



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

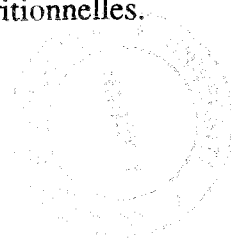
LIENS

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>



**Immunonéphélémétrie à supports microparticulaires : Dosages de
marqueurs de nécrose myocardique.
- Etude des interactions non spécifiques -**

Doctorat de l'Université de Nancy I

Spécialité : Immunochimie

présenté par

Florence CLIQUET

le 5 Juin 1992

JURY

Président : M. G. LINDEN, Professeur

Examineurs : M. J. DUHEILLE, Professeur

M. B. PAU, Professeur (Rapporteur)

M. G. HAUPTMANN, Professeur (Rapporteur)

M. D. RIOCHET, Sanofi Diagnostics Pasteur

M. N. SADOUL, Praticien hospitalier universitaire

AVANT - PROPOS

Qu'il me soit permis de remercier sincèrement Monsieur le Professeur G. Linden, qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre Jury.

Monsieur le Professeur J. Duheille m'a chaleureusement accueillie dans son Laboratoire. Sa grande disponibilité, son vaste savoir et ses conseils bienveillants m'ont guidée tout au long de ce travail. Je tiens à lui exprimer ici toute ma gratitude et mon profond respect.

Monsieur le Docteur Ingénieur D. Riochet a contribué à la réalisation de ce travail grâce à ses précieux conseils scientifiques. Je le remercie vivement d'avoir accepté sa participation à notre Jury.

Monsieur le Professeur B. Pau a bien voulu estimer ce travail. Ses encouragements et indications tout au long de ces années nous ont été très utiles. Je lui exprime mes remerciements les plus sincères.

Monsieur le Professeur G. Hauptmann a gentiment accepté de juger ce mémoire. Je le remercie sincèrement.

Je suis très sensible à la présence de Monsieur le Docteur N. Sadoul, qui m'a fort gentiment fourni des sérums de malades et laissé consulter les dossiers cliniques des patients étudiés dans ce mémoire. Je le remercie sincèrement.

Ce mémoire est l'aboutissement d'un travail d'équipe auquel Monsieur P. Montagne a puissamment contribué par sa disponibilité, son enthousiasme, son honnêteté et ses larges connaissances. Je lui exprime ici toute ma reconnaissance et ma sincère amitié.

J'ai hautement apprécié la collaboration constante et toujours aimable apportée par Madame M.L. Cuillière que je remercie vivement.

Monsieur Paolucci a participé à ce travail aussi bien scientifiquement que techniquement. Durant les deux stages effectués dans son service au centre Sanofi Recherche (Montpellier), j'ai beaucoup apprécié la gentillesse de son accueil et sa constante prévenance. Je lui exprime mes sincères remerciements.

J'associe à mes remerciements Monsieur P. Varcin et les membres du Laboratoire pour leur sympathie. Un grand merci également à L. Walle, qui a assuré avec beaucoup de patience et de dévouement la conception graphique et dactylographique de ce travail.

Je remercie enfin les Directions Scientifiques des Centres de Recherches Sanofi / Diagnostics Pasteur, qui m'ont permis de me consacrer entièrement à cette Thèse.

SOMMAIRE

SOMMAIRE.

INTRODUCTION.	1
PARTIE I.	3
CHAPITRE I: Myoglobine - Myosine.	3
1. Myoglobine.	3
1.1. Structure.	3
1.2. Localisation, rôle et élimination.	3
1.3. Concentrations normales et pathologiques.	4
1.3.1. Valeurs de référence et variations physiologiques.	4
1.3.2. Variations pathologiques.	4
1.3.2.1. Infarctus du myocarde.	4
1.3.2.2. Autres pathologies.	5
1.4. Intérêt et moyens de détection en pathologie cardiaque.	5
1.4.1. Cinétique de libération.	5
1.4.2. Méthodes de dosages.	6
1.4.2.1. Milieu urinaire.	6
1.4.2.2. Milieu sérique.	6
1.4.2.2.1. Réaction de fixation du complément.	6
1.4.2.2.2. Réaction d'inhibition de l'héماغglutination.	6
1.4.2.2.3. Méthode radioimmunologique.	7
1.4.2.2.4. Méthode d'agglutination sur lame.	7
1.4.2.2.5. Méthode immunoenzymatique.	8
1.4.2.2.6. Méthode immunonéphélométrique.	8
1.5. Sensibilité et spécificité diagnostiques dans l'infarctus.	9
1.6. Comparaison avec les marqueurs enzymatiques.	10
1.6.1. Cinétiques de libération.	10
1.6.2. Sensibilité et spécificité diagnostiques.	11
1.7. Conclusion.	13
2. Myosine.	13
2.1. Structure générale.	13
2.2. Localisation et fonctions.	14
2.3. Distribution des isoformes de myosine.	14
2.4. Intérêt et moyens de détection en pathologie cardiaque.	15
2.4.1. Chaînes légères.	15
2.4.1.1. Concentrations et cinétique.	15
2.4.1.2. Méthodes de dosages.	15
2.4.1.2.1. Méthode radioimmunologique.	15
2.4.1.2.2. Méthode de capture sur lame.	16
2.4.2. Chaînes lourdes.	16
2.4.2.1. Concentrations et cinétique.	16
2.4.2.2. Méthode de dosage.	16
2.5. Conclusion.	17
3. Conclusion générale.	17
CHAPITRE II: Néphélémétrie.	18
1. La néphélémétrie.	18

1.1. Définition.	18
1.2. Théories fondamentales de la diffusion de la lumière.	18
1.2.1. Théorie de Rayleigh.	18
1.2.2. Théorie de Mie.	19
2. L'immunonéphélémétrie classique.	19
2.1. Principe de la réaction de précipitation Ag/Ac.	20
2.2. Application à l'immunonéphélémétrie classique.	20
3. L'immunonéphélémétrie à supports microparticulaires.	22
3.1. Principe.	22
3.2. Synthèse des supports.	23
3.2.1. Principe.	23
3.2.2. Réactifs utilisés.	23
3.2.3. Protocole expérimental.	24
3.2.4. Caractérisation des lots de microsphères.	25
3.3. Sensibilisation des supports.	25
3.3.1. Couplage d'Ag.	25
3.3.1.1. Principe.	25
3.3.1.2. Protocole général de couplage.	25
3.3.1.2.1. Dialyse des MS natives.	26
3.3.1.2.2. Sensibilisation des MS.	26
3.3.1.2.3. Saturation des fonctions aldéhydes.	26
3.3.1.2.4. Elimination des ligands non couplés.	26
3.3.2. Couplage d'Ac.	27
3.3.2.1. Principe.	27
3.3.2.2. Protocole général de couplage.	27
3.3.2.2.1. Préparation du dextran amino.	27
3.3.2.2.2. Couplage du dextran amino sur les MS.	29
3.3.2.2.3. Couplage de l'Ac.	29
3.4. Modèles réactionnels utilisés.	29
3.4.1. Réaction d'inhibition de l'agglutination.	30
3.4.2. Réaction d'immunocapture amplifiée.	30
4. Appareillage.	30
4.1. Néphélémètres expérimentaux.	31
4.1.1. Le photogoniomètre.	31
4.1.2. Prototype modèle Labo III.	33
4.2. Prototype industriel N601.	33
4.3. Néphélémètre commercial N600 de Diagnostics Pasteur.	34
4.4. Laser néphélémètre (LN) Behring.	34
CHAPITRE III: Autres matériels et techniques utilisés.	35
1. Les Acn.	35
1.1. Principe d'obtention.	35
1.2. Limites de l'utilisation des Acn.	35
1.3. Acn en immunodiagnostic rapide.	36
2. Descriptions et intérêts des techniques utilisées pour l'étude des interférences sériques.	36
2.1. Le sang, milieu complexe.	36
2.2. Principes des techniques utilisées.	37
2.2.1. Méthode d'ultrafiltration.	37

2.2.2. Méthodes chromatographiques.	37
2.2.2.1. Filtration sur gel.	37
2.2.2.2. Echange d'ions sur DEAE cellulose.	38
2.2.3. Méthodes électrophorétiques.	38
2.2.3.1. Électrophorèse sur gel de polyacrylamide.	38
2.2.3.2. Isoélectrofocalisation.	39
2.2.4. Méthodes immunologiques.	39
2.2.4.1. Immunodiffusion double.	40
2.2.4.2. Immunoélectrophorèse.	40
2.2.4.3. Immunotransfert ("immunoblotting").	40
2.3. Conclusion.	41
PARTIE II: Mise au point en milieu synthétique de systèmes réactionnels utilisant des MS-Ag et des MS-Ac.	42
INTRODUCTION.	42
CHAPITRE I: Dosages de la myoglobine humaine.	42
1. Mise au point d'un dosage de la myoglobine par inhibition de l'agglutination.	42
1.1. Origine de la myoglobine à coupler sur les MS.	42
1.1.1. Synthèse et réactivité des MS-myoglobine (MS-Mb) humaine.	43
1.1.1.1. Préparation des MS-Mb.	43
1.1.1.1.1. Réactifs.	43
1.1.1.1.2. Dialyses des MS natives.	43
1.1.1.1.3. Couplage.	43
1.1.1.1.4. Saturation de l'excès de fonctions aldéhydes.	44
1.1.1.1.5. Elimination des ligands non couplés.	44
1.1.1.2. Réactivité des MS-Mb humaine.	44
1.1.1.2.1. Conditions opératoires.	44
1.1.1.2.2. Agglutination.	45
1.1.1.2.3. Inhibition de l'agglutination.	45
1.1.2. Synthèse et réactivité des MS-myoglobine de babouin.	49
1.1.2.1. Préparation de la myoglobine de babouin.	49
1.1.2.2. Synthèse des MS-Mb.	49
1.1.2.3. Réactivité des MS-Mb.	49
1.1.2.3.1. Agglutination.	49
1.1.2.3.2. Inhibition par la Mb humaine libre.	52
1.1.3. Conclusion.	52
1.2. Mise au point d'un dosage en 15 min de la myoglobine humaine.	52
1.2.1. Modifications de certains paramètres.	53
1.2.1.1. Modalités de couplage et tampon de réaction.	53
1.2.1.2. Conservation des MS sensibilisées.	53
1.2.2. Réactivité.	53
1.2.2.1. Agglutination par l'antisérum Dako.	53
1.2.2.2. Inhibition par la Mb humaine libre.	55
2. Mise au point d'un système réactionnel d'immunocapture à MS-Ac.	55
2.1. Synthèse des MS-Acm.	55
2.1.1. Préparation du dextran amino.	57
2.1.1.1. Fabrication.	57
2.1.1.1.1. Activation du dextran par le periodate de sodium.	57

2.1.1.1.2. Couplage de diaminoheptane.	57
2.1.1.1.3. Réduction.	57
2.1.1.1.4. Purification.	57
2.1.1.2. Détermination de la concentration et conservation.	57
2.1.2. Couplage de la solution de dextran amino aux MS.	58
2.1.2.1. Dialyses des MS.	58
2.1.2.2. Couplage et réduction.	58
2.1.2.3. Purification.	59
2.1.3. Couplage des Acm sur les MS-dextran.	59
2.1.3.1. Oxydation des MS-dextran par NaIO ₄ .	59
2.1.3.2. Couplage des Acm.	59
2.1.3.2.1. Caractéristiques des Acm.	59
2.1.3.2.2. Couplage.	60
2.1.3.2.3. Saturations.	61
2.1.3.2.4. Purification.	61
2.2. Réactivité des MS-Acm.	61
2.2.1. Système MS-Acm / Mb / As polyclonal.	61
2.2.1.1. Réaction en tampon de néphélémétrie à pH 8.2.	61
2.2.1.2. Réaction en tampon pH 8.2 dont le PEG est remplacé par du dextran sulfate.	62
2.2.1.2.1. Recherche du pourcentage optimal de dextran sulfate pour chaque lot.	62
2.2.1.2.2. Réaction.	64
2.2.2. Système MS-Acm / Mb / As de lapin (Dako) anti-Mb humaine / As de chèvre anti-Ig de lapin.	66
2.2.2.1. Principe.	66
2.2.2.2. Réaction.	66
2.2.2.2.1. Etude du système espèce / anti-espèce.	66
2.2.2.2.2. Stabilité des MS-Acm en présence des deux As.	68
2.2.2.2.3. Etude des temps d'incubation.	68
2.2.2.2.4. Comparaison des différents lots de MS-Acm.	71
3. Conclusion.	73
CHAPITRE II: Application du système sandwich au dosage de la myosine cardiaque humaine.	76
1. Préparation de la myosine.	76
1.1. Extraction.	76
1.2. Contrôle électrophorétique.	76
2. Préparation des MS-Acm.	78
3. Mise au point du dosage par sandwich.	78
3.1. Etude du système espèce / anti-espèce.	78
3.2. Stabilité des MS-Acm en présence des deux As.	78
3.3. Etude des temps d'incubation de chaque étape.	80
3.3.1. Temps d'incubation de la première étape.	80
3.3.2. Temps d'incubation de la deuxième étape.	82
3.4. Influence de la concentration en MS-Acm et de la dilution de l'As de lapin anti-myosine.	82
4. Conclusion.	84

PARTIE III: Dosage de la myoglobine en milieu sérique concentré - Applications à la détection de myoglobine pathologique.	85
INTRODUCTION.	85
CHAPITRE I: Mise au point de dosages de la myoglobine en milieu sérique par immunonéphélométrie.	86
1. Mise au point d'un dosage de la myoglobine par inhibition de l'agglutination en milieu sérique.	86
1.1. Etalonnage - Problème posé par l'emploi de sérum concentré.	86
1.1.1. Identité immunochimique de la myoglobine étalon et de la myoglobine contenue dans les échantillons pathologiques.	86
1.1.1.1. Conditions opératoires.	86
1.1.1.2. Résultats.	87
1.1.2. Inhibition de l'agglutination MS-Mb / As de lapin anti-Mb en milieu sérique concentré au 1/10 final.	87
1.1.2.1. Conditions opératoires.	87
1.1.2.1.1. Constitution d'un pool de sérums humains.	87
1.1.2.1.2. Protocole.	89
1.1.2.1.3. Résultats.	89
1.2. Traitement du milieu sérique et incidences sur la réaction d'agglutination MS-Mb / As de lapin anti-Mb.	89
1.2.1. Hypothèse de travail.	89
1.2.2. Stabilisation des signaux d'agglutination en milieu sérique concentré traité.	91
1.2.2.1. Protocole de traitement.	91
1.2.2.2. Traitement du pool et de sérums individuels.	92
1.2.2.3. Evaluation de l'efficacité du traitement: mesure des signaux d'agglutination en milieu sérique traité et non traité.	92
1.2.2.3.1. Conditions expérimentales.	92
1.2.2.3.2. Résultats.	93
1.3. Traitement du milieu sérique sans séparation.	96
1.4. Variations de certains paramètres du traitement.	96
1.4.1. Concentration des MS de traitement.	96
1.4.2. Nature du produit couplé sur les MS.	98
1.4.3. Diamètre des MS de traitement.	98
1.4.4. Temps de contact entre les MS de traitement et le milieu sérique.	98
1.4.5. Nature des MS de traitement.	100
1.5. Influence du traitement sur la concentration sérique en myoglobine.	102
1.5.1. Conditions expérimentales.	102
1.5.2. Résultats.	102
1.6. Dosage de la myoglobine en 15 min en milieu sérique au 1/10 final.	104
1.6.1. Traitement du milieu sérique.	104
1.6.2. Inhibition de l'agglutination MS-Mb / As anti-Mb par la myoglobine contenue en milieu sérique - Faisabilité du dosage en 15 min sur sérum au 1/10.	104
1.6.3. Validation du dosage de la myoglobine en milieu sérique.	106
1.6.3.1. Précision du dosage.	106
1.6.3.2. Exactitude de la méthode.	108

1.6.3.2.1. Etude de récupération de la myoglobine.	108
1.6.3.2.2. Comparaison de la méthode immunonéphélométrique avec le test sur lame Behring.	108
2. Application du traitement à la détermination de la myoglobinémie par le système sandwich MS-Acm / Mb / As de lapin anti-Mb / As de chèvre anti-Ig de lapin.	111
2.1. Conditions expérimentales.	111
2.1.1. Etapes réactionnelles.	111
2.1.2. Traitement de l'As de chèvre anti-Ig de lapin.	111
2.2. Réaction As de lapin anti-Mb / As de chèvre anti-Ig de lapin en milieu sérique.	113
2.3. Faisabilité et validation du dosage de la myoglobine en milieu sérique au 1/50.	113
2.3.1. Faisabilité du dosage.	113
2.3.2. Précision du dosage.	113
2.3.2.1. Répétabilité intra-essai.	113
2.3.2.2. Répétabilité inter-essai.	115
2.3.3. Exactitude de la méthode: étude de la récupération.	115
3. Conclusions.	116
CHAPITRE II: Dosages par inhibition de la myoglobine de sérums infarctiques.	117
1. Introduction.	117
2. Population étudiée - Dosages effectués.	117
2.1. Patients explorés.	117
2.1.1. Répartition.	117
2.1.2. Délai d'admission.	118
2.1.3. Sièges de l'infarctus.	118
2.1.4. Traitements.	118
2.2. Dosages effectués.	118
3. Résultats des dosages.	119
3.1. Résultats de chaque technique de dosage.	119
3.1.1. Myoglobine.	119
3.1.1.1. Néphélie.	119
3.1.1.2. RIA.	122
3.1.1.3. Test sur lame.	122
3.1.2. Myosine.	122
3.1.3. Enzymes.	123
3.2. Comparaisons entre les différents dosages et méthodes.	125
3.2.1. Ensemble des dosages Mb, CPK, CPK-MB et GOT.	125
3.2.2. Discordances entre Néphélie et RIA.	126
3.2.3. Classement selon l'étendue de la nécrose.	127
4. Conclusion.	131
PARTIE IV: Etude des interférences sériques.	132
INTRODUCTION.	132
REACTIFS ET MATERIEL.	134
1. Réactifs.	134
1.1. Préparation des MS sensibilisées.	134
1.2. Produits chimiques.	134
1.3. Réactifs immunologiques.	135
2. Matériel et appareillage.	135
CHAPITRE I: Fractionnement du sérum entier; caractérisation des pools.	136

