Protection by glycerol of urinary L-alanine aminopeptidase activity from freezing and thawing inactivation. *Toxicol. Lett.*, 1984, 21, 321-324.
158. - NANDI P.K., ROBINSON D.R. Effects of urea and guanidine hydrochloride on peptide and nonpolar groups. *Biochemistry*, 1984, 23, 6661-6668.
159. - NEMETHY G. Orientation of amino acid side chains: intraprotein and solvent interactions. *Adv. Protein Chem.*, 1975, 29, 205.
160. - NOVOA W.B., GRISOLIA S. The influence of sulfhydryl groups on the stability of carbamylphosphate synthetase. *Biochim. Biophys. Acta*, 1964, 85, 274-282.
161. - O'DONNELL M.D., MCGEENEY K.F. Suitability of control materials in the differential inhibition assay for human pancreatic and salivary amylase. *Clin. Chem.*, 1983, 29, 510-512.
162. - PAGLIA D.E., VALENTINE W.N. *J. Lab. Clin. Med.*, 1976, 70, 158-
163. - PAILLOT B., REMY M.H., THOMAS D., BROUN G. Soluble cross-linked enzyme polymers. *Pathol. Biol.*, 1974, 22, 491-495.
164. - PERSICO M.G., VIGLIETTO G., MARTINI G., TONIOLO D., PAONESSA G., MOSCATELLI C., DONO R., VULLIAMY T., LUZZATTO L., D'URSO M. Isolation of human glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) cDNA clones: primary

- structure of the protein and unusual 5' non-coding region. Nucl. Acid Res., 1986, 14, 2511-2522.
165. - PREMACHANDRA P., WOOD P.L., HILL P.G., BROWNING D.M., VAZQUEZ D.A., OLAZABAL R. Preparation and stability of low-cost liquid quality-control serum stabilized with ethanediol. Clin. Chem., 1987, 33, 851-852.
 166. - RAFTER G.W., BLAIR J.B. Reaction of pyruvate kinase with sulfhydryl reagents : effect on its activity. Biochim.Biophys.Acta, 1987, 913, 195-199.
 167. - REJ R., JENNY R.W., BRETAUDIERE J.P. Quality control in clinical chemistry: characterization of reference materials. Talanta, 1984, 31, 851-862.
 168. - REJ R. Reference and control materials for enzyme assays. Ann. Biol. Clin., 1985, 43, 419-438.
 169. - REJ R., VANDERLINDE R.E., FASCE C.F. An L-Aspartate: 2-oxoglutarate aminotransferase reference material from human erythrocytes: preparation and characterization. Clin. Chem., 1972, 18, 374-383.
 170. - ROBINSON A.B., RUDD C.J. Deamidation of glutamyl and asparaginyl residues. In : B. Horecker and E.R. Stadtman (eds), Current Topics in Cellular Regulations, Vol. 8, Acad. Press, New York, 1974, pp. 247-295.
 171. - ROLLO J.L., DAVIS J.E., LADENSON J.H., MCDONALD J.M., BRUNS D.E. Effects of b-mercaptoethanol and chelating agents on the stability and activation of creatine kinase in serum. Clin. Chim. Acta, 1978, 87, 189-198.
 172. - ROSALKI S.B. Quality control of enzyme determinations. Ann. Clin. Biochem., 1980, 17, 74-77.
 173. - ROSEMEYER H., KORNIG E., SEELA F. Adenosine deaminase covalently linked to soluble dextran. Eur. J. Biochem., 1982, 122, 375-380.
 174. - ROWE A.W., LENNY L.L. Cryopreservation of granulocytes for transfusion: studies on human granulocyte isolation, the effect of glycerol on lysosomes, kinetics of glycerol uptake and cryopreservation with dimethyl sulfoxide and glycerol.
 175. - RUBIO V., LLORENTE P. Activation of carbamoyl phosphate synthetase from *escherichia coli* by glycerol. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1982, 107, 1400-1405.
 176. - SAENGER W. Structure and dynamics of water surrounding biomolecules. Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem., 1987, 16, 93-114.
 177. - SANDBERG W.S., TERWILLIGER T.C. Influence of interior packing and hydrophobicity on the stability of a protein. Science, 1989, 245, 54-57.
 178. - SATOH H., TANI K., YOSHIDA M.C., SASAKI M., MIWA S., FUJII H. The human liver-type pyruvate kinase (PKL) gene is on chromosome 1 at band q21. Cytogenet. Cell. Genet., 1988, 47, 132-133.
 179. - SCHELLMAN J.A. The thermodynamic stability of proteins. Ann. Rev. Biophys. Chem., 1987, 16, 115-137.
 180. - SCHERAGA H.A. Reactions of proteins denaturation. in: Comprehensive Biochemistry, ed. Florkin et Stotz, 1963, vol. 7, pp.149-183.
 181. - SCHIELE F., COLINET E. Préparation et utilisation de matériaux de référence en enzymologie clinique: travaux réalisés au niveau de la Communauté Européenne. Ann. Biol. Clin., 1985, 43, 419-438.
 182. - SCHIELE F., MULLER J., COLINET E., SIEST G. Production and certification of an enzyme reference material for g-glutamyltransferase (CRM 319). Part 1: preparation and characterization. Clin. Chem., 1987, 33, 1971-1977.
 183. - SCHMID R.D. Stabilized soluble enzymes. Adv. Biochem. Eng., 1979, 12, 41-118.
 184. - SCHRÖTER W., TILLMANN W. Membrane localized pyruvate kinase of red blood cells in hemolytic anemia associated with pyruvate kinase deficiency. Klin Wochenschr, 1975, 53, 1131-1132.