1. Préparation des réactifs - protocoles expérimentaux.	136
1.1. Synthèse des MS-Ag, des MS-Ac, des MS-Ethanolamine, des MS-dextran et des MS-Eth de traitement.	136
1.1.1. MS-Ag.	136
1.1.2. MS-Ac.	136
1.1.2.1. Synthèse des MS-Ac souris.	136
1.1.2.2. Synthèse des MS-Ac lapin.	136
1.1.3. MS témoins.	136
1.2. Constitution du pool de sérums humains (sérum entier) et détermination de sa concentration protéique totale.	137
1.3. Protocole des tests néphélométriques et du traitement.	137
1.3.1. Tests néphélométriques.	137
1.3.2. Traitement.	138
1.3.3. Teneurs en protéines (DO à 280 nm).	138
2. Fractionnements du sérum entier et étude du potentiel agglutinant des fractions.	138
2.1. Ultrafiltration du sérum entier.	138
2.1.1. Mode opératoire.	138
2.1.2. Concentration des échantillons.	139
2.1.3. Tests néphélométriques.	139
2.1.3.1. Blancs MS et blancs fractions.	139
2.1.3.2. Tests de déstabilisation.	139
2.1.3.2.1. Comportements des MS-Ac, des MS-Mb et des MS-Eth.	139
2.1.3.2.2. Comportement des MS-dextran.	142
2.2. Filtration sur gel du sérum entier.	142
2.2.1. Mode opératoire.	142
2.2.2. Teneur en protéines (DO à 280 nm).	144
2.2.3. Tests de déstabilisation.	144
2.2.3.1. Comportements des MS-Ac.	144
2.2.3.2. Comportements des MS-Mb et des MS-Eth.	147
2.2.4. Constitution de pools.	147
2.2.5. Caractérisation des pools après traitement.	150
2.2.5.1. Teneur en protéines (DO à 280 nm) des surnageants de traitement.	150
2.2.5.2. Tests de déstabilisation des MS.	151
2.2.6. Conclusion.	151
3. Fractionnement sur DEAE cellulose des pools 1, 2, 3 et 4.	152
3.1. Mode opératoire.	152
3.2. Résultats des tests de déstabilisation et du traitement des fractions.	152
3.2.1. Pool 4.	153
3.2.1.1. Teneur en protéines (DO à 280 nm) des fractions.	153
3.2.1.2. Tests de déstabilisation.	153
3.2.1.3. Traitement.	155
3.2.1.3.1. Modification du protocole de traitement.	155
3.2.1.3.2. Teneur en protéines (DO à 280 nm) des surnageants de traitement.	155
3.2.1.3.3. Tests de déstabilisation des MS.	155
3.2.1.4. Constitution de sous-pools.	156

3.2.2. Pool 3.	156
3.2.2.1. Teneur en protéines (DO à 280 nm) des fractions et tests de déstabilisation.	156
3.2.2.2. Traitement.	158
3.2.2.2.1. Teneur en protéines (DO à 280 nm) des surnageants de traitement.	158
3.2.2.2.2. Tests de déstabilisation des MS.	158
3.2.2.3. Constitution de sous-pools.	159
3.2.3. Pool 2.	159
3.2.3.1. Teneur en protéines (DO à 280 nm) des fractions.	159
3.2.3.2. Constitution de sous-pools.	159
3.2.3.3. Tests de déstabilisation.	161
3.2.3.4. Traitement.	161
3.2.4. Pool 1.	162
3.2.4.1. Teneur en protéines (DO à 280 nm) des fractions et tests de déstabilisation.	162
3.2.4.2. Constitution d'un sous-pool et traitement.	162
4. Conclusion.	164
CHAPITRE II: Etudes analytiques qualitatives et quantitatives des pools.	165
INTRODUCTION.	165
1. Composition des pools et du sérum entier.	165
1.1. Protocoles techniques.	166
1.1.1. Méthodes électrophorétiques.	166
1.1.1.1. Electrophorèse en milieu dissociant (PAGE-SDS).	166
1.1.1.1.1. Echantillons.	166
1.1.1.1.2. Migration électrophorétique.	166
1.1.1.2. Isoélectrofocalisation.	167
1.1.1.2.1. Echantillons.	167
1.1.1.2.2. Migration électrophorétique.	167
1.1.2. Méthodes immunologiques.	167
1.1.2.1. Immunodiffusion double - immunoélectrophorèse.	167
1.1.2.2. Immunotransfert.	168
1.1.2.2.1. Electrotransfert.	168
1.1.2.2.2. Immunodétection.	169
1.2. Analyses qualitatives des pools et du sérum entier.	170
1.2.1. Pools 1 et 1B.	171
1.2.2. Pools 2, 2B et 2C.	171
1.2.3. Pools 3, 3A, 3B et 3C.	172
1.2.3.1. Résultats des électrophorèses.	172
1.2.3.2. Résultats des immunodiffusions et immunoélectrophorèses.	174
1.2.3.3. Résultats des immunotransferts.	176
1.2.3.4. Conclusions.	176
1.2.4. Pools 4, 4A, 4B et 4C.	178
1.2.4.1. Résultats des électrophorèses.	178
1.2.4.1.1. Pools 4.	178
1.2.4.1.2. Comparaison avec les pools 3 et 3C.	178

1.2.4.2. Résultats des immunodiffusions, immunoélectrophorèses et isoélectrofocalisation.	180
1.2.4.2.1. Immunodiffusions.	180
1.2.4.2.2. Immunoélectrophorèse et isoélectrofocalisation du pool 4A.	181
1.2.4.3. Résultats des immunotransferts des pools 4 et 4B.	181
1.2.4.3.1. Essais préliminaires sur le pool 4 non traité.	183
1.2.4.3.2. Résultats du pool 4B.	183
1.2.4.4. Conclusions.	187
1.2.5. Sérum entier.	188
1.2.5.1. Traitement du sérum entier.	188
1.2.5.2. Résultats des immunotransferts.	188
1.2.6. Conclusion.	189
2. Dosages par immunonéphélémétrie classique des protéines supposées interférentes.	189
2.1. Pools et sérum entier.	189
2.1.1. Protocole.	189
2.1.2. Résultats des dosages.	191
2.1.2.1. Protéines non affectées par le traitement.	192
2.1.2.2. Protéines affectées par le traitement.	192
2.1.2.2.1. Sérum entier.	192
2.1.2.2.2. Pools - comparaison avec le sérum entier.	194
2.2. Sérums individuels.	195
2.2.1. Tests de déstabilisation et traitement.	195
2.2.1.1. Protocoles des tests de déstabilisation et du traitement.	195
2.2.1.2. Résultats.	195
2.2.2. Dosages des protéines interférentes.	198
2.2.2.1. C3c et C3 PA.	198
2.2.2.2. Fibronectine.	198
2.2.2.3. C1q.	199
2.2.2.4. IgG.	199
2.2.2.5. Lien IgG-C1q.	200
2.3. Conclusions: données sur les protéines dosées.	200
3. Essai de compréhension du phénomène interférant.	201
3.1. Fibronectine.	201
3.1.1. Principe.	201
3.1.2. Inhibition.	201
3.1.2.1. Protocole.	202
3.2. C1q et IgG.	204
3.2.1. Etude des IgG et du C1q.	204
3.2.1.1. Essais réalisés.	204
3.2.1.2. Résultats des dosages.	205
3.2.1.2.1. IgG.	205
3.2.1.2.2. C1q.	206
3.2.1.2.3. Effets des traitements successifs.	206
3.2.2. C1q.	206
3.2.2.1. Travail sur les sérums individuels.	207

3.2.2.1.1. Résultats des dosages de Clq après des traitements successifs.	207
3.2.2.1.2. Résultats des surcharges.	209
3.2.2.2. Travail sur le sérum entier.	209
3.3. Conclusions.	210
CONCLUSION GENERALE.	213
BIBLIOGRAPHIE.	215

LISTE DES ABREVIATIONS

LISTE DES ABREVIATIONS.

Ac:	Anticorps
Acm:	Anticorps monoclonal
As:	Antisérum
Ag:	Antigène
ATP:	Adénosine-triphosphate
BSA:	Albumine sérique bovine
CPK:	Créatine phosphokinase
CPK-MB:	Créatine phosphokinase MB
CV:	Coefficient de variation
DO:	Densité optique
DP:	Diagnostics Pasteur
Eth:	Ethanolamine
GOT:	Transaminase glutamo-oxaloacétique
DEAE:	Diéthyl amino éthyl
EC:	Classification enzymatique
EDTA:	Acide éthylène diamine tétraacétique
HSA:	Albumine sérique humaine
Ig:	Immunoglobuline
LDH:	Lactico-deshydrogénase
LN:	Néphélémètre Laser
Mb:	Myoglobine
MHC:	Chaîne lourde de myosine
MLC:	Chaîne légère de myosine
MM:	Masse moléculaire
MS:	Microsphère
ms:	Milieu synthétique
NT:	Echantillon non traité
OMS:	Organisation mondiale de la santé
PBS:	Tampon phosphate 0.01M pH 7.2 additionné de NaCl 0.14M
PEG:	Polyéthylène glycol
RIA:	Radio Immunoassay
S:	Surnageant de traitement
SDS:	Sodium dodécyl sulfate
T:	Echantillon traité
T.A.:	Température ambiante
TCA:	Acide trichloroacétique
Tp.:	Tampon

INTRODUCTION

INTRODUCTION.

Les maladies cardio-vasculaires représentent actuellement la première cause de mortalité dans les pays industrialisés. En France, un tiers des 200000 décès annuels est la conséquence d'un infarctus du myocarde. Au terme de la période aiguë, la mortalité globale de cette affection a longtemps oscillé autour de 30%. Les progrès récents et sans cesse croissants du dépistage et du traitement ont permis de ramener ce taux aux alentours de 15%.

Nous assistons en effet depuis une décennie à une révolution dans le traitement de l'infarctus du myocarde, consistant à désobstruer l'artère coronaire thrombosée dans les toutes premières heures suivant la constitution du caillot sanguin. Au delà de 6 heures, ce traitement devient inefficace. De plus, ce traitement, en raison de ses risques, ne peut être appliqué que lorsque le diagnostic d'infarctus est établi avec une quasi-certitude.

Or le diagnostic en urgence se heurte encore à bien des difficultés: les signes cliniques peuvent être insuffisants ou absents (35); les premiers signes électrocardiographiques peuvent faire défaut (27% des cas selon Lévy (92)). D'autre part le dosage classique des enzymes libérés dans la circulation n'atteint des concentrations pathologiques que vers la 7^{ième} heure qui suit la formation du thrombus.

La décision d'appliquer un traitement thrombolytique s'avère donc délicate à prendre. L'absence d'un marqueur biologique précoce de l'infarctus, qui permettrait d'établir un diagnostic rapide et fiable se fait actuellement ressentir.

De nombreux travaux décrivent l'intérêt du dosage de la myoglobine, apparaissant rapidement dans la circulation après le début de la formation de la nécrose myocardique. Mais les méthodes immunochimiques quantitatives actuelles de détection ne permettent pas un dépistage en urgence.

Parallèlement à la recherche d'un marqueur précoce, d'autres travaux s'orientent vers la mise au point de dosages de substances biologiques apparaissant plus tardivement après la constitution de l'infarctus du myocarde, telle la myosine. Ils permettent de suivre l'évolution de la maladie pendant l'hospitalisation et d'évaluer l'importance de la masse nécrosée.

Il était donc justifié, dans ce contexte, d'étudier la faisabilité de dosages immunochimiques rapides et sensibles de la myoglobine et de la myosine, pour lesquels nous avons choisi une technique de mise en oeuvre simple, l'immunonéphélométrie à supports microparticulaires. Les difficultés rencontrées lorsque nous avons voulu transposer en milieu sérique le dosage de la myoglobine initialement mis au point en milieu artificiel nous ont conduit à entreprendre une étude plus fondamentale de l'interférence des milieux biologiques concentrés, et tout particulièrement des sérums humains, sur ces dosages.

Nous décrivons dans une première partie les caractéristiques biologiques de la myoglobine et de la myosine ainsi que les moyens de détection actuellement disponibles. Les principes généraux de l'immunonéphélométrie sont rappelés, cette technique constituant notre support de travail et les diverses méthodes utilisées font l'objet d'une description plus concise.

La deuxième partie comporte la mise au point de dosages immunonéphélométriques de la myoglobine et de la myosine en milieu synthétique.

La détection de la myoglobine en milieu sérique humain fait l'objet de la troisième partie; la méthode de dosage est validée sur des sérums de patients souffrant d'un infarctus.

Lors de la mise au point du dosage de la myoglobine en milieu sérique, nous nous sommes heurtés à des difficultés de réalisation des dosages liées à la composition intrinsèque

du sérum, dont des substances particulières interfèrent sur la réaction immunologique; ces problèmes ont été en grande partie surmontés grâce à un traitement préalable du milieu sérique à doser.

La quatrième partie détaille l'ensemble des investigations menées sur le milieu sérique afin de tenter d'analyser et de comprendre les phénomènes responsables de ces interférences.

PARTIE I

PARTIE I.

CHAPITRE I: Myoglobine - Myosine.

1. Myoglobine.

1.1. Structure.

La myoglobine a été découverte en France en 1803. Sa structure ne sera connue qu'en 1950 grâce à l'utilisation des rayons X par Kendrew et al.(74).

C'est une métalloprotéine de faible masse moléculaire (17800 Da). Elle est constituée d'une unique chaîne polypeptidique de 153 acides aminés, associée à un groupement porphyrinique contenant du fer (hème) qui est logé dans un repliement de la chaîne.

Autrefois appelée hémoglobine musculaire par analogie avec l'hémoglobine sanguine, elle est assez proche de cette dernière qui est constituée d'un tétramère de chaînes de structure comparable.

La myoglobine la plus étudiée, car disponible en grande quantité, est extraite du muscle squelettique de cachalot; elle présente de grandes analogies de structure primaire avec la myoglobine humaine (131).

L'analyse immunochimique de myoglobines provenant d'espèces variées a révélé la présence de cinq régions antigéniques dans la protéine native (3), toutes exposées à la surface de la protéine, et l'existence d'une spécificité d'espèce (7).

1.2. Localisation, rôle et élimination.

La myoglobine constitue une des protéines majeures du tissu musculaire, en particulier des muscles striés (squelettiques et cardiaques), où elle est exclusivement synthétisée. La myoglobine du muscle squelettique est chimiquement et immunologiquement identique à celle du muscle cardiaque (131).

Les muscles lisses ne contiennent pas de myoglobine.

Chez l'homme, le cœur est le muscle renfermant le plus de myoglobine (elle représente 0.7% de son poids total).

Les cellules épithéliales ainsi que le tissu thyroïdien contiennent de la myoglobine en faible concentration.

La myoglobine a la propriété de fixer l'oxygène avec une grande affinité par sa partie héminique, à condition que l'atome de fer soit sous forme Fe^{2+} . Elle permet de stocker l'oxygène indispensable pour la contraction musculaire. Dans les conditions physiologiques, et contrairement à l'hémoglobine, la myoglobine ne relâche pas l'oxygène. Son rôle physiologique chez l'homme est mal connu.

La myoglobine est éliminée surtout par les reins où la plus grande partie de la molécule semble être catabolisée; seulement 3% de la myoglobine sérique sont excrétés dans les urines (80). Sa demie-vie plasmatique est de 7.38 ± 2.8 heures (153).

1.3. Concentrations normales et pathologiques.

1.3.1. Valeurs de référence et variations physiologiques.

Les taux de myoglobine sérique sont très faibles; les valeurs rapportées dans la littérature diffèrent légèrement d'un auteur à l'autre: selon Fiet et al.(44), les concentrations normales sont de 12 à 80 ng/ml. Pour Stone et al.(147), ainsi que Gilkeson et al.(52), elles s'étendent de 6 à 85 ng/ml. Pour Klocke et al.(75) ces valeurs sont de 5 à 75 ng/ml. Varki et al.(158) indiquent une limite maximum de 85 ng/ml.

D'une façon générale, un taux sérique de myoglobine est considéré comme non pathologique s'il est inférieur à 85 ng/ml.

Ces concentrations sont susceptibles de subir quelques variations: chez les sportifs, la myoglobulinémie est accrue (15) à la suite d'un effort musculaire intense; 24 heures après l'exercice les taux sont revenus à la normale. Le travail musculaire se traduit par une lyse des cellules des muscles striés ou une modification de leur perméabilité membranaire, conduisant à une libération de myoglobine.

Une étude de Norregaard-Hansen (110) menée sur des enfants a montré une forte corrélation entre leur âge et la quantité de myoglobine sérique, ce qui n'est plus vérifié chez les adultes. Cet auteur (ainsi que Rosano (132)) a, par contre, constaté chez ces derniers des variations de la myoglobulinémie en fonction du sexe: les concentrations circulantes de myoglobine sont en effet sensiblement plus élevées chez l'homme. Cela tendrait à prouver que la masse musculaire a une influence sur la myoglobulinémie.

1.3.2. Variations pathologiques.

Lors de lésions musculaires, la myoglobine diffuse rapidement dans la circulation sanguine; des valeurs supérieures à 85 ng/ml sont pathologiques.

1.3.2.1. Infarctus du myocarde.

En 1975 Kagen (68) fut le premier à mettre en évidence une hausse du taux sérique de myoglobine au cours de l'infarctus du myocarde.

L'infarctus correspond à une nécrose ischémique massive (lésions dont les dimensions sont supérieures à 2 cm de diamètre) et irréversible du muscle cardiaque (90). Deux circonstances peuvent provoquer une ischémie, qui est la lésion histologique élémentaire: soit les besoins métaboliques en oxygène dépassent la possibilité d'apport (au cours d'un effort), la fréquence cardiaque augmente alors trop; soit les apports d'oxygène au muscle chutent brusquement, indépendamment des besoins des cellules. Cette ischémie résulte le plus souvent d'une ou plusieurs occlusions de gros troncs artériels coronaires. La circulation coronaire devient incapable d'assurer les besoins métaboliques des fibres myocardiques et de leur apporter suffisamment d'oxygène. Lorsque l'hypoxie est brève (inférieure à environ 15 minutes), l'ischémie myocardique n'engendre que des troubles fugaces et réversibles (c'est l'angine de poitrine). Lorsqu'elle est prolongée (durée supérieure à 15 min), l'ischémie provoque pratiquement toujours des lésions cardiaques définitives, localisées dans le ventricule gauche, dont l'étendue dépend de la durée de l'hypoxie myocardique.

L'hypoxie entraîne une désorganisation progressive du fonctionnement des cellules; les protons H^+ s'accumulent dans les cellules du fait de l'arrêt des réactions de réduction, le pH intracellulaire diminue, ce qui accroît la perméabilité membranaire des cellules myocardiques. Elles libèrent dans le milieu extracellulaire des ions H^+ , du potassium, du phosphate, des macromolécules, telles que la myosine et la myoglobine (3 mg/g de tissu nécrosé), ainsi que des enzymes (créatine phosphokinase (CPK), créatine phosphokinase MB (CPK-MB), lactico-deshydrogénase (LDH), transaminase glutamo-oxaloacétique (GOT)), retrouvées dans la circulation sanguine. La myoglobine est retrouvée dans la circulation sanguine quelques heures après la constitution de la nécrose.

1.3.2.2. Autres pathologies.

Dans le domaine cardiaque, certaines affections peuvent engendrer une hypermyoglobinémie (120); ainsi l'angor "instable", résultant d'un état ischémique réversible du myocarde, n'aboutit pas toujours à la formation d'un infarctus, mais peut créer des hausses de myoglobine sérique. Des taux augmentés de myoglobine peuvent également être détectés lors de troubles douloureux thoraciques tels que la péricardite, lors de chocs électriques externes, ou lors des coronarographies (9).

La libération de myoglobine dans la circulation sanguine n'est pas spécifique du muscle cardiaque; toute lésion musculaire (traumatismes musculaires, myopathies, rhabdomyolyses), entraînant une lyse des cellules, est susceptible de conduire à la diffusion de myoglobine vers la circulation.

L'augmentation de la myoglobinémie est également constatée dans les pathologies conduisant à la formation d'une ischémie (embolies pulmonaires, accidents vasculaires cérébraux), dans les pathologies relevant d'une hypo-oxygénation tissulaire (comas toxiques, chocs cardiogéniques), lors de cancers généralisés, de brûlures. Les patients atteints d'insuffisance rénale chronique, d'hypothyroïdie, d'hypoglycémie voient leur myoglobinémie augmenter significativement.

1.4. Intérêt et moyens de détection en pathologie cardiaque.

1.4.1. Cinétique de libération.

La myoglobine, du fait de sa faible masse moléculaire diffuse rapidement dans la circulation lors de la perte de perméabilité de la membrane; elle constitue le marqueur le plus précoce de l'infarctus.

Cette libération ne semble pas linéaire dans le temps (92); lente au début, elle s'accélère ensuite, ce qui laisse supposer que les cellules ne meurent pas toutes en même temps: le processus commence par la désintégration d'une cellule puis s'étend progressivement. Ce phénomène pourrait expliquer la libération en "staccato" décrite par certains auteurs (34, 69, 153) dans les premières heures suivant l'infarctus.

La cinétique de libération de la myoglobine est particulièrement rapide; l'apparition d'un taux pathologique dans le sang après l'heure présumée de constitution de la nécrose varie quelque peu selon les auteurs: ce taux apparaît à environ 3 heures pour Bouget (16), Catheline (22), Glaizal (53); il semble légèrement plus tardif chez Tommaso (153) (3.8 heures), un peu plus précoce chez Grenadier (58) (1 à 2 heures).

Le plateau de concentration maximale, habituellement bref, se trouve à 9.3 h selon Glaizal (53) (6 h chez Grenadier (58), 8.24 h chez Bouget (16), 6.88 h chez Tommaso (153)).

Le retour à des valeurs normales survient avant 24 heures pour de nombreux auteurs.

1.4.2. Méthodes de dosages.

Les concentrations normales de myoglobine étant faibles, aussi bien dans les urines que dans la circulation sanguine, des techniques immunologiques n'ont cessé de se développer depuis 1975 pour permettre sa détection: elles présentent en effet l'avantage d'être plus sensibles et plus spécifiques que les méthodes chimiques ou physiques anciennement utilisées.

De plus, la myoglobine étant un marqueur précoce de l'infarctus, de nombreuses recherches ont pour objectif d'accroître la rapidité de mise en oeuvre des techniques tout en maintenant leur fiabilité.

1.4.2.1. Milieu urinaire.

La myoglobine est normalement absente dans les urines. Elle ne s'y trouve qu'en cas d'hypermyoglobinémie, témoignant d'une atteinte musculaire striée squelettique (83) ou cardiaque (1).

Les méthodes de détermination de la myoglobinurie sont actuellement immunologiques: immunodiffusion radiale (6, 135), inhibition de l'héماغglutination (1, 33, 91).

L'excrétion de la myoglobine apparaît comme extrêmement variable non seulement d'un sujet à l'autre, mais également d'un prélèvement au suivant (158). Un nombre important d'échantillons doit donc être analysé. Malgré cela, ces techniques rapides mais non quantitatives se heurtent à des problèmes de sensibilité, de nombreux cas pathologiques n'étant pas décelés (1, 91).

Le recours à des méthodes radioimmunologiques, utilisées avec succès pour doser la myoglobine sérique, s'est toujours soldé par un échec total (34), du à des problèmes de méthodologie, mais aussi à un manque de connaissances sur l'élimination rénale de la myoglobine et sa dégradation dans l'urine (126).

Un test positif peut laisser suspecter la présence d'un infarctus. En revanche un résultat négatif n'exclut pas un infarctus. Dans ces deux cas, des examens supplémentaires s'avèrent absolument indispensables, ce qui limite l'intérêt pratique de ces tests.

1.4.2.2. Milieu sérique.

1.4.2.2.1. Réaction de fixation du complément.

Cette méthode a été appliquée au dosage de la myoglobine sérique après infarctus du myocarde par Kagen (68). Elle est actuellement abandonnée du fait de sa faible sensibilité, ne permettant pas de déceler de myoglobine circulante chez des sujets normaux (ne souffrant d'aucune pathologie) et de la longueur de la technique, nécessitant une incubation d'une nuit entre les dilutions de sérum à tester, les anticorps anti-myoglobine et le complément.

1.4.2.2.2. Réaction d'inhibition de l'héماغglutination.

Kagen et son équipe (70) rapportent des seuils de détection de 50 ng/ml, excluant le dosage de concentrations non pathologiques.

Cette méthode n'est plus utilisée.

1.4.2.2.3. Méthode radioimmunologique (148).

Pour la plupart des auteurs, la technique consiste à ajouter au sérum du malade une concentration déterminée de molécules de myoglobine humaine radiomarquée à l'iode 125 (11) et une quantité fixe d'anticorps polyclonaux de lapin anti-myoglobine. A notre connaissance, une seule étude relate l'utilisation d'anticorps monoclonaux (Acm) (107). Une incubation est nécessaire, pendant laquelle une compétition se crée entre la myoglobine exogène marquée et la myoglobine endogène à doser pour un nombre défini de sites anticorps, ces derniers étant en quantité non saturante par rapport aux antigènes.

La technique radioimmunologique (RIA) permet de détecter 10 ng/ml de myoglobine sérique (9, 107, 147). Glaizal (53) constate une sensibilité de 8 ng/ml. Cette méthode n'est pas affectée par l'hémolyse ou la congélation des sérums à -20°C. Les réactions croisées vis-à-vis de l'hémoglobine sont négligeables (132).

C'est la technique de référence la plus employée à l'heure actuelle, bien que la longueur et la lourdeur des manipulations limitent son intérêt diagnostique pour un dosage d'urgence. Elle est à l'origine de nombreuses publications, proposant des variantes méthodologiques différant essentiellement par les temps de réaction: certaines préconisent une incubation d'une nuit à 4°C (67, 97, 147) tandis que d'autres (132) décrivent un dosage de sensibilité suffisante en incubant 3.5 heures à 37°C. Reichlin (126) et plus récemment Biéva (9) utilisent des méthodologies plus rapides en 2 heures.

Actuellement, à notre connaissance, deux coffrets sont commercialisés: NMS Pharmaceuticals Inc. et CEA Sorin Myok.

1.4.2.2.4. Méthode d'agglutination sur lame.

1.4.2.2.4.1. Description de la méthode.

Ce test fait intervenir une suspension de particules de latex sensibilisées avec des anticorps (Ac) anti-myoglobine humaine et un milieu absorbant destiné à éliminer les réactions aspécifiques dues à l'éventuelle présence de facteurs rhumatoïdes. L'addition de sérum de malade provoque une agglutination par la myoglobine des latex-Ac anti-myoglobine, visible sur une plaque à fond noir. Les résultats sont évalués par comparaison aux réactions de 2 témoins, l'un positif (dont la concentration en myoglobine est de 140 ng/ml), l'autre négatif (concentration inférieure à 50 ng/ml).

Le seuil de détection annoncé est de 100 ± 20 ng/ml de myoglobine, vérifié expérimentalement (44).

Une étude (111) a cependant montré que pour des concentrations comprises entre 80 et 140 ng/ml, le test pouvait être tantôt négatif, tantôt positif. Cette zone de concentration correspondant à la limite de positivité, la reproductibilité des résultats y est variable.

Par contre, pour les sérums dont la concentration en myoglobine est inférieure à 80 ng/ml ou supérieure à 140 ng/ml, le test est satisfaisant et reproductible (111).

Deux protocoles semi-quantitatifs permettent d'affiner les résultats:

- L'agglutination d'un sérum est suivie au cours du temps après mélange des réactifs et agitation lente de la plaque; la positivité du test est ainsi estimée par des signes +4, +3, +2 ou +1 selon qu'elle apparaît respectivement à 1, 2, 3 ou 4 minutes (23, 134). L'équipe de Fiet (44) évalue le test comme positif (+) si l'agglutination apparaît à partir de 5 min, très positif (++) si elle est visible dès 3 min d'agitation.

- La réaction est détectée à un temps fixe de 5 min (111) sur une série de dilutions du sérum. La concentration est estimée à partir de la dernière dilution sérique provoquant encore une agglutination des particules (un sérum dilué au 1/2 renferme environ 200 ng/ml de myoglobine, etc...).

1.4.2.2.4.2. Comparaison avec la méthode RIA.

L'apparition du kit commercial Rapi Tex®-Myoglobine (Behring) sur lame remonte à 1984; jusqu'alors, et encore actuellement le dosage de la myoglobine sérique était essentiellement pratiqué par la méthode RIA; mais cette technique, de mise en oeuvre longue et contraignante n'est pas adaptée aux cas d'urgence. L'utilisation d'un test rapide (résultat avant 5 min), simple à manipuler semble préférable.

La validité de cette méthode a fait l'objet d'études comparatives avec la technique RIA.

Dans les zones de concentration inférieures à 80 ng/ml ou supérieures à 140 ng/ml, donc en dehors des conditions limites du test sur lame, les deux méthodes concordent à 100%.

Les résultats radioimmunologiques sont positifs dès que la concentration en myoglobine atteint 80 ng/ml. Sur lame, ils sont soit positifs soit négatifs, d'où la mauvaise corrélation constatée entre 80 et 140 ng/ml (44).

Le dosage RIA est donc plus précis et plus sensible que la technique sur lame.

1.4.2.2.5. Méthode immunoenzymatique (112).

Le principe de la méthode se base généralement sur une capture antigénique; l'échantillon à doser est pris en sandwich entre des Ac fixés sur plaque et des Ac en excès préalablement couplés à la peroxydase. L'activité enzymatique est révélée après addition du substrat, activé par l'enzyme pour donner un produit coloré détecté au photomètre.

Plusieurs équipes (26, 50, 109) ont dosé la myoglobine sérique en ayant recours à des anticorps polyclonaux. Récemment, grâce au développement des anticorps monoclonaux (78), un test sensible a été mis au point (66); les Acm fixés sur la plaque de polystyrène sont différents de ceux couplés à l'enzyme, chacun étant dirigé contre un des cinq épitopes de la myoglobine. La présence d'éventuelles interférences se liant aux Acm adsorbés, donc amenant des résultats faussement positifs, est détectée par l'utilisation d'Acm tous identiques (14). Le nombre de résultats faux positifs est faible (1.2%); la méthode détecte 2 ng/ml et consomme très peu de sérum.

L'équipe de Moscoso (107) a développé un dosage de la myoglobine en utilisant également des Acm mais non immobilisés sur la plaque; la myoglobine contenue dans l'échantillon entre en compétition avec la myoglobine fixée sur plaque pour une quantité déterminée d'Acm. La méthode présente une sensibilité de détection de 10 ng/ml, comparable à celle de RIA.

La détection immunoenzymatique de la myoglobine, par capture ou par compétition n'exige pas l'équipement particulier et lourd de la méthode RIA, et elle est moins coûteuse.

Néanmoins, tout comme la RIA, elle se prête mal aux tests d'urgence cardiologiques en raison du temps assez long des manipulations (à peu près 3 heures).

1.4.2.2.6. Méthode immunonéphélométrique.

Le principe est tout à fait identique à celui décrit à propos du test sur lame; la réaction s'effectue en milieu liquide; les particules de latex enrobées d'Ac anti-myoglobine humaine

sont mises en présence de sérum pathologique. L'agglutination est détectée au néphélémètre. L'évaluation de ce test faisable en 10 minutes (test NA Latex Myoglobine Behring) (12, 24) montre une sensibilité de détection de 6 ng/ml.

1.5. Sensibilité et spécificité diagnostiques dans l'infarctus.

Toute méthode de dosage, ayant fait ses preuves de sensibilité de détection, spécificité et fiabilité, doit comporter une étude d'évaluation diagnostique. Les conditions idéales de test n'existent pas en pratique; souvent les domaines de concentrations normale et pathologique se recoupent. Il s'agit donc de pratiquer le test d'une part sur des sujets malades, d'autre part sur des sujets sains; les premiers permettront de chiffrer la sensibilité diagnostique du test, les derniers la spécificité diagnostique. D'autre part sont calculées les valeurs prédictives négative et positive du test.

$$\text{Sensibilité diagnostique: } \frac{M+T+}{M+}$$

$$\text{Spécificité diagnostique: } \frac{M-T-}{M-}$$

$$\text{Valeur prédictive positive: } \frac{M+T+}{T+}$$

$$\text{Valeur prédictive négative: } \frac{M-T-}{T-}$$

M+: nombre de sujets malades, c'est à dire présentant un infarctus du myocarde.

M-: nombre de sujets non malades.

T+: nombre de sujets présentant le test étudié positif.

T-: nombre de sujets présentant le test étudié négatif.

M+T+: nombre de sujets présentant la maladie et le test étudié positif.

M-T-: nombre de sujets ne présentant ni la maladie ni le test étudié.

D'un point de vue pratique, les résultats faussement normaux ne sont pas tolérés; les résultats faussement pathologiques sont supportables s'ils ne dépassent en général pas 10% (81). Néanmoins, lorsque les causes de ce manque de spécificité sont connues et qu'une autre méthode plus spécifique permet de contrôler le résultat, des pourcentages supérieurs à 10% seraient tolérés. La myoglobine cardiaque étant immunologiquement identique à celle des muscles squelettiques, tout dommage musculaire (cf. Ch.I.1.3.2.2.) est susceptible d'entraîner une hausse de la myoglobinémie, sans toutefois atteindre des concentrations aussi élevées qu'au cours de l'infarctus. La variation "pathologique" de la myoglobinémie lors d'un infarctus est en effet suffisamment grande pour être significative.

Selon les auteurs, la sensibilité diagnostique du dosage radioimmunologique de la myoglobinémie varie de 40 à 100%, lorsque le seuil pathologique est fixé à 85 ng/ml.

La myoglobine est le marqueur sérique de l'infarctus le plus précoce, augmentant dans la circulation quelques heures après le début des douleurs de l'infarctus et disparaissant rapidement. Ainsi, selon le nombre de prélèvements et leur chronologie par rapport à l'horaire présumé de constitution de la nécrose, les résultats des protocoles d'étude peuvent discorder. Certaines études considèrent l'évolution du taux de myoglobine à partir du début des douleurs (16, 134) caractéristiques de l'infarctus, d'autres prennent en compte l'heure d'hospitalisation; or entre le début des douleurs et le moment d'hospitalisation, il s'écoule en moyenne 9 heures. La sensibilité diagnostique du dosage de la myoglobine dépend donc essentiellement du temps qui s'est écoulé depuis les premiers symptômes douloureux (158).

Mac Comb (96) a étudié la sensibilité diagnostique de la myoglobinémie en se basant sur le début des douleurs; elle est de 25% après la première heure, de 89% à la quatrième heure, de 93% à la sixième heure. Une étude similaire menée chez Grenadier (58) montre

cependant des taux légèrement supérieurs, indiquant une sensibilité de 100% dès la troisième heure après le début des douleurs.

De ces nombreuses études, il ressort que la sensibilité diagnostique du dosage radioimmunologique est supérieure en moyenne à 90% 3 heures après le début de la nécrose myocardique.

Par ailleurs, la myoglobine n'étant pas un marqueur spécifique de l'infarctus, la répétition des dosages chez un même patient confortera la présence ou non de nécrose myocardique; la plupart des études ne comporte qu'un nombre limité de prélèvements, d'autres s'attachent à suivre les taux au cours du temps (toutes les 2 ou 4 heures) (16, 22, 58). Plus les prélèvements sont fréquents meilleure est la sensibilité.

La spécificité diagnostique de la myoglobinémie pour le diagnostic d'infarctus est étudiée chez des patients ne souffrant pas d'infarctus mais présentant des épisodes douloureux identiques (angor instable, embolie pulmonaire); la littérature rapporte des taux de spécificité s'échelonnant de 66% à 96.4% (56, 96). La valeur prédictive positive est comprise entre 40% et 94%, la valeur prédictive négative atteint 100%.

Le test sur lame fournit des pourcentages légèrement différents, variant selon les auteurs. Norregaard-Hansen (111) rapporte une sensibilité proche de 100%. Une étude de Toft (151) rapporte qu'un sérum non dilué très riche en myoglobine (concentration entre 5000 et 10000 ng/ml) donnait un résultat négatif qui se positivait (agglutination) pour le même sérum dilué 10 fois. Donc lorsqu'une hypermyoglobinémie est suspectée, il est nécessaire de diluer les échantillons pour éviter les effets de zone.