185. - SEGURO K., TAMIYA T., TSUCHIYA T., MATSUMOTO J.J. Effect of chemical modifications on freeze denaturation of lactate dehydrogenase. *Cryobiology*, 1989, 26, 154-161.
186. - SELINIOTI E., NIKOLOPOULOS D., MANETAS Y. Organic cosolutes as stabilisers of phosphoenolpyruvate carboxylase in storage: An interpretation of their action. *Aust. J. Plant. Physiol.*, 1987, 14, 203-210.
187. - SHATSKY M.A., HO H.C., WANG J.H.C. Stabilization of glycogen phosphorylase b by reductive alkylation with aliphatic aldehydes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1973, 303, 298-307.
188. - SHECHTER Y., BURSTEIN Y., PATCHORNIK A. Selective oxidation of methionine residues in proteins. *Biochemistry*, 1975, 14, 4497-4503.
189. - SHREVE D.S., LEVY H.R. On the molecular weight of human glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1977, 78, 1369-1375.
190. - SIMON M.P., MARIE J., BERTRAND O., KAHN A. Molecular organization of human L' and L pyruvate kinases. *Biochim. Biophys. Acta*, 1982, 709, 1-7.
191. - SIZARET P. The preparation of international reference materials for biological substances. *J. Biol. Stand.*, 1988, 16, 129-137.
192. - SIZARET P. The preparation of international reference materials for biological substances. *J. Biol. Stand.*, 1988, 16, 129-137.
193. - STAAL G.E.J., CEERDINK R.P., VLUG A.M.C., HAMELINK M.L. Defective erythrocyte pyruvate kinase. *Clin. Chim. Acta*, 1976, 68, 11-15.
194. - STAAL G.E.J., KOSTER J.F., KAMP H., VAN MILLIGEN-BOERSMA L., VEEGER C. Human erythrocyte pyruvate kinase its purification and some properties. *Biochim. Biophys. Acta*, 1971, 227, 86-96.
195. - STAMM D. Calibration and quality control materials. *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.*, 1974, 12, 137-145.
196. - STAMM D. Reference materials and reference methods in clinical chemistry. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 1979, 17, 283-297.
197. - SZULMAJSTER J. Protein folding. *Biosci. Rep.*, 1988, 8, 645-651.
198. - TAKEDA Y., HIZUKURI S. Effect of triton X-100 on sweet potato α -amylase. *Biochim. Biophys. Acta*, 1972, 268, 175-183.
199. - TAKIZAWA T., HUANG I.Y., IKUTA T., YOSHIDA A. Human glucose-6-phosphatase dehydrogenase: primary structure and cDNA cloning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986, 83, 4157-4161.
200. - TAMIYA T., OKAHASHI N., SAKUMA R., AOYAMA T., AKAHANE T., MATSUMOTO J.J. Freeze denaturation of enzymes and its prevention with additives. *Cryobiology*, 1985, 22, 446-456.
201. - TANDON S., HOROWITZ P.M. Detergent-assisted refolding of guanidinium chloride-denatured rhodanese. *J. Biol. Chem.*, 1987, 262, 4486-4491.
202. - TANI K., FUJII H., NAGATA S., MIWA S. Human liver type pyruvate kinase: complete amino acid sequence and the expression in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, 85, 1792-1795.
203. - TANIMOTO T., HAYAKAWA T., KAWAMURA J. Stabilization of 20 β -hydroxysteroid dehydrogenase by glycerol. *Chem. Pharm. Bull.*, 1980, 28, 314-318.
204. - TOMBS M.P. Stability of enzymes. *J. Appl. Biochem.*, 1985, 7, 3-24.
205. - TORCHILIN V.P., MAKSIMENKO A.V., BEREZIN I.V., KLIBANOV A.M., MARTINEK K. The principles of enzyme stabilization. III. The effect of the length of intra-molecular cross-linkages on thermostability of enzymes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1978, 522, 277-283.
206. - VAN BERKEL J.C., KOSTER J.F., STAAL G.E.J. On the molecular basis of pyruvate kinase deficiency. I. Primary defect or consequence of increased glutathione disulfide concentration. *Biochim. Biophys. Acta*, 1973, 321, 496-502.