La spécificité diagnostique de ce test n'est que de 33% selon Schultz (138), de 43% d'après Chapelle (23).

La valeur prédictive positive se situe autour de 70%. La valeur prédictive négative est de 100% permettant d'exclure un diagnostic d'infarctus.

1.6. Comparaison avec les marqueurs enzymatiques.

Le diagnostic biologique de l'infarctus est classiquement établi après la détermination des enzymes témoignant de la lyse du muscle cardiaque:

- La CPK (créatine phosphokinase; EC 2.7.3.2.) catalyse la transformation de la créatine en phosphocréatine à partir de l'ATP. C'est un dimère existant sous 3 isoenzymes: MM dans le muscle, BB dans le cerveau et MB dans le muscle cardiaque. La CPK-MB, spécifique du muscle cardiaque est recherchée lorsque les tests de détection des CPK montrent un taux anormalement élevé (37).
- La GOT (transaminase glutamo-oxaloacétique; EC 2.6.1.) catalyse le transfert du groupement NH_2 de l'acide glutamique sur l'acide oxalo-acétique.
- La LDH (lactico-deshydrogénase; EC 1.1.1.27.) catalyse la transformation réversible du pyruvate en lactate.

1.6.1. Cinétiques de libération.

Les données chiffrées des cinétiques de libération des enzymes varient quelque peu selon les auteurs, en raison de différences dans les protocoles d'études; néanmoins la comparaison des tracés respectifs des enzymes et de la myoglobine conduit aux mêmes conclusions.

Ainsi, concernant les CPK, l'équipe de Catheline (22) rapporte les chiffres suivants (figure 1):

- L'apparition d'une concentration sérique pathologique survient vers 7 h 30 min pour les CPK et la CPK-MB, alors que la myoglobine apparaît dès la troisième heure après la constitution de la nécrose.
- Les pics de concentration maximale de CPK et CPK-MB sont respectivement situés à 18 h 40 min et 11 h 40 min; celui de la myoglobine est atteint en 8 h 30 min.
- Le retour à des concentrations normales s'effectue vers 60 h pour les CPK, 34 h pour les CPK-MB et environ 27 h en ce qui concerne la myoglobine.

Ces résultats montrent clairement le caractère précoce et rapide de la libération de myoglobine par rapport aux CPK.

L'activité enzymatique de la GOT devient anormalement élevée 8 h à 12 h après l'apparition des premiers symptômes, le pic survient 18 h à 36 h après l'infarctus; les valeurs normales sont atteintes entre le troisième et le quatrième jour (145). Ce marqueur enzymatique présente une cinétique beaucoup plus lente que la myoglobine; lorsque son taux commence à devenir pathologique, celui de la myoglobine est à son maximum.

La valeur sérique de la LDH devient anormale 24 h à 48 h après constitution de la nécrose; elle atteint un maximum entre 3 et 6 jours puis retrouve son taux de base entre 8 et 14 jours. Il s'agit d'un marqueur tardif, plus d'une semaine s'écoulant avant le retour à des valeurs normales. Cependant il permet de formuler un diagnostic rétrospectif et confirme un pronostic favorable.

1.6.2. Sensibilité et spécificité diagnostiques.

De nombreuses études comparent les sensibilités et spécificités diagnostiques de la myoglobine à celles des CPK et de la CPK-MB dans le but de définir le marqueur le plus performant pour un diagnostic rapide; les temps de prélèvement des échantillons sont donc courts.

Les cinétiques de libération de la myoglobine, d'une part, et des CPK et CPK-MB, d'autre part, étant très différentes, les sensibilités comparatives présentent des variations. Tous les auteurs rapportent des chiffres sensiblement équivalents. 4 h après le début des premiers symptômes, la myoglobine est détectée chez 92% des malades alors que les CPK totales ne sont décelées que dans 56% des cas (96). 6 h après constitution de la nécrose, la sensibilité de la myoglobine est inchangée, celle des CPK s'élève par contre à 82% (96). Une étude de Dufour (35) montre qu'à l'admission en unité de soins intensifs, la sensibilité des CPK n'est que de 24%, celle de CPK-MB de 19%.

Sur un nombre total de 16 malades hospitalisés dans un délai de moins de 4 h après le début des douleurs, l'équipe de Schrive (137) a constaté dans tous les cas une hypermyoglobinémie alors que les marqueurs enzymatiques étaient négatifs.

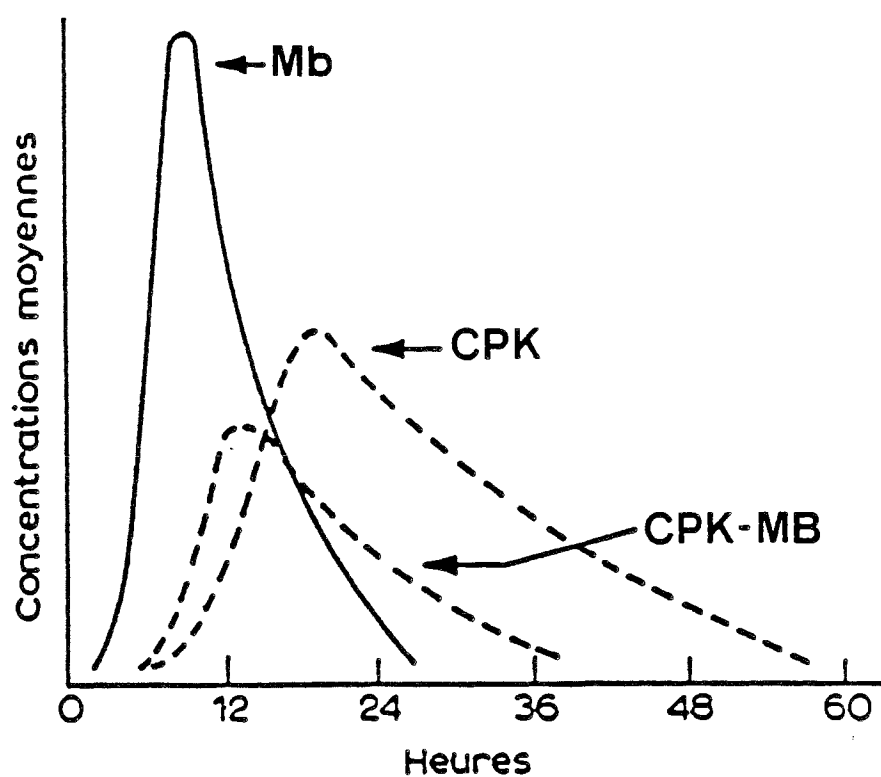
Grenadier (58) a pris en compte le temps écoulé depuis la formation de l'infarctus pour atteindre une sensibilité de 100%; la myoglobine atteint cette sensibilité en 3 h, soit 6 h avant la CPK-MB et 7 h avant les CPK totales.

En revanche, à la 36^{ème} heure, la myoglobine revient à un taux normal chez 67% des malades alors que ce taux n'est atteint que dans 3% des cas pour les CPK totales (96).

La spécificité diagnostique de la myoglobine est inférieure à celle des CPK totales et de CPK-MB (96, 110). La CPK-MB constitue le marqueur enzymatique le plus spécifique pour

Figure
1

Variations cinétiques expérimentales globales des concentrations sériques de la myoglobine (Mb), de la créatine phosphokinase (CPK) et de la créatine phosphokinase MB (CPK-MB) (d'après Catheline et al (22))



le diagnostic d'infarctus car elle n'est présente, en quantité appréciable, que dans le myocarde. La myoglobine, entrant dans la constitution de tous les muscles striés, n'est pas cardiospécifique.

En conclusion, la sensibilité de la myoglobine est supérieure à celle des systèmes enzymatiques. Tous possèdent, certes, une sensibilité de 100%, mais comparativement à la CPK-MB, elle est atteinte 6 h plus tôt pour la myoglobine. Or le facteur temps est déterminant pour entreprendre au plus vite le traitement de thrombolyse.

La rapidité particulière de la cinétique de la myoglobine permet de formuler un diagnostic précoce dès les toutes premières heures de constitution de la nécrose. De plus, du fait de la rapidité de son élimination plasmatique, une extension ou une récurrence de la nécrose peuvent être mises en évidence, se traduisant par un second pic d'élévation de la myoglobine. Une telle précocité de détection témoigne d'une meilleure sensibilité.

1.7. Conclusion.

Les techniques radioimmunologiques sont les méthodes de dosages de la myoglobine actuellement les plus utilisées.

Le test sur lame est moins précis car semi-quantitatif. Certains auteurs (56) rapportent des problèmes techniques de mise en oeuvre.

La méthode RIA est plus fiable, mais plus longue et donc mal adaptée à l'urgence. Le test sur lame présente l'avantage d'être rapide et facile à réaliser.

Ces deux techniques montrent des sensibilités satisfaisantes. Leur manque de spécificité diagnostique implique que seules les valeurs prédictives négatives, proches de 100%, peuvent être exploitées. Ainsi, un dosage de myoglobine, trouvé négatif et confirmé par des mesures répétées entre le début des symptômes douloureux et la douzième heure permet d'exclure un diagnostic d'infarctus.

2. Myosine.

2.1. Structure générale (59).

Sa découverte par Engelhardt date d'une cinquantaine d'années. Les investigations biochimiques ont depuis fourni des informations détaillées sur la structure de cette protéine hexamérique de haute masse moléculaire (MM de 500000 Da).

Une unité de myosine contient deux chaînes lourdes de MM 200000 Da et deux paires de chaînes légères de types différents, de MM 19000 Da et 24000 Da.

Ces six structures polypeptidiques, associées par des liaisons non covalentes, confèrent à la molécule une structure en bâtonnet allongé (160 nm), auquel se joignent deux têtes (20 nm de diamètre); les deux chaînes lourdes ont une structure en α hélice dans leur partie -CO₂H et s'enroulent l'une autour de l'autre, constituant la structure rigide de la molécule, le bâtonnet. Chaque tête de myosine est formée par la partie globulaire -NH₂ terminale d'une chaîne lourde, liée à deux chaînes légères.

La myosine non dénaturée n'est pas trouvée sous forme d'unités; la protéine est en effet agrégée en rangées régulières, pour constituer le filament épais (cf. Ch.I.2.2.), résultant d'une superposition antiparallèle de tiges de myosine, d'où sortent les têtes à la surface.

Chaque chaîne lourde peut être scindée par diverses protéolyses enzymatiques, donnant naissance à des fragments spécifiques bien identifiés:

- La zone S₁, de MM 90000 Da, correspond à la partie globulaire -NH₂ terminale.
- La zone S₂, de MM 50000 Da est située dans la partie centrale. L'ensemble du S₁ et du S₂ est appelé méromyosine lourde.
- La méromyosine légère (LMM), de MM 60000 Da correspond à la partie -CO₂H terminale.

La séquence complète des acides aminés des chaînes lourdes (MHC) cardiaques n'est pas encore publiée mais des séquences partielles ont été déduites d'analyses de fragments (47, 93), permettant d'estimer le nombre d'acides aminés à environ 2000. Par contre les séquences primaires des chaînes légères (MLC) sont déterminées totalement (87). Ces chaînes sont de deux types différents I et II (MLCI et MLCII) de structures primaires très proches; mais les MLCII sont susceptibles d'être phosphorylées par les mécanismes contrôlant la contraction musculaire.

2.2. Localisation et fonctions.

La myosine est la protéine musculaire majeure des cellules eucaryotes; elle existe dans les muscles lisses et striés, ces derniers comprenant les muscles squelettiques et le muscle cardiaque.

Intimement associée à l'actine, elle se trouve au coeur de l'organisation de l'appareil contractile des muscles striés. L'étude microscopique des cellules de ces muscles montre la présence de faisceaux de filaments, appelés myofibrilles. Chaque myofibrille présente la structure régulière du muscle strié, caractérisée par une chaîne de sarcomères ou unités de contraction du muscle. Chaque sarcomère contient deux types de filaments, les filaments épais, formés de 300 à 400 molécules de myosine, et les filaments fins, constitués d'actine.

La contraction musculaire résulte d'un glissement des filaments épais et minces les uns sur les autres. Ce mécanisme est alimenté par l'hydrolyse de l'ATP au sein du filament épais et contrôlé par le Ca²⁺ et l'AMP cyclique. Cette activité ATPasique fournit l'énergie chimique nécessaire à la contraction. Elle est détectée au niveau du fragment S₁ de la myosine, là où s'effectue la liaison aux fibres d'actine. Durant la contraction, des ponts se forment entre les têtes et les filaments d'actine, grâce à la flexibilité de la molécule de myosine dans les zones charnières délimitant d'une part S₁ de S₂, d'autre part S₂ de LMM.

La tige filamenteuse de la molécule de myosine est dépourvue d'activité enzymatique et ne fixe pas d'actine. De par sa conformation elle confère au bâtonnet une structure rigide et tend à l'agréger dans les conditions ioniques existant dans les muscles.

2.3. Distribution des isoformes de myosine.

La myosine se présente sous forme d'isoenzymes, terme désignant des structures différentes de la protéine mais conservant toutes la même activité biologique.

Flink et al.(46) ont découvert des isoformes des chaînes lourdes de myosine cardiaque chez le lapin; Schwartz et al.(140) firent ensuite la même constatation chez le rat.

Ce polymorphisme concerne les chaînes lourdes de myosine, qui existent aux niveaux ventriculaire et atrial sous deux isoformes nommés α et β (63). La présence de ces deux formes, différant par leur structure primaire, leurs propriétés immunologiques et leur activité enzymatique suggère un codage par deux gènes différents (98).

Les chaînes lourdes α et β s'associent dans les fibres cellulaires pour constituer trois types de myosine ($\alpha\alpha$, $\alpha\beta$, $\beta\beta$), visualisés par microscopie électronique (31).

Les proportions relatives de ces isoenzymes varient avec l'espèce; ainsi l'expression de la chaîne α est accrue lorsque la taille du coeur est faible; les ventricules de rat et de souris renferment essentiellement des chaînes α alors que les ventricules humains comprennent 95% à 100% de chaînes β (136). L'expression des chaînes α et β est susceptible d'être modulée et régulée en fonction de l'âge (19), de l'emplacement dans le myocarde, de l'activité hormonale (40, 94), et dans les cas de surcharge hémodynamique cardiaque (76, 156). En cas d'hypertrophie du myocarde, due à une surcharge mécanique, le nombre de chaînes α diminue au profit des chaînes β . Or ces chaînes β sont douées d'une activité ATPasique environ trois fois plus faible que celle des chaînes α . Il en résulte une contraction moins rapide, s'accompagnant d'une moindre consommation d'énergie par les cellules endommagées.

On observe également des variations de la structure et de la distribution des chaînes légères de myosine selon la nature du muscle (contraction lente ou rapide) et selon l'espèce étudiée.

Ce polymorphisme de la myosine, au sein de chaque muscle, suggéré dès 1967 et faisant l'objet de nombreuses revues n'est physiologiquement pas encore élucidé; la plupart des études s'accordent cependant pour l'interpréter comme une adaptation aux besoins de la cellule musculaire pour la contraction.

2.4. Intérêt et moyens de détection en pathologie cardiaque.

2.4.1. Chaînes légères.

2.4.1.1. Concentrations et cinétique.

La concentration normale des chaînes légères dans le sérum est inférieure à 2 ng/ml (155). Des concentrations pathologiques sont observées dans les cas de nécrose myocardique avec une moyenne de 10.9 ± 1.3 ng/ml, pouvant s'échelonner de 4 à 35 ng/ml. Ces augmentations apparaissent à peu près 24 heures après le début des douleurs, les valeurs atteignent un maximum vers le quatrième jour puis diminuent régulièrement jusqu'au dixième jour. Cette persistance longue du taux de chaînes légères dans la circulation sanguine ne serait pas le fait d'une accumulation, puisque la demie-vie de ces chaînes est de 75 min, mais d'une libération continue au cours du temps (108). La cinétique de ce relargage est très souvent biphasique: dans un premier temps une libération massive des MLC, présentes dans les myocytes sous forme libre et soluble provoque la hausse transitoire de leur taux dans le sérum, puis une baisse est constatée, immédiatement suivie d'une augmentation prolongée, traduisant une dissociation des molécules de myosine insoluble par des enzymes protéolytiques et des variations de pH, avec libération de chaînes légères.

Il semblerait que les MLC de type II soient plus rapidement libérées que les MLC de type I, ce qui a incité à séparer les deux types de chaînes et à les doser séparément.

2.4.1.2. Méthodes de dosages.

2.4.1.2.1. Méthode radioimmunologique.

Elle met en compétition une concentration connue de l'antigène marqué à l'iode 125 et l'antigène froid à doser vis à vis d'un nombre limité de sites d'un antisérum (As) de lapin.

La littérature fait état de dosages spécifiques des MLC I (161), des MLC II (64, 108) ou du mélange des deux sortes de chaînes (72, 155).

Des tests sont réalisables en 1 heure 15 min (72). L'incubation de l'antigène (Ag) chaud et l'Ag froid se fait à 37°C, ce qui permet néanmoins de détecter de très faibles taux de chaînes légères (1 ng/ml).

Des pourcentages non négligeables de réactions croisées sont constatés avec les MLC des muscles squelettiques; les MLC cardiaques et squelettiques présentent en effet des homologies de structure au niveau des résidus NH₂ terminaux. L'utilisation de plusieurs Acm, dirigés contre des épitopes différents, a permis de diminuer ce pourcentage de réactions croisées sans toutefois l'éliminer (71); cela suggère que ces Acm sont dirigés contre des acides aminés constitutifs de l'épitope commun aux deux sortes de MLC.

2.4.1.2.2. Méthode de capture sur lame.

Des Ac spécifiques des chaînes légères, fixés sur une membrane par l'intermédiaire de particules de latex, retiennent les antigènes des sérums de malade. L'addition d'un second anticorps reconnaissant une autre partie de la molécule est suivie d'un rinçage puis un troisième anticorps couplé à un enzyme produit une teinte colorée lorsqu'il se complexe au sandwich préformé; l'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de MLC présente. Ce test commercialisé (HVMLC1 membrane Vio-Stat TM) fournit des résultats non quantitatifs en dix minutes.

2.4.2. Chaînes lourdes.

2.4.2.1. Concentrations et cinétique.

Les concentrations moyennes de MHC circulante chez des sujets normaux sont de 53±23 ng/ml (89).

Les taux de MHC relarguée lors d'une nécrose myocardique peuvent atteindre jusqu'à 2000 ng/ml. Plus grosses et plus volumineuses que les MLC, les chaînes lourdes sont détectées légèrement plus tard, entre 36 h et 48 h suivant l'infarctus, atteignent un taux sérique maximum vers le sixième jour puis chutent régulièrement pour revenir à des valeurs normales 12 jours après la constitution de la nécrose.

Les infarctus compliqués peuvent donner lieu à des cinétiques particulières, des taux élevés se maintenant bien au delà de 12 jours.

2.4.2.2. Méthode de dosage.

La littérature décrit des méthodes radioimmunologiques par compétition (85, 88, 89, 142). Toutes utilisent des Acm dirigés contre les fragments S₂ des chaînes β de la myosine ventriculaire ou atriale, mais reconnaissent également les S₂ des chaînes β des muscles squelettiques de type lent (88). Ce fragment résistant à l'action des enzymes protéolytiques, il est retrouvé dans la circulation.

Le dosage peut être effectué en 3 heures, détectant 10 ng/ml de fragments de myosine.

Un coffret de dosage est disponible (Myosine Irma Pasteur, réf. 79860, Eria Diagnostics Pasteur); l'un des Acm, couplé à du Magnogel, est incubé en présence de sérum pathologique et d'une concentration déterminée d'un second Acm marqué, de spécificité complémentaire; après une période d'incubation le Magnogel est retenu par aimantation, rincé après élimination du surnageant non fixé. La radioactivité est ensuite mesurée.

2.5. Conclusion.

La myosine constitue un marqueur de l'infarctus plus tardif que la myoglobine. Le dosage répété de la myosine permet donc de suivre les suites de l'infarctus sur une durée plus longue. Mais la libération de myosine dans la circulation reflète davantage une perte de l'intégrité de la membrane cellulaire. Cette grosse molécule profondément ancrée dans la cellule, est relâchée uniquement lorsque la membrane a complètement perdu son intégrité, sa présence traduit l'existence de lésions irréversibles (141); ceci expliquerait le retard de relâchement par rapport à la myoglobine; cette dernière, localisée à proximité de la membrane cellulaire afin de faciliter le transport d'oxygène est expulsée des cellules lorsque la membrane devient anormalement perméable, ce qui est le cas lors d'une ischémie, état réversible (118).

3. Conclusion générale.

Notre travail a pour objectif principal la mise au point de dosages immunonéphélométriques de la myoglobine et de la myosine sériques, adaptés à des tests permettant d'obtenir des résultats provisoires qui peuvent être d'une extrême utilité en cas d'urgence.

Le facteur temps est primordial, aussi tenterons nous de le réduire au maximum, tout en conservant la sensibilité des résultats.

CHAPITRE II: Néphélémétrie.

1. La néphélémétrie.

1.1. Définition.

La néphélémétrie est une méthode physique de mesure de l'intensité lumineuse dispersée par des particules en suspension dans un liquide traversé par un rayonnement incident.

Le principe de cette technique d'analyse est celui de la diffusion de la lumière, phénomène global impliquant un grand nombre d'éléments dont:

- Le faisceau de lumière incidente, défini par sa longueur d'onde et son intensité.
- Le centre diffuseur, contenu dans un milieu liquide, est composé de particules en suspension, caractérisées par leur indice de réfraction, leur taille, leur forme, et leur concentration.
- L'angle d'observation de la lumière diffusée.

L'interaction entre le nuage électronique des particules diffusantes et le flux de photons incident provoque une déviation de la trajectoire de ce dernier, s'accompagnant d'une modification de son intensité, mais sans changement de sa longueur d'onde.

La diffusion qui en résulte a lieu dans toutes les directions de l'espace. Selon l'angle d'observation θ de la lumière diffusée, deux techniques se distinguent:

- La turbidimétrie mesure l'intensité de la lumière transmise dans le prolongement du rayonnement incident ($\theta = 0$), qui correspond donc à la somme de la lumière résiduelle non absorbée et non dispersée et de la lumière diffusée selon l'angle de 0.
- La néphélémétrie analyse la lumière dispersée selon un angle θ différent de 0, en éliminant la lumière transmise.

1.2. Théories fondamentales de la diffusion de la lumière.

Deux modèles mathématiques ont été proposés, définissant la relation entre l'intensité de la lumière incidente et l'intensité de la lumière diffusée, qui dépend de la dimension des particules par rapport à la longueur d'onde de la lumière qui les éclaire (86).

1.2.1. Théorie de Rayleigh.

Lord Rayleigh a introduit en 1878 une expression mathématique (124) décrivant le phénomène de la diffusion de la lumière, dans le cas de particules sphériques, en suspension très diluée, dont le diamètre est très inférieur à la longueur d'onde du rayon incident et éclairées par une lumière non polarisée.

L'intensité lumineuse dispersée s'écrit:

$$I(\theta) = \frac{9\Pi^2NV^2}{2\lambda^4} \left[\frac{n^2-1}{n^2+2} \right]^2 (1+\cos^2\theta)E$$

$I(\theta)$: intensité lumineuse dispersée selon un angle θ .

N : nombre de particules dispersantes.

V : volume d'une particule.

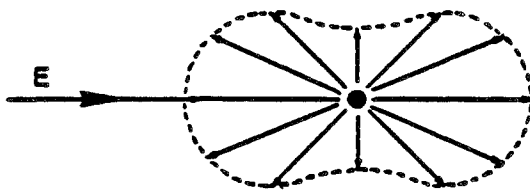
λ : longueur d'onde du faisceau incident.

θ : angle d'observation par rapport à l'axe de propagation du faisceau incident.

E : éclairement incident.

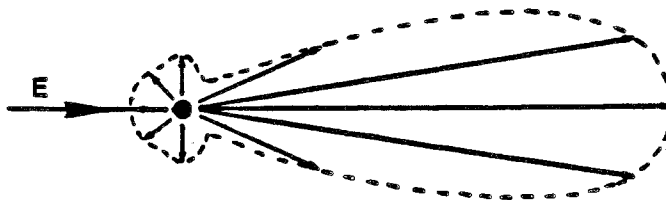
n : indice de réfraction.

d'où l'énoncé de la loi de Rayleigh: l'intensité diffusée par un milieu trouble est inversement proportionnelle à la puissance quatrième de la longueur d'onde de la lumière incidente. Cette intensité est directement proportionnelle au nombre de particules et au carré de leur volume. Elle dépend également des facteurs précités liés au centre diffuseur (rayon, N , n) et à l'angle d'observation θ . Dans ce type de diffusion, l'enveloppe spatiale des vecteurs de lumière dispersée est symétrique autour du centre dispersant:



1.2.2. Théorie de Mie.

Lorsque le diamètre moyen des particules augmente, la part prise par la réflexion de la lumière incidente devient de plus en plus importante dans le phénomène de diffusion. La relation de Rayleigh n'est alors plus applicable. En 1908, G. Mie élaborait une équation plus complexe (101), dont la résolution permet de calculer les diagrammes de diffusion pour des particules de différentes tailles et de différents indices de réfraction. On constate une asymétrie de l'enveloppe des vecteurs d'intensité lumineuse, qui se déforme préférentiellement vers l'avant lorsque la taille des particules augmente:



2. L'immunonéphélémétrie classique.

L'immunonéphélémétrie mesure la lumière dispersée par le trouble résultant d'une réaction de précipitation spécifique en milieu liquide entre un antigène et les anticorps correspondants (54). Cette technique analytique repose donc sur deux principes:

- La réaction entre l'Ag et l'Ac correspondant.
- La quantification de la diffusion de la lumière par les complexes immuns formés.

Lorsque les Ag ou les Ac sont en solution dans le milieu liquide, cette technique est dite classique par opposition à l'immunonéphélémétrie particulaire pour laquelle les Ag ou les Ac sont fixés à des microsupports.

2.1. Principe de la réaction de précipitation Ag/Ac.

Découverte dès 1897, cette réaction connut son véritable essor comme base de l'immunochimie quantitative à partir de 1928, grâce à Heidelberger et Kendall (61, 62). Ces derniers ont démontré qu'en milieu liquide, l'union d'un antigène avec l'anticorps correspondant, tous deux sous forme soluble, peut former dans certaines conditions un complexe Ag/Ac insoluble.

Une courbe reproductible d'immunoprécipitation peut être obtenue pour une concentration constante en anticorps et des concentrations variables en antigène (figure 2). Cette courbe présente trois zones selon les concentrations d'antigène:

- Une zone d'excès d'anticorps, située dans la partie ascendante: l'addition d'Ag, tout en maintenant fixe la concentration d'Ac, augmente la masse du précipité.
- Une zone d'équivalence, atteinte au sommet de la courbe: tous les sites Ac et Ag sont occupés, le réseau Ag/Ac insoluble formé atteint sa taille maximale.
- Une zone d'excès d'Ag, située dans la partie descendante: la quantité de précipité chute, les complexes immuns restent sous forme soluble ou se redissolvent.

2.2. Application à l'immunonéphélémétrie classique.

Une courbe d'immunonéphélémétrie s'apparente au tracé de la courbe de précipitation classique Ag/Ac; en effet, cette courbe traduit la quantité de précipité en fonction de la concentration en Ag. Or le signal donné par le néphélémètre dépend directement du nombre et de la taille des agrégats.

L'immunonéphélémétrie classique permet, par la quantification des complexes immuns précipités en phase liquide, de doser les Ag en excès d'Ac ou de titrer les Ac correspondants.

Les premiers néphélémètres, munis de lampe à vapeur de mercure, étaient conçus initialement pour une lecture à 90° par rapport au faisceau incident. Ils sont, depuis 1975, pour la plupart équipés d'un tube laser Hélium / Néon comme source de lumière (143), ce qui permet d'apporter d'importantes améliorations de sensibilité, de linéarité et de reproductibilité.

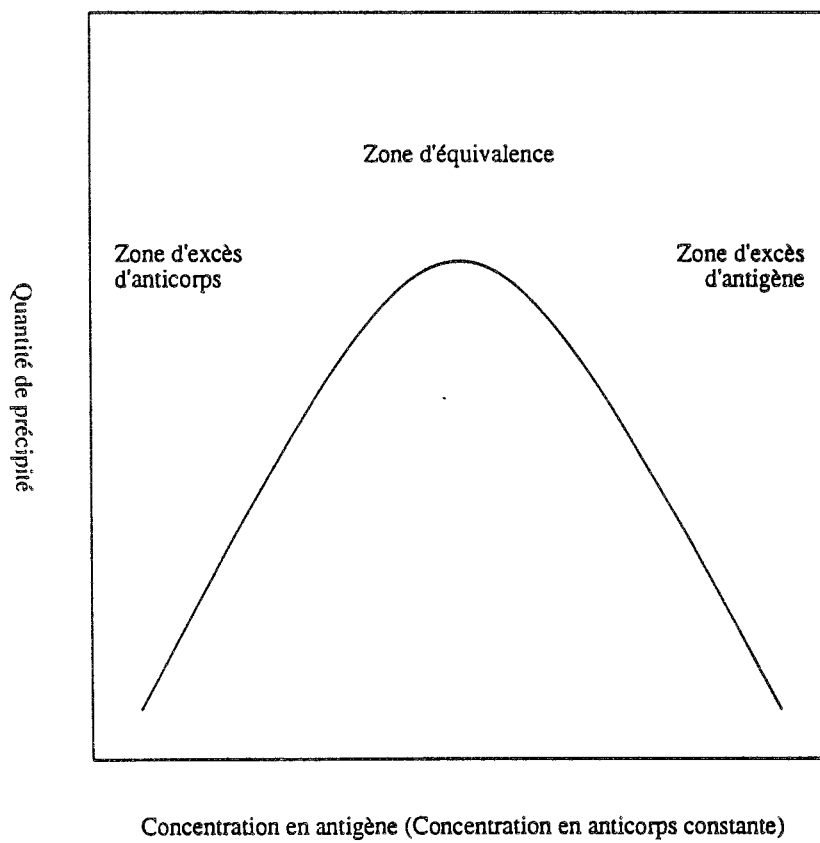
Depuis plusieurs années, cette technique permet le dosage des protéines spécifiques dans différents liquides biologiques tels que: sérum et plasma, liquide céphalorachidien, urine, liquide de lavage bronchoalvéolaire, larmes, lait maternel, liquide synovial, surnageants de cultures cellulaires (25).

Ses résultats sont corrélés de façon satisfaisante avec ceux de l'immunodiffusion radiale.

L'immunonéphélémétrie classique est une méthode d'analyse rapide, simple et facilement automatisable. Elle présente cependant quelques inconvénients importants:

- Le seuil de détection médiocre de l'ordre du $\mu\text{g/ml}$ exclut le dosage de protéines présentes faiblement concentrées (myoglobine, α_1 foetoprotéine ...).
- Les haptènes, petites molécules, ne peuvent être dosés car ils n'engendrent pas la formation d'un réseau en présence de l'Ac correspondant.

Figure 2 Courbe de précipitation antigène-anticorps en milieu liquide



- Un excès d'Ag peut provoquer une redissolution des complexes, conduisant à sous-estimer la quantité d'Ag réellement présente, par diminution du signal néphélométrique. Le recours à des dilutions plus grandes de l'échantillon à analyser permet d'éviter ces erreurs de dosage.
- Les antisérums utilisés doivent être d'une forte avidité afin de détecter des concentrations protéiques très basses; des concentrations élevées sont systématiquement employées dans le but de minimiser les risques de sous-estimation des résultats en excès d'Ag.
- Le dosage de molécules contenues dans un milieu concentré trouble tel que le sérum ou le lait ne peut être réalisé sans clarification préalable du fait de la présence d'interférences.

Pour tenter de remédier à ces problèmes d'adaptabilité et de sensibilité de cette méthode d'analyse, une nouvelle immunonéphélométrie, utilisant des supports particuliers a été développée.

3. L'immunonéphélométrie à supports microparticulaires.

3.1. Principe.

Les techniques immunonéphélométriques classiques ne présentent pas une sensibilité suffisante pour certaines applications car la méthode ne détecte pas les complexes immuns dès leur formation, leur taille n'étant pas suffisante pour que la lumière dispersée résultante soit décelée au néphélomètre. L'idée fut donc d'augmenter la taille des complexes immuns par la fixation de l'un des partenaires de la réaction Ag/Ac sur une particule capable de disperser la lumière, afin de visualiser au néphélomètre les complexes immuns dès le début de leur formation.

De l'équation de Rayleigh, il ressort en effet que la lumière diffusée dépend d'une part de paramètres liés à la construction de l'appareil et d'autre part de paramètres liés aux centres dispersants (nombre et taille). L'agglutination de ces particules recouvertes d'Ag ou d'Ac lors de la réaction Ag/Ac entraîne une diminution du nombre des centres diffusants mais une augmentation de leur taille, provoquant rapidement une hausse de l'intensité lumineuse diffusée.

L'équipe du Laboratoire d'Immunologie travailla donc à la mise au point de supports particuliers microsphériques (MS), à la fois capables de fixer l'Ag ou l'Ac et de diffuser la lumière par eux-mêmes, permettant d'amplifier artificiellement le signal néphélométrique dès la constitution des agglutinats; ces supports rendent accessibles la zone des faibles concentrations en Ag (sensibilité de l'ordre du ng/ml).

Une première variété de supports fut utilisée dans des immunodosages dès 1976. Il s'agissait de MS de polystyrène couplées à des Ac (57) ou à des Ag (159). Mais l'hydrophobicité de ces MS entraîne des phénomènes d'agglutination spontanée des MS entre elles et des adsorptions non spécifiques des protéines sériques.

La même année, des MS hydrophiles polyacryliques sont synthétisées par l'équipe de Rembaum, et utilisées comme marqueurs cellulaires en microscopie électronique à balayage.

A partir de 1978, l'équipe du Professeur Duheille a commencé la mise au point de supports polyacryliques adaptés à la néphélométrie (102, 103, 104), en se basant sur les travaux de Rembaum (127). Ces MS sont caractérisées par une grande hydrophilie, apportée par des fonctions hydroxyles et carboxyles, leur conférant une stabilité importante en solution aqueuse et réduisant les adsorptions non spécifiques. Elles possèdent en outre des fonctions aldéhydes auxquelles les protéines se fixeront par l'intermédiaire de leur fonction amine.

La préparation et l'utilisation de ces microsphères ont fait l'objet d'un brevet (36).

3.2. Synthèse des supports.

Les conditions détaillées de l'obtention des supports sont décrites dans la Thèse de D. Riochet (128).

3.2.1. Principe.

Les MS sont obtenues par copolymérisation de monomères acryliques en solution, sous rayonnement gamma (source Co⁶⁰) au Centre d'Etudes Nucléaires de Grenoble, en présence d'un agent tensioactif.

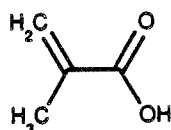
La réaction de polymérisation débute par la formation d'oligomères, qui grossissent progressivement, deviennent de moins en moins solubles et s'entourent de tensioactif. Ces oligomères coalescent, donnant naissance à des particules plus grosses.

Les conditions opératoires doivent être parfaitement contrôlées afin d'aboutir à des microsphères de taille et de stabilité prédéfinies; certains facteurs (tels que la nature des monomères employés, la solubilité et la concentration des monomères, la concentration de tensioactif, l'absence d'agent oxydant) influencent les propriétés physico-chimiques des MS synthétisées.

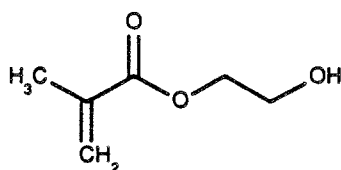
3.2.2. Réactifs utilisés.

Tous les monomères comportent au moins une double liaison nécessaire pour la polymérisation; leur structure chimique détermine les groupements fonctionnels des MS souhaitées.

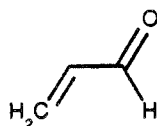
- Acide méthacrylique: apporte des fonctions carboxyliques, conférant aux MS leur stabilité.



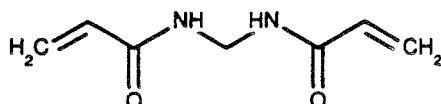
- 2-hydroxyéthyl méthacrylate: apporte des fonctions hydroxyles, conférant aux MS leur hydrophilie.