207. - VAN OSS C.J., GOOD R.J., CHAUDHURY M.K., Solubility of proteins. *J. Prot. Chem.*, 1986, 5, 385-405.
208. - VASSAULT A., AZZEDINE M.C., BAILLY M., CAM G., DUMONT G., EKINDJIAN O.G., FELDMAN D., GEORGES P., GERHARDT M.F., GOUDARD M., GRAFMEYER D., HENNY J., MOLLARD J.F., NAUDIN C., TREPO D. Commission "validation de techniques". *Ann. Biol. Clin.*, 1986, 44, 679-685.
209. - VERGNES H., SEVIN A., BRUN H. Kinetic characteristics of different glucose-6-phosphate dehydrogenase variants and their hemolytic incidence in man. *Enzyme*, 1982, 27, 204-214.
210. - VIGNERON C. Biologie du déficit en glucose-6-phosphate deshydrogénase. *Ann. Biol. Clin.*, 1988, 46, 52-58.
211. - VOLKIN D.B., KLIBANOV A.M. Thermal destruction processes in proteins involving cystine residues. *J. Biol. Chem.*, 1987, 262, 2945-2950.
212. - VON HIPPEL P.H., WONG K.Y. On the conformational stability of globular proteins. *J. Biol. Chem.*, 1965, 240, 3909-3923.
213. - WALKER J.E., WONACOTT A.J., HARRIS J.I. Heat stability of a tetrameric enzyme, D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.*, 1980, 108, 581-586.
214. - WEDLER F.C., MERKLER D.J. Thermostabilization of *Bacillus caldolyticus* glutamine synthetase by intrinsic and extrinsic factors. *Current Topics in Cellular Regulation*, 19 , 26, 263-280.
215. - WHITNER V.S., MORIN L.G., McKNEALLY S.S., SAMPSON E.J. Stability of creatine kinase-3 in lyophilized materials. *Clin. Chem.*, 1982, 28, 41-44.
216. - WILLIAMS N.A., POLLI G.P. The lyophilization of pharmaceuticals: a literature review. *J. Parenteral Sci. Technol.*, 1984, 38, 48-59.
217. - XU Z.F., LARRETA-GARDE V., THOMAS D. Influence of polyol additive on enzyme catalytic selectivity towards different substrates. *Biochim. Biophys. Acta*, 1989, 998, 251-257.
218. - YE W.N., COMBES D. The relationship between the glucose oxidase subunit structure and its thermostability. *Biochim. Biophys. Acta*, 1989, 999, 86-93.
219. - YOOVIDHYA T., MONSAN P. Etude du comportement cinétique de protéases en milieu concentré et en présence d'additifs. Thèse Doctorat Génie Biologique, Inst. Natl. Sci. Appl., Toulouse 1986.
220. - YOSHIDA A. A contradiction between in vivo and in vitro activities of normal and variant glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Hemoglobin*, 1980, 4, 769-780.
221. - YOSHIDA A. G-6-PD variants: another up-date. *Ann. Hum. Genet.*, 1983, 47, 25-38.
222. - YOSHIDA A. Micromethod for determination of blocked NH₂-terminal amino acids of protein: application to identification of acetylserine of phosphoglycerate kinase and pyroglutamic acid of glucose 6-phosphate dehydrogenase. *Anal. Biochem.*, 1972, 49, 320-325.
223. - ZAKS A., KLIBANOV A.M. Enzyme-catalyzed processes in organic solvents. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1985, 82, 3192-3196.