- Acroléine: apporte des fonctions aldéhydes nécessaires au couplage des protéines par leurs fonctions amines primaires.



- N,N'-méthylène bisacrylamide: apporte deux doubles liaisons permettant la réticulation du système.



- Dodécylsulfate de sodium (SDS): ce tensioactif permet, de par sa concentration, de contrôler la taille des MS; il diminue la probabilité d'association des monomères entre eux, donc tend à les disperser et à former des MS de faible taille.



Tous les monomères commerciaux sont fraîchement distillés afin d'éliminer tant l'hydroquinone qui permet leur stabilisation, que d'éventuels homopolymères préformés.

3.2.3. Protocole expérimental.

Les monomères, qui sont mélangés sous des proportions relatives définies, ainsi que le tensioactif ajouté à une certaine concentration, sont introduits dans des ampoules de verre borosilicaté et scellées sous vide pour éviter tout risque d'oxydation durant le transport vers le centre d'irradiation de Grenoble.

Les échantillons, placés sur un portoir rotatif sont agités à température ambiante pendant la polymérisation afin d'homogénéiser les doses d'irradiation.

Les paramètres de la polymérisation (flux et durée de rayonnement, distance du portoir à la source) ont été mis au point sur des volumes faibles, puis des préparations plus importantes, de l'ordre du litre, ont été synthétisées.

Les polymères formés, d'aspect blanc laiteux, sont rapidement additionnés d'un volume égal d'une solution d'hydroquinone dégazée et saturée d'argon afin de bloquer la polymérisation (élimination des radicaux encore présents) et de prévenir l'oxydation des groupements aldéhydes.

Les préparations ainsi synthétisées se conservent à 4°C pendant plusieurs années.

3.2.4. Caractérisation des lots de microsphères.

Les MS sont définies par la concentration de leurs suspensions et par leurs diamètres.

La concentration est déterminée par la mesure du poids sec des échantillons.

Le diamètre moyen est mesuré par microscopie électronique à transmission après séchage des MS ou à l'aide d'un granulomètre au Laboratoire de l'ENSIC de Nancy. Cette dernière technique présente l'avantage de détecter les MS préagglutinées en suspension.

Ces deux caractéristiques de concentration et de diamètre des MS sont primordiales car elles dictent d'une part les concentrations de ligand à mettre en oeuvre lors des couplages, d'autre part la sensibilité des dosages.

L'intérêt original de ce protocole de fabrication de supports se situe au niveau de la variété de MS disponibles, différant par leurs tailles, leurs charges, leurs groupes fonctionnels accessibles; selon les conditions d'irradiation et surtout les concentrations relatives des monomères, les MS synthétisées posséderont des propriétés physico-chimiques qui leurs seront propres.

3.3. Sensibilisation des supports.

Des Ag ou des Ac peuvent être couplés aux microsphères. Le couplage établit une liaison covalente stable entre les MS et les molécules d'Ag ou d'Ac.

Les modalités de couplage sont relativement simples dans le cas des Ag, plus complexes en ce qui concerne les Ac.

La fixation des protéines sur les microsupports doit être telle que la réaction immunologique, faisant intervenir la formation de liaisons Ag/Ac, puisse avoir lieu. En effet, la présence de la phase solide est susceptible de modifier l'équilibre thermodynamique de la réaction Ag/Ac. Cet aspect biophysique des interactions Ag/Ac et l'étude des liaisons impliquées a fait l'objet d'une récente étude au Laboratoire (105).

3.3.1. Couplage d'Ag.

3.3.1.1. Principe.

Les fonctions aldéhydes des MS apportées par l'acroléine réagissent avec les fonctions amines primaires des molécules biologiques à coupler, formant des liaisons imines, éliminant ainsi les risques éventuels de désorption.



Les caractéristiques de charge et d'hydrophilie des MS sont conservées puisque les fonctions carboxyliques et hydroxyles ne sont pas touchées.

3.3.1.2. Protocole général de couplage.

La sensibilisation des MS met en jeu certaines caractéristiques des molécules biologiques à coupler (taille, masse moléculaire, structure chimique). Par ailleurs, le milieu réactionnel doit être choisi de telle sorte que la solubilité et la stabilité du système soient maximales. Ainsi il n'existe pas de protocole universel, car selon les propriétés physico-chimiques des molécules à coupler et le type de MS mis en oeuvre, les conditions de couplage

seront susceptibles d'être modifiées. Néanmoins les grandes étapes de la sensibilisation des MS sont généralement communes à toutes les protéines.

3.3.1.2.1. Dialyse des MS natives.

Toute suspension de MS est soumise à plusieurs dialyses dans le but d'éliminer l'hydroquinone, ajouté en fin de polymérisation comme agent antioxydant, le SDS et les éventuels monomères restants.

Un volume V de MS est introduit dans un sac de dialyse, après addition préalable d'un volume V/10 du tampon qui sera utilisé au couplage, destiné à tamponner le milieu pour éviter une variation brusque et incontrôlée de la force ionique qui pourrait entraîner une agglutination des MS par perte de leur stabilité. La dialyse est effectuée à 4°C contre le tampon de couplage dégazé et saturé d'argon pour écarter tout risque d'oxydation des fonctions aldéhydes des MS. En général, le tampon de dialyse, dont le volume est environ cent fois supérieur à celui des MS, est remplacé deux fois au cours de l'opération.

3.3.1.2.2. Sensibilisation des MS.

La molécule à coupler est incubée directement en présence des MS dialysées. Les concentrations en Ag et en MS à mettre en oeuvre ont fait l'objet d'études détaillées (8), d'où il ressort que les conditions optimales de couplage ont lieu en général lorsque $2 \cdot 10^{-8}$ moles de ligand sont apportées pour 10 mg de MS, sous un volume final de 1 ml.

Cependant, ces proportions peuvent subir quelques variations selon le diamètre des MS et la taille des molécules à coupler.

Cette étape est menée en général sans agitation, pendant 18 heures à 4°C.

3.3.1.2.3. Saturation des fonctions aldéhydes.

Certaines fonctions aldéhydes des MS se retrouvent intactes après couplage, soit par défaut de fonctions amines disponibles, soit pour des raisons d'encombrement stérique. Elles sont bloquées par l'apport de fonctions amines primaires; ainsi la fixation éventuelle d'autres composés aminés sur les MS sera évitée.

La saturation est assurée par une solution d'éthanolamine en excès, tamponnée au pH de couplage, ou par le glycolle, pendant 2 heures à température ambiante et sans agitation. L'éthanolamine, en se fixant par sa fonction NH_2 laisse libre une fonction OH, permettant d'accroître l'hydrophilie des particules. Le glycolle apporte des fonctions CO_2H à la surface des MS.

3.3.1.2.4. Elimination des ligands non couplés.

Les molécules non couplées ainsi que l'éthanolamine en excès doivent nécessairement être éliminées, afin de ne pas interférer lors des dosages ultérieurs.

Une ultracentrifugation des MS déposées sur gradient discontinu de saccharose 20%-80% (poids / volume) permet de recueillir à l'interface des deux solutions les MS sensibilisées. Les conditions de la centrifugation (temps et vitesse) sont déterminées en fonction du diamètre des MS.

Lorsque la molécule à coupler possède une masse moléculaire inférieure à 5000 Da, la purification est obtenue par plusieurs dialyses répétées des MS.

Les différentes étapes du couplage sont suivies au néphélémètre afin de contrôler la stabilité des MS. Le signal des MS natives dialysées constitue la référence; lorsque le rapport signal engendré par les MS au cours du couplage / signal de référence reste inférieur à 1.2, la stabilité est estimée satisfaisante. Au delà de 1.2 les MS sont agglutinées, ce qui implique une rectification du protocole au niveau de l'étape concernée.

3.3.2. Couplage d'Ac.

3.3.2.1. Principe.

La mise au point du couplage d'Ac sur les MS a soulevé de nombreux problèmes: les Ac doivent être couplés de telle sorte que leur fragment Fab soit accessible à l'antigène afin que leur activité immunologique soit conservée. De plus, les produits obtenus doivent former des suspensions stables.

L'utilisation de glutaraldéhyde ou de carbodiimide entre les MS et l'Ac, se fixant de façon non contrôlée sur les Ac, aboutit à une chute importante de l'activité immunologique.

L'équipe de Quash (123) a mis au point un couplage de molécules d'IgG sur des sphères de latex carboxylées par l'intermédiaire de bras aliphatiques préalablement substitués; l'activité Ac est préservée, les Fab présentent une configuration spatiale favorable à la formation ultérieure de réseaux Ag/Ac.

D. Riochet s'est inspiré de ces résultats pour élaborer un protocole de couplage des MS-Ac par l'intermédiaire d'un "bras espaceur" entre les MS et les Ac.

La molécule retenue comme espaceur est le dextran, polysaccharide constitué d'unités α -D glucose liées essentiellement par des liaisons α -1.6; ce composé présente une grande hydrophilie, sa masse moléculaire importante (500000 Da) permet de diminuer les éventuelles interactions entre les MS et les Ac, ce qui contribue à la stabilité du système; de plus l'accessibilité pour l'Ag est accrue.

Les étapes fondamentales sont décrites, susceptibles d'être modifiées selon les propriétés intrinsèques des Ac à coupler.

3.3.2.2. Protocole général de couplage.

Le couplage comporte trois grandes étapes, elles-mêmes divisées en plusieurs phases. Seul le principe général des réactions impliquées est décrit, illustré sur la figure 3; le protocole technique sera détaillé dans la deuxième partie.

3.3.2.2.1. Préparation du dextran amino.

Oxydation du dextran: certaines fonctions alcools du dextran sont oxydées en aldéhydes en se basant sur la réaction de Malaprade (99); la liaison entre deux carbones adjacents portant chacun une fonction hydroxyle (α glycol) peut être clivée par traitement au periodate de sodium. Les unités de glucose constitutives du dextran renferment un double α glycol.

Couplage d'une diamine: le 1.7-diamino heptane se lie aux fonctions aldéhydes formées par l'intermédiaire d'une de ses fonctions amines, formant une liaison imine. Ce composé est introduit en excès par rapport aux fonctions aldéhydes formées dans le but de préserver intactes des fonctions amines primaires libres.

Réduction des liaisons imines par le borohydrure de sodium.

DEXTRAN T500

DEXTRAN DIAMINO

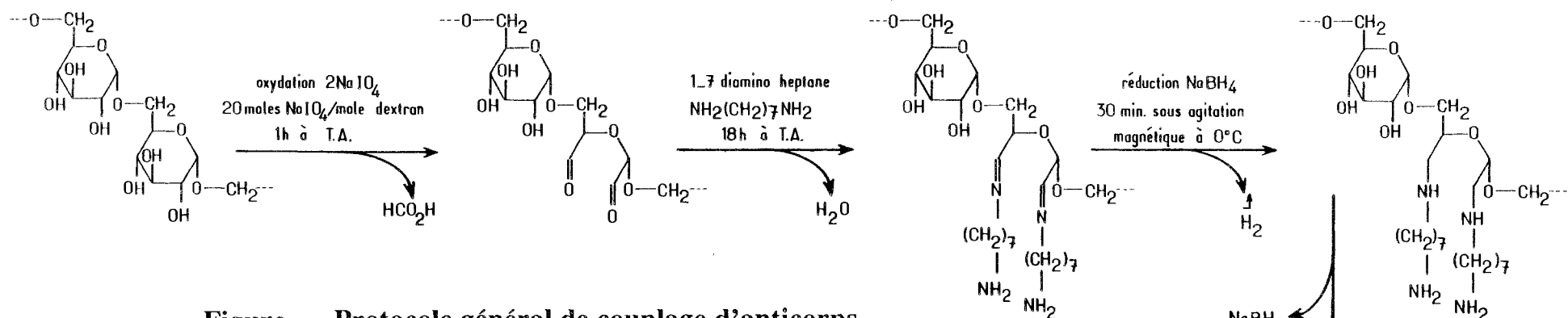
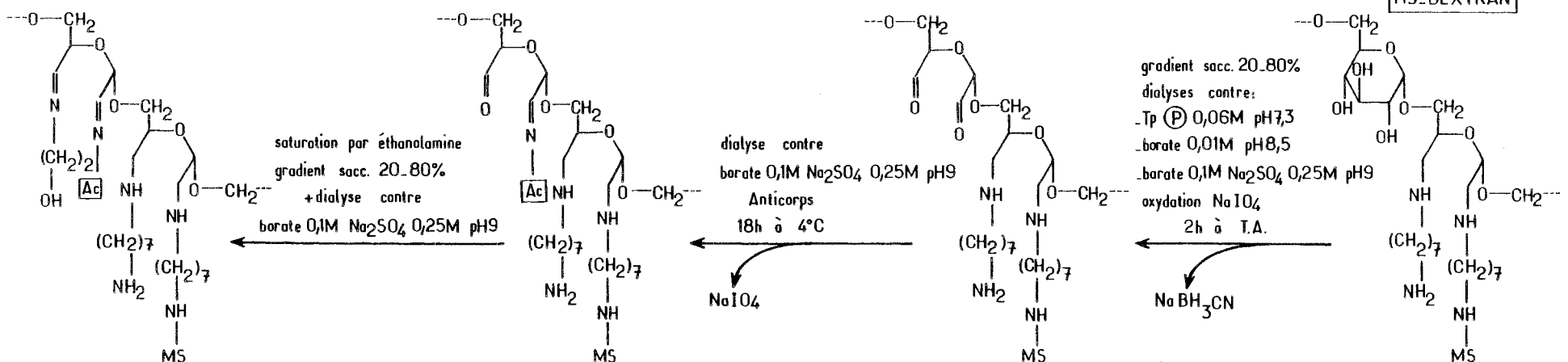


Figure 3 Protocole général de couplage d'anticorps

MS-DEXTRAN-Ac

MS-DEXTRAN-Ac



Cette préparation de dextran polyamino est dialysée contre le tampon de réaction de l'étape suivante afin d'éliminer les sous-produits des réactions (borohydrure en excès, acide formique). Elle peut ensuite être stockée plusieurs mois à -20°C.

3.3.2.2.2. Couplage du dextran amino sur les MS.

Addition des MS préalablement dialysées contre un tampon adéquat dégazé et saturé d'argon. La fixation des MS fait intervenir leurs fonctions aldéhydes, réagissant de façon covalente avec les fonctions amines primaires libres greffées sur le dextran.

Réduction des liaisons imines par le cyanoborohydrure de sodium; cette étape permet d'écarter le risque de déstabilisation du réactif obtenu.

Purification du produit MS-dextran par ultracentrifugation sur gradient de saccharose 20%-80%. Les MS-dextran subissent ensuite plusieurs dialyses pour les placer dans les conditions de force ionique et de pH favorables au couplage ultérieur d'Ac. Ces MS-dextran peuvent être conservées à 4°C. Leur stabilité au cours du temps est mesurée au néphélomètre en considérant le signal donné au premier jour de fabrication comme signal de référence.

3.3.2.2.3. Couplage de l'Ac.

Oxydation des MS-dextran: de nouvelles fonctions aldéhydes sont créées, sur des cycles de glucose possédant encore des fonctions α glycol libres. Une dialyse est indispensable afin d'éliminer l'excès de NaIO_4 n'ayant pas réagi.

Couplage de l'Ac: il met en jeu les fonctions aldéhydes créées et les fonctions amines primaires libres des Ac: ces dernières peuvent provenir soit de l'extrémité NH_2 terminale, soit des résidus d'acides aminés basiques tels que la lysine. Aucun contrôle d'orientation n'est effectué, mais les conditions de pH de travail favorisent l'intervention des ϵNH_2 des chaînes latérales dans la fixation.

Saturation des fonctions aldéhydes libres.

Purification des MS-dextran-Ac par centrifugation sur gradient de saccharose 20%-80%.

Les différentes phases de ce couplage sont contrôlées au néphélomètre.

3.4. Modèles réactionnels utilisés.

L'utilisation de supports microparticulaires en immunonéphélométrie repose sur plusieurs types de réactions; de multiples systèmes plus ou moins complexes ont été étudiés (39).

Dans ce travail, deux techniques permettant le dosage d'Ag (myoglobine et myosine) ont été utilisées:

- Une méthode d'inhibition de l'agglutination, mettant en oeuvre des MS recouvertes d'Ag.
- Une méthode d'immunocapture (sandwich) amplifiée, faisant intervenir des MS-Acm.

3.4.1. Réaction d'inhibition de l'agglutination.

La réaction d'agglutination a lieu entre les MS couplées à des antigènes et les Ac correspondants; le signal mesuré au néphélémètre augmente avec la concentration des Ac présents.

Le dosage de ces Ag met en présence les MS-Ag, les Ac spécifiques et l'Ag libre; ce dernier, en consommant des Ac, va en inhiber la fixation aux MS-Ag. La quantité d'agglutinats chute donc et ce d'autant plus que la concentration en Ag présent est importante; cela se traduit par une baisse du signal néphélémétrique.

Les concentrations en Ag sont déterminées en référence à une courbe d'étalonnage.

Ce modèle réactionnel de dosage présente quelques avantages intéressants lorsque les Ag purifiés à coupler ne sont pas trop coûteux:

- Le seuil de détection est inférieur à celui de la réaction directe.
- Le risque de sous-estimation des résultats en présence d'excès d'Ag est exclu.
- Le dosage des petites molécules telles que les haptènes est possible.
- L'Ag à doser ne participe pas à la formation du signal néphélémétrique, il ne fait que consommer une partie des Ac présents. Si le système d'agglutination constitué par les MS-Ag et les Ac correspondants est convenablement choisi, l'inhibition de cette agglutination par l'Ag libre sera parfaitement maîtrisée.

3.4.2. Réaction d'immunocapture amplifiée.

Le schéma de cette réaction est le suivant:

MS-Acm / Ag à doser / Antisérums 1 Anti-Ag / Antisérums 2 anti-As 1

L'antigène libre à doser se lie dans un premier temps aux MS-Ac, conduisant en quelque sorte à la formation de MS-Ag, agglutinées par un antisérum 1 spécifique de l'Ag. L'addition d'un second antisérum anti-immunoglobulines de l'espèce 1 provoque une précipitation en milieu liquide, entraînant ainsi le sandwich MS-Ac / Ag / Antisérums 1. Pour des dilutions d'antisérums préalablement établies et fixes, le signal néphélémétrique qui en résulte sera d'autant plus important que la concentration en Ag est forte.

L'intérêt de ce système réside dans le fait que les partenaires engagés dans la réaction de précipitation ne se trouvent pas liés aux MS; en effet ces dernières interviennent uniquement en tant que révélateur de la réaction immunologique spécifique, permettant d'engendrer un signal néphélémétrique.

4. Appareillage.

Un néphélémètre est conçu pour quantifier la dispersion de la lumière par une suspension de particules éclairée par un faisceau de lumière incident. Il est principalement composé des éléments suivants:

- La source lumineuse, généralement constituée d'un tube laser Hélium / Néon de longueur d'onde 632.8 nm. Les sources laser, utilisées depuis 1975 en néphélémétrie (143) présentent des avantages importants: la lumière émise se caractérise par une forte intensité, un parfait monochromatisme et un haut degré de collimation: le rayonnement, émis sous forme d'un très fin pinceau peut être projeté sur de grandes distances sans divergence.

- La cellule de mesure, contenant le milieu réactionnel; selon les appareils, elles sont en polyacrylate ou en polystyrène, de forme cylindrique ou parallélépipédique. La diffusion propre des cellules (blanc cuve) doit être minimale; l'emploi de cuves à usage unique, éliminant le risque d'éventuelles contaminations est préférable. L'addition d'un agent mouillant dans le milieu réactionnel est conseillée pour éviter l'adsorption de molécules sur les parois des cuves et la formation de bulles.
- Le système de détection de l'intensité lumineuse dispersée; ce dispositif convertit l'énergie lumineuse en énergie électrique, amplifiable et mesurable par l'association d'une unité de traitement du signal. Sa position par rapport au faisceau incident forme un certain angle, paramètre primordial dans la conception de l'appareil car il contribue à ses performances de sensibilité.

Les appareils industrialisés se distinguent des modèles de recherche; actuellement plusieurs firmes (Beckman, Behring, Hyland, Diagnostics Pasteur) commercialisent des néphélémètres différant principalement par leur angle d'observation; le néphélémètre Behring se caractérise par sa mesure à des angles faibles (entre 5° et 12°) alors que le néphélémètre Hyland est plus approprié aux dosages nécessitant un grand angle (31.8°).

P. Varcin, dans notre Laboratoire, a imaginé et construit un néphélémètre expérimental, particulièrement adapté aux besoins de l'immunonéphélémétrie à supports microparticulaires. L'un de ces modèles fut le point de départ de la création d'un prototype industriel, désormais commercialisé par Diagnostics Pasteur, et duquel émanent pratiquement tous les résultats néphélémétriques issus de ce travail.

Nous détaillerons, et ce de façon chronologique les caractéristiques et possibilités principales des différents appareils expérimentaux ayant conduit à l'élaboration du néphélémètre commercialisé. Le néphélémètre Behring, utilisé également dans ce travail, fera l'objet d'une description succincte.

4.1. Néphélémètres expérimentaux.

Deux néphélémètres expérimentaux, construits au Laboratoire par P. Varcin ont donné naissance à un prototype industriel (N601) de l'appareil N600 décrit ci-dessous, commercialisé depuis Janvier 1989.

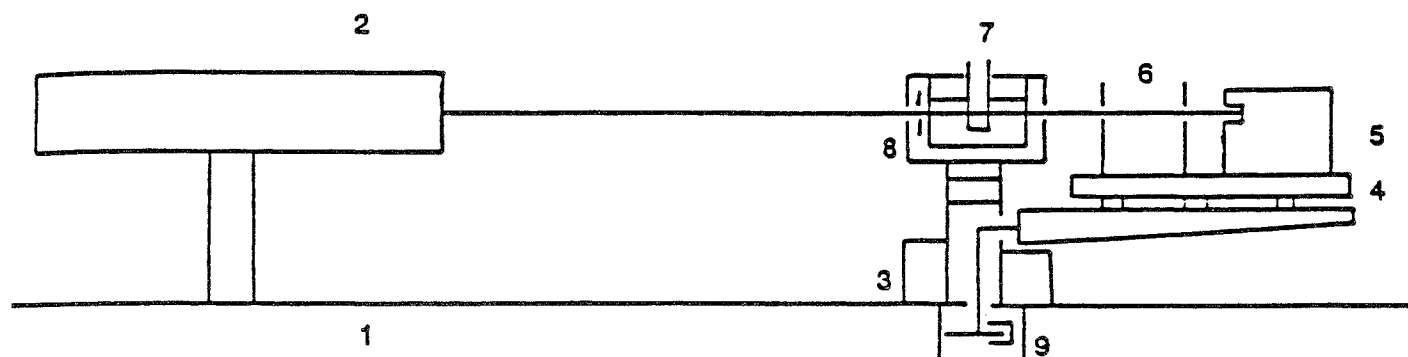
De nombreuses études expérimentales furent menées sur ces néphélémètres afin d'analyser les caractéristiques physiques du signal néphélémétrique; l'objectif consistait à optimiser les performances des systèmes de détection de la lumière lorsque les complexes immuns se forment à la surface des MS.

4.1.1. Le photogoniomètre.

Cet appareil (figure 4) utilise une source lumineuse laser Hélium / Néon. Le dispositif de détection comprend une photodiode munie d'un amplificateur. Il est monté sur un support tournant, permettant de mesurer l'intensité lumineuse dispersée pour des angles variables, s'étalant de 7 à 40°. L'acquisition et le traitement des données au cours des balayages sont assurés par un ordinateur Intertechnique, puis les signaux néphélémétriques moyennés sont enregistrés sur un micro-ordinateur Apple II.

Des nombreux travaux réalisés sur cet appareil ressortent les conclusions suivantes: les mesures optimales sont enregistrées pour un angle fixé à 10°. L'évolution de la taille des agglutinats sous de petits angles est détectée de façon plus sensible et plus longtemps; aux grands angles, les variations de l'intensité lumineuse tendent à s'affaiblir au cours du temps, ce qui se traduit par une chute de la sensibilité.

Figure 4 Schéma du photogoniomètre expérimental



- 1- Rail optique
- 2- Laser
- 3- Support tournant du bras du photogoniomètre
- 4- Bras du photogoniomètre - micro banc optique
- 5- Photodiode - amplificateur
- 6- Diaphragmes
- 7- Cuve de réaction
- 8- Cuve à immersion
- 9- Codeur optique

Cet appareil cumule les avantages des deux néphélémètres Behring et Hyland:

- L'angle faible de mesure, voisin de celui du néphélémètre Behring, permet d'abaisser le seuil de détection des dosages, contribuant à accroître la sensibilité.
- Le dispositif d'amplification et de traitement du signal, se rapprochant de celui du néphélémètre Hyland, autorise une dilution plus élevée des réactifs et permet d'amplifier la sensibilité des immunodosages.

Ce photogoniomètre a permis de mettre au point un système de détection particulièrement adapté à l'immunonéphélémie à supports microparticulaires. Les résultats prometteurs obtenus sont à l'origine de la construction d'un deuxième néphélémètre expérimental.

4.1.2. Prototype modèle Labo III.

Construit également par P. Varcin, ce néphélémètre comporte les mêmes éléments que le photogoniomètre:

- La source lumineuse est un tube laser Hélium / Néon.
- L'angle de mesure est fixé à 10°.
- Le dispositif de détection comprend d'une part une photodiode, transmettant le signal électrique à un voltmètre digital, d'autre part un amplificateur à 4 gammes de mesure; le facteur d'amplification est de 10 entre chaque gamme, chacune fournissant un signal de 0 à 12 volts.

Le traitement du signal est effectué par un micro-ordinateur Apple II; ce dernier écrête les signaux sur une durée de 10 secondes, enregistre automatiquement sur disque les données transcrites sur une imprimante.

Les résultats peuvent être exploités par des programmes de soustraction des blancs, d'établissement de courbes lissées d'agglutination ou d'inhibition et de calculs de concentrations des échantillons.

4.2. Prototype industriel N601.

La conception de ce prototype découle des études expérimentales menées sur les modèles précédemment décrits. Il reprend donc le schéma de base de ces néphélémètres.

L'appareil est doté d'un passeur automatique de portoirs pouvant contenir 10 cuves. Il est commandé par un micro-ordinateur Sanyo lui même relié à une imprimante.

Le traitement du signal diffère légèrement pour offrir au manipulateur la possibilité de sélectionner un temps de comptage ainsi qu'une fenêtre de mesure dans laquelle les signaux sont moyennés. D'autre part les programmes d'exploitation des résultats sont plus variés.

Cet appareil, adapté aux immunodosages à supports microparticulaires, a largement prouvé ses performances lors de dosages de molécules très variées dans des milieux biologiques aussi différents que le sérum (29, 32, 84, 106), le lait (28, 38), ou l'urine (39).

Les différents modèles réactionnels utilisés pour le dosage de la myoglobine et de la myosine ont entièrement été mis au point sur cet appareil; les résultats relatifs à l'étude des interférences en milieu sérique concentré proviennent en grande partie également de ce néphélémètre.

4.3. Néphélémètre commercial N600 de Diagnostics Pasteur.

Il reprend les caractéristiques physiques du prototype industriel. Les possibilités d'exploitation des résultats ainsi que les programmes de gestion de l'appareil sont adaptés aux besoins des laboratoires d'analyse.

Diagnostics Pasteur propose une gamme croissante de dosages immunonéphélométriques d'Ag ou d'Ac (dosages de la protéine réactive C, de l'anti-thrombine III, du facteur rhumatoïde), utilisant des MS-Ag ou des MS-Ac; ces MS se trouvent sous forme lyophilisée, et en raison de leur stabilité, elles peuvent être congelées après réhydratation.

4.4. Laser néphélémètre (LN) Behring.

L'énergie lumineuse dispersée par les complexes immuns est recueillie dans un espace de mesure compris entre 5° et 12° par rapport à la transmission rectiligne, puis est focalisée par des lentilles sur une photodiode au silicium; le signal qui en résulte est affiché sur un voltmètre digital dont l'échelle s'étale de 0 à 20 Volts.

Le LN Behring s'est progressivement automatisé, il est constitué d'un module de base (module I) constitué par le lecteur recueillant le signal, complété par un passeur d'échantillons (module II) et par un diluteur automatique des réactifs (module III).

Behring a mis en place de nombreux dosages de protéines plasmatiques par immunonéphélémie classique. Nous utiliserons certains d'entre eux dans la dernière partie de ce travail où sont étudiées les interférences en milieu sérique.

CHAPITRE III: Autres matériels et techniques utilisés.

1. Les Acm.

1.1. Principe d'obtention.

Dans l'organisme, la production d'Ac résulte de la prolifération et de la différenciation des lymphocytes stimulés par un antigène. Les anticorps synthétisés par une cellule B donnée ne sont dirigés que contre un seul déterminant antigénique (130). Le mécanisme de sélection clonale, proposé en 1959 par Burnet (21), suggère que les lymphocytes B préexistent comme un ensemble de clones différents, leur nombre étant équivalent au nombre d'épitopes présents à la surface des antigènes reconnus comme tels par l'organisme. L'Ag sélectionne les clones qui lui sont spécifiques par le biais de récepteurs de surface des lymphocytes, complémentaires de ses déterminants antigéniques.

Il existe généralement un plus ou moins grand nombre d'épitopes par molécule antigénique, susceptibles d'être reconnus par au moins autant de clones de lymphocytes B. Une réponse immunitaire est donc habituellement "polyclonale".

Cette théorie fondamentale est l'une des bases de l'immunologie moderne.

La production d'Acm dirigés contre un seul des épitopes de l'Ag supposerait l'isolement puis l'expansion en culture du clone lymphocytaire reconnaissant cet épitope. Mais les lymphocytes normaux n'ont qu'une courte durée de vie en culture et les quantités d'anticorps ainsi obtenues sont très faibles.

En revanche, il existe des lignées de cellules myélomateuses, dérivées de lymphocytes B néoplasiques à croissance rapide et indéfinie, synthétisant des immunoglobulines (Ig) de façon abondante et continue. L'intérêt des myélomes en tant que tels est cependant limité car peu d'Ag sont susceptibles d'être reconnus par les Ac produits (5). Par contre leur propriété d'immortalité fut exploitée à partir de 1975 par Köhler et Milstein (78) pour la production d'Acm. Ces deux chercheurs réussirent à faire fusionner des lymphocytes B normaux d'une souris immunisée contre un antigène et des cellules de myélome, à croissance illimitée. Parmi les cellules hybrides ou hybridomes ainsi obtenus, certaines cumulaient les deux propriétés de production d'Ac spécifiques et d'immortalité. Il restait à sélectionner les hybridomes producteurs de l'Acm souhaité, puis à les cloner de telle sorte que chaque puits de culture ne contienne qu'une cellule cultivable à l'infini et fabriquant uniquement l'Acm désiré.

En pratique, ce procédé fonctionne surtout chez la souris. Un groupe d'animaux est immunisé, dont on retiendra le meilleur répondeur pour, en fin d'immunisation, isoler les lymphocytes des ganglions lymphatiques ou plus souvent de la rate et réaliser la fusion avec les cellules myélomateuses.

1.2. Limites de l'utilisation des Acm.

Les Acm sont utilisés dans de nombreux domaines de la recherche fondamentale ou appliquée, notamment en biologie clinique (27). Leur importance croissante s'explique par leur reproductibilité d'obtention et leur "monospécificité", faculté de ne réagir qu'avec un seul épitope.

Mais cette étroite "monospécificité" peut, paradoxalement, être à l'origine de réactions croisées indésirables, les configurations antigéniques très restreintes reconnues par l'Acm

risquant d'appartenir à des motifs structuraux banaux retrouvés sur d'autres molécules que l'antigène étudié.

Autre contre-partie de cette monospécificité, l'affinité des Acm est restreinte à celle d'un unique couple épito-pe-paratope. Un As polyclonal bénéficie par contre de la coopération des affinités individuelles des anticorps qui le composent, ce qui lui confère un caractère d'avidité, améliorant les performances des dosages qui l'utilisent.

Lorsque l'Ag à détecter ne possède qu'un exemplaire de l'épito-pe reconnu par l'Acm, ce dernier n'aura pas la possibilité de l'agglutiner ni de le précipiter. Le recours à un mélange d'Acm de spécificités complémentaires, reconstituant en quelque sorte un As polyclonal dont la reconnaissance des épitopes serait maîtrisée, peut aider à contourner ce problème.

Enfin, la production d'Acm demeure une entreprise consommatrice de temps et d'argent, en dépit des améliorations constantes apportées à l'ensemble de la technique.

1.3. Acm en immunodiagnostic rapide.

La contribution des Acm au développement sans cesse croissant des tests d'immunodiagnostic rapide est primordiale (122). La qualité des résultats de ces tests immunoenzymatiques, pour la plupart, réside en effet dans le choix des Ac couplés sur le support (billes, tube, bandelette ou membrane).

L'étroite reconnaissance d'un Acm pour son épito-pe confère à la méthode de détection de l'Ag une spécificité diagnostique accrue. La rapidité, ainsi que la sensibilité du test augmentent avec l'affinité de l'Acm. Un As polyclonal, caractérisé par une combinaison d'affinités différentes, risque davantage, au contraire, de fournir des résultats faussement positifs.

Comme déjà indiqué, l'atout des Acm tient à leur reproductibilité de production parfaitement contrôlée. Les qualités immunologiques d'un As polyclonal sont en effet susceptibles d'être modifiées d'une saignée de l'animal à la suivante et varient d'un animal à l'autre. Ce critère de stabilité des propriétés immunologiques des réactifs est essentiel puisqu'il contribue à standardiser plus facilement les conditions d'utilisation des tests, donc favorise leur fiabilité.

La mise au point des dosages de myoglobine et de myosine par un système d'immunocapture a été effectuée par l'utilisation d'Acm immobilisés sur les MS.

2. Descriptions et intérêts des techniques utilisées pour l'étude des interférences sériques.

2.1. Le sang, milieu complexe.

Le sang se présente comme un liquide complexe et hétérogène, renfermant des éléments figurés (ou globules) et du plasma. Le sérum sanguin est composé essentiellement de nombreuses protéines (holoprotéines, lipoprotéines, métalloprotéines et surtout glycoprotéines). Le système protéique du sérum peut se diviser en deux classes selon la solubilité dans une solution demi-saturée de sulfate d'ammonium: le groupe des albumines (52 g/l dont 40 g/l d'albumine), solubles dans l'eau pure, précipitant entre 70% et 100% de saturation de cette solution, et le groupe des globulines (20 g/l) insolubles dans l'eau et pour lesquelles la précipitation nécessite une concentration de 50%. Le plasma renferme en plus du sérum du fibrinogène principalement, intervenant dans la coagulation du sang.

Les électrolytes régulent la pression osmotique, l'équilibre acido-basique et la distribution de l'eau dans l'organisme.

Les protéines possèdent diverses propriétés capitales pour l'organisme. L'albumine et les globulines interviennent dans le maintien de la pression osmotique du plasma. Certaines globulines "immunes", les Ig et les protéines du complément constituent les éléments de défense de l'organisme. De nombreux complexes protéiques sont de première importance pour le transport de métaux (albumine, transferrine, céruloplasmine), de lipides (lipoprotéines), d'hormones, de déchets hémoglobiniques (haptoglobine).

L'étude des constituants de ce milieu complexe, reflet de notre milieu intérieur, présente un intérêt capital en physiologie mais aussi en pathologie. Sa connaissance passe par l'emploi de diverses techniques de fractionnement, d'une part, séparant les substances selon certaines propriétés physico-chimiques spécifiques (masse moléculaire, charge électrique), et d'autre part de méthodes précises d'identification de ces substances.

La compréhension du problème posé par la présence dans le sérum de certains éléments interférants avec les microsphères implique de fractionner le sérum afin de tenter d'isoler plus facilement la ou les protéines interférentes.

2.2. Principes des techniques utilisées.

Outre l'immunonéphélométrie classique et à supports microparticulaires, qui représentent des méthodes quantitatives, diverses techniques de purification et d'analyse qualitative ont été utilisées dans la dernière partie de ce travail, dont les principes sont exposés ici. Des techniques de fractionnement (chromatographie d'exclusion et échangeuse d'ions) sont couplées à des méthodes analytiques dont certaines font appel à des outils immunologiques.