RESUME

Le diagnostic des érythroenzymopathies est fondé sur la mise en évidence de la baisse d'activité de l'enzyme dans les hématies. Cette mesure est délicate pour les raisons suivantes : préparation et conservation des réactifs, précision de la température et du pH, stabilité de l'enzyme au cours du temps. L'inexistence de solutions de contrôle adaptées à l'enzymologie érythrocytaire constitue un handicap qui oblige à recourir à un hémolysat préparé le même jour à partir d'un sujet témoin. L'objectif de ce travail est de préparer un matériel de contrôle destiné aux laboratoires d'analyses médicales pour déterminer des activités enzymatiques et dépister sans erreur les déficits enzymatiques érythrocytaires les plus fréquents, notamment ceux de la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD) et de la pyruvate kinase (PK).

Le travail est divisé en deux parties :

- une première partie, exclusivement bibliographique, comprend un rappel des caractéristiques d'une solution de contrôle enzymatique, une revue des méthodes de stabilisation des enzymes suivie de l'étude des propriétés structurales et catalytiques de G6PD et PK érythrocytaires et de leur exploration biologique.
- La seconde partie rassemble nos travaux expérimentaux permettant de préparer une solution de contrôle à partir d'un hémolysat humain où les deux enzymes endogènes sont stabilisées par l'apport de différents protecteurs.

A partir de l'ensemble de nos résultats nous pouvons proposer les modalités permettant d'obtenir des solutions de contrôle possédant des activités G6PD et PK stables, un comportement et une commutabilité très proches de celles des échantillons des patients :

-solution de contrôle liquide prête à l'emploi : hémolysat additionné de TMAO 1 mol/l, de NADP⁺ 0,5 mmol/l, de PEP 0,5 mmol/l et de glutathion réduit 0,1 mmol/l.

-solution de contrôle lyophilisée : hémolysat additionné de saccharose 10%, (ou tréhalose 10% ou raffinose 10%), NADP⁺ 0,5 mmol/l, PEP 0,5 mmol/l, N-acétylcystéine 0,25 mmol/l et d'azide de sodium 0,01% (p/v).

mots-clés : solution de contrôle - enzymes érythrocytaires- stabilisation - G6PD - PK.