2.2.1. Méthode d'ultrafiltration.

Cette technique utilise une membrane à perméabilité sélective pour séparer un mélange en deux populations de substances selon que leur masse moléculaire est inférieure ou supérieure au seuil de séparation de la membrane.

La première démarche du fractionnement du sérum fait appel à cette méthode approximative quant à la précision des masses moléculaires séparées. Néanmoins elle nous permettra de déterminer dans quelle plage de masses moléculaires se situent les constituants responsables du phénomène de déstabilisation.

2.2.2. Méthodes chromatographiques.

2.2.2.1. Filtration sur gel.

Il s'agit d'une technique de chromatographie d'exclusion utilisant des colonnes remplies d'un gel microporeux minéral ou organique caractérisé par un certain degré de réticulation. Lorsqu'une solution déposée au sommet de la colonne est entraînée sous l'action du déplacement d'un fluide (phase mobile), ses molécules diffusent, entrant dans les pores (phase stationnaire) et sortant au hasard; si les dimensions des substances dissoutes sont supérieures à celle des pores, elles ne peuvent y pénétrer et en sont exclues. L'élution des diverses molécules dépend donc directement de leur masse moléculaire, les plus grosses sortant de la colonne les premières en raison de leur trajet plus court.

Décrite à partir de 1959 (121), cette technique est depuis largement appliquée au milieu sérique humain (45, 48) dans le but d'en séparer et purifier les diverses protéines en particulier les immunoglobulines. Le gel le plus utilisé, composé de dextran réticulé (Sephadex G200) permet un excellent fractionnement de base, mettant en évidence 3 groupes principaux différents par leurs MM (45).

Cette technique permet par exemple de séparer l'albumine ou les immunoglobulines de leurs agrégats et produits de protéolyse (13).

2.2.2.2. Echange d'ions sur DEAE cellulose.

L'échangeur d'ions est constitué de polymères insolubles de cellulose sur lesquels sont greffés des groupes fonctionnels diéthylaminoéthyl chargés positivement. Le passage sur un tel matériel d'un mélange de protéines, se comportant comme des polyélectrolytes de différentes charges, provoque une fixation des composés chargés négativement sur la résine. L'élution sélective des protéines s'effectue par décrochage séquentiel des constituants, grâce à une variation progressive du pH et/ou de la force ionique du tampon. Les protéines basiques sont les premières à être éluées, suivies par les neutres puis enfin par les acides.

La chromatographie d'échange d'ions est l'une des méthodes les plus répandues de séparation des protéines sériques et de purification des IgG à partir d'un sérum entier. Les celluloses modifiées sont dotées d'une grande capacité d'adsorption, ce qui autorise le fractionnement de quantités importantes de sérum. La distribution des principales protéines de sérum normal est connue (152); l'étude des chromatogrammes de sérums pathologiques peut aider à déceler certaines maladies.

2.2.3. Méthodes électrophorétiques.

2.2.3.1. Électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

Cette technique a été utilisée sur les fractions issues de la gel filtration puis de la chromatographie sur DEAE cellulose.

L'électrophorèse met à profit le déplacement de substances ionisées dans un champ électrique établi dans une solution électrolytique conduisant le courant.

La plupart des liquides biologiques sont constitués de substances amphotères telles que les protéines: ces dernières sont caractérisées par des enchaînements d'acides aminés possédant au moins deux types de groupes ionisables, ce qui leur confère une certaine charge électrique globale. Le signe et l'intensité de cette charge varient en fonction du pH de la solution et du pHi des protéines. Placées dans un champ électrique, elles migreront vers l'un des pôles, sauf à leur pHi, qui correspond à un état électrique neutre. Si le pH est supérieur au pHi, la protéine se dirige vers l'anode; inversement si le pH est inférieur au pHi, elle se déplace vers la cathode. Le pH du milieu expérimental est donc un facteur important dans la mobilité relative des protéines.

L'électrophorèse peut être conduite en veine liquide, sur papier, en gélose ou sur acétate de cellulose. Actuellement la séparation des protéines sériques fait appel à des gels d'amidon ou de polyacrylamide. Ces gels sont constitués de polymères avec des pores de petites dimensions, il se produit donc, outre la séparation électrophorétique, une filtration dans la matrice du gel, conduisant à retarder la migration des grosses molécules. Dans de tels gels, les protéines soumises à un champ électrique sont séparées en fonction de leurs charges électriques et de leurs tailles moléculaires.

Les gels de polyacrylamide présentent l'avantage de pouvoir contrôler leur porosité. Nous avons choisi ce type de support avec différents degrés de réticulation pour l'analyse des protéines sériques séparées. Les gels de polyacrylamide résultent de la copolymérisation d'un monomère (l'acrylamide) en présence d'un dimère réticulant (le N,N'-méthylène bisacrylamide). La polymérisation est assurée par l'action d'un couple d'oxydo-réduction, le TEMED ou N,N,N',N'-tétraméthylène diamine en présence d'un oxydant, le persulfate d'ammonium. Une structure tridimensionnelle plus ou moins rigide est obtenue, caractérisée par deux paramètres:

- T = concentration en acrylamide + concentration en bisacrylamide, pour 100 ml de solution. En pratique cette valeur peut varier de 3% à 30%; plus T augmente, plus l'effet de filtration est important.
- C = rapport des concentrations bisacrylamide / acrylamide, pour 100 ml de solution.

La technique adoptée fonctionne dans un système discontinu (82), comportant deux types de gels, l'un à faible concentration en acrylamide, l'autre étant à une concentration supérieure. Les substances migreront plus rapidement dans le premier gel (gel de concentration), ce qui a pour avantage de concentrer l'échantillon sous forme d'une bande très fine avant qu'il ne pénètre dans le second gel (gel de séparation). La détermination de la MM des protéines nécessite l'uniformisation de leurs charges et de leurs configurations spatiales. Un détergent anionique, le dodécyl sulfate de sodium (SDS), dont la partie hydrophobe se complexe fortement aux protéines, leur confère une charge électrique constante par unité de surface et modifie leur configuration spatiale. Ce traitement permet de mesurer directement la MM d'une protéine après électrophorèse. Il existe en effet une relation directe entre la MM et la mobilité de la protéine, le log. décimal de la MM de cette protéine étant directement proportionnel à sa mobilité relative.

L'analyse électrophorétique appliquée au sérum entier est très utilisée. En veine liquide, sur papier ou sur acétate de cellulose, les 5 fractions classiques sont mises en évidence (albumine et 4 globulines de mobilités α_1 et α_2 , β et γ). La résolution des gels d'amidon et plus particulièrement de polyacrylamide est plus fine, permettant de séparer le sérum en une trentaine de constituants (116). En électrophorèse bidimensionnelle, comportant deux séparations successives dans deux plans perpendiculaires, plus de cent fractions ont été décelées (163).

Cette méthode d'analyse, bien que non quantitative, a pris en médecine une très grande importance, car elle permet d'établir le diagnostic d'un certain nombre de maladies (17), du fait de sa simplicité, sa rapidité, sa précision et sa reproductibilité.

2.2.3.2. Isoélectrofocalisation.

Dans cette méthode, les protéines sont séparées en fonction de leurs pHi. Le support utilisé est constitué par un gel de polyacrylamide à très faible concentration, contenant un mélange d'ampholines possédant des pHi différents; sous l'effet du courant électrique, ces substances de synthèse particulières créent un gradient linéaire de pH. Les protéines introduites dans ce gel migreront tant qu'elles seront ionisées jusqu'à ce qu'elles rencontrent une zone de pH égale à leur pHi; elles s'arrêteront alors à cet endroit, leur charge nette étant neutre. Cette méthode douée d'un grand pouvoir de résolution met en évidence des différences de pHi inférieures à 0.1 unité, dépendant de la nature du gradient de pH; en effet la sensibilité est augmentée lorsque l'intervalle de pH est restreint. Les gels commercialisés prêts à l'emploi offrent un grand choix dans la gamme des pH utilisables.

Cette technique nous permet d'isoler et d'identifier aisément les IgG (4) contenues dans les fractions sériques car leur pHi est beaucoup plus élevé (7.3) que celui des autres protéines.

2.2.4. Méthodes immunologiques.

L'interprétation des électrophorégrammes des protéines sériques n'est pas toujours aisée en raison du nombre élevé de fractions; en outre, elle ne permet pas de distinguer des protéines ayant la même mobilité électrophorétique; par ailleurs des composants sous forme de traces peuvent passer inaperçus. L'analyse fine est souvent effectuée grâce à des méthodes indirectes de détection spécifiques qui sont enzymatiques ou immunologiques (43). Mais toutes les protéines ne sont pas douées d'activité enzymatique. Par contre, l'utilisation d'Ac permet de révéler spécifiquement toutes les structures protéiques. Des techniques

immunochimiques se sont développées parallèlement à l'électrophorèse, fondées sur les propriétés antigéniques des protéines.

2.2.4.1. Immunodiffusion double.

L'immunodiffusion a été décrite pour la première fois en 1946 par Oudin (115), visualisant en milieu gélifié une réaction de précipitation Ag/Ac, il s'agit d'une simple diffusion en tube, la solution renfermant les Ag diffusant vers le gel contenant les Ac. Cette découverte a entraîné depuis un essor considérable de ces techniques pour l'exploration des protéines sériques en biologie. Un an plus tard, en 1947, une technique de double diffusion est mise au point par Ouchterlony (114), dans laquelle les Ag et les Ac diffusent dans la gélose les uns vers les autres, à partir de réservoirs découpés dans la gélose. Chaque arc de précipitation visualisé correspond à un complexe Ag/Ac particulier, dont l'emplacement et l'intensité dépendent des constantes de diffusion et de la concentration des constituants.

2.2.4.2. Immunoélectrophorèse.

En 1953, Grabar et Williams (55) ont apporté une amélioration remarquable aux méthodes d'analyse des protéines, en combinant la double diffusion et l'électrophorèse en milieu gélifié. Les protéines sériques subissent d'abord une électrophorèse dans un gel d'agarose coulé sur un film de plastique ou une lame de verre. Les Ac sont ensuite déposés dans une gouttière parallèle au sens de la migration. Les constituants vont diffuser dans la gélose, la réaction Ag/Ac aboutissant à l'apparition d'arcs de précipitation.

Cette méthode présente l'avantage de cumuler le pouvoir de résolution de l'électrophorèse et la grande spécificité des réactions immunologiques. La résolution des protéines sériques permet d'identifier 25 protéines principales différentes grâce à un antisérum polyclonal anti-sérum humain total. En pathologie, des anomalies dans la structure et dans la concentration des immunoglobulines sont facilement détectées par cette méthode, reflétant l'existence de myélomes.

2.2.4.3. Immunotransfert ("immunoblotting") (51).

Cette technique consiste à transférer les protéines séparées par électrophorèse sur une membrane de nitrocellulose, constituant le support pour la détection et l'identification des protéines immobilisées. Cette réplique est ensuite révélée par un marquage avec des Ac spécifiques.

L'identification des protéines sur membrane pose en effet moins de problèmes que l'analyse sur gel: dans le gel, les protéines peuvent diffuser, les protéines immobilisées sur la membrane sont plus accessibles au révélateur immunologique. De plus, les membranes se manipulent plus facilement que les gels et les quantités de réactifs à mettre en oeuvre sont moins importantes.

Cette méthode a été introduite par Southern en 1975 (149), pour l'identification de fragments d'ADN ("Southern blot"); après séparation électrophorétique sur gel d'agarose, les molécules étaient transférées par capillarité sur la membrane. L'analyse de l'ARN développée plus tard fut dénommée par analogie "Northern blot". En 1979, Towbin (154) décrit une technique de transfert des protéines par électroélution, désormais la plus employée, et baptisée "Western blot". L'ensemble gel-matrice est pris entre deux supports eux mêmes introduits entre deux électrodes, le tout baignant dans une cuve remplie de tampon. Une différence de potentiel est créée perpendiculairement à la surface du gel, les protéines migrent vers la membrane.

Nous avons employé cette technique pour caractériser le contenu des fractions sériques.

2.3. Conclusion.

Les techniques de filtration sur gel et de chromatographie sur DEAE cellulose décrites ont été utilisées successivement pour fractionner le sérum. L'analyse des fractions a ensuite fait appel à un ensemble de méthodes électrophorétiques et immunologiques variées dans le souci d'assurer la fiabilité des résultats.

PARTIE II

PARTIE II: Mise au point en milieu synthétique de systèmes réactionnels utilisant des MS-Ag et des MS-Ac.

INTRODUCTION.

Dans une étape préliminaire, nous avons recherché les critères à remplir par un dosage de marqueurs sériques de souffrance cardiaque, et notamment de myoglobine par immunonéphélométrie à supports microparticulaires. L'établissement de ce "cahier des charges" devait nous permettre de définir les objectifs à atteindre.

Certains paramètres, liés aux particularités biologiques de la myoglobine circulante, sont à considérer:

- Des taux sériques de myoglobine supérieurs à 85 ng/ml sont estimés comme étant pathologiques. La sensibilité de détection de la méthode devra donc être inférieure à cette valeur. Plus elle sera abaissée, mieux les taux physiologiques seront évalués, plus le volume de sérum nécessaire sera réduit, et plus sa dilution dans le milieu de réaction sera élevée, gage de spécificité.
- La durée de manipulation et la facilité d'obtention des résultats sont des critères non négligeables; un dosage rapide, facile à mettre en oeuvre est préférable à condition que la sensibilité reste suffisante.
- Le domaine de mesure doit être tel qu'il recouvre une large zone de concentrations pathologiques, l'objectif étant d'éviter des résultats faussement négatifs ou faussement positifs.

Cet exposé décrit la mise au point en milieu synthétique de deux systèmes réactionnels de dosages, utilisant l'un des MS-Ag, l'autre des MS-Acm. Appliqués au dosage de la myoglobine et de la myosine, ces systèmes seront détaillés pour la myoglobine puis l'un d'entre eux sera transposé au dosage de la myosine.

CHAPITRE I: Dosages de la myoglobine humaine.

1. Mise au point d'un dosage de la myoglobine par inhibition de l'agglutination.

1.1. Origine de la myoglobine à coupler sur les MS.

Cette étape a pour objectifs de vérifier, dans un premier temps, la faisabilité d'un dosage par inhibition dans un système microsphères-myoglobine humaine / anticorps anti-myoglobine humaine, puis dans un second temps de tenter de substituer à la myoglobine humaine fixée sur les MS de la myoglobine d'une autre espèce. La myoglobine humaine est en effet rare et fort coûteuse, son couplage sur les MS en consomme des quantités assez

importantes; d'où l'idée de remplacer la myoglobine humaine par celle d'une autre espèce, facilement extractible, et disponible en grandes quantités.

1.1.1. Synthèse et réactivité des MS-myoglobine (MS-Mb) humaine.

1.1.1.1. Préparation des MS-Mb.

Le principe et les différentes phases du couplage d'Ag sur les MS ont été exposés dans la première partie (cf. Ch.II.3.3.1.2.).

Nous ne décrivons ici que les particularités pratiques du couplage de la myoglobine.

1.1.1.1.1. Réactifs.

- Microsphères: lot 901; diamètre: 200 nm; concentration: 14.5 mg/ml.
- Myoglobine de muscle squelettique humain: Dako X555 lot 034 sous forme réduite de cyanmetmyoglobine; 1 mg dans 175 µl de tampon PBS.
- Antisérums anti-myoglobine humaine:
 - . Ig de lapin Dako A324 lot 087.
 - . Antisérum total de lapin (titre 0.07 mg/ml) Behring TPK lot A108803E.
- Sodium dihydrogénophosphate (Prolabo).
- Disodium hydrogénophosphate (Prolabo).
- Ethanolamine (Prolabo); saccharose (Merck); polyéthylèneglycol (Merck); acide borique (Merck); acide acétique (Prolabo); chlorure de sodium (Prolabo).

1.1.1.1.2. Dialyses des MS natives.

Les MS sont dialysées contre le tampon choisi pour le couplage, caractérisé par sa force ionique et son pH. Une force ionique élevée conditionne une bonne stabilité du produit final; le pH doit être supérieur au pHi de la myoglobine, afin de préserver la forme -NH₂ libre des fonctions amines primaires indispensables à la formation de liaison imine lors de la fixation sur les MS.

Le tampon retenu en fonction de ces critères est le phosphate de sodium 0.1M pH 7.2 NaCl 0.3M, préalablement dégazé et saturé d'argon.

10 ml de la suspension de MS 901 sont introduits dans un sac de dialyse, ainsi qu'1 ml de tampon phosphate 1M, destiné à tamponner le milieu pour prévenir une agglutination spontanée des MS. La première dialyse est menée contre le tampon dépourvu de NaCl, toujours pour éviter une hausse trop brutale de la force ionique. Trois dialyses, de 4 h chacune, sont effectuées à 4°C contre 1 litre de tampon sous agitation magnétique.

1.1.1.1.3. Couplage.

Le couplage est réalisé dans un tube en verre, ce qui limite d'éventuelles adsorptions des réactifs sur les parois.

Le milieu de couplage de volume 1 ml est le suivant:

- 715 µl de MS 901 dialysées.
- 60 µl de la solution de myoglobine humaine.
- 225 µl de tampon phosphate 0.1M pH 7.2 NaCl 0.3M.

La solution de couplage renferme 10 mg de MS et 2.10^{-8} moles de myoglobine (soit 340 μg) sous un volume final de 1 ml. Une incubation sans agitation de 2 h à T.A., puis 18 h à 4°C suffit pour sensibiliser les MS de façon satisfaisante.

1.1.1.1.4. Saturation de l'excès de fonctions aldéhydes.

Une solution d'éthanolamine tamponnée est ajoutée au milieu de couplage; elle est préparée comme suit:

- 1 ml de tampon phosphate 0.1M pH 7.2 NaCl 0.3M.
- 200 μl d'éthanolamine.
- 180 μl environ d'acide acétique afin d'ajuster le pH à 7.2.

Un volume de 50 μl de cette solution est additionné à 1 ml de milieu de couplage. La saturation est menée pendant 2 h à T.A..

1.1.1.1.5. Elimination des ligands non couplés.

L'excès de myoglobine non fixé aux MS est éliminé par une ultracentrifugation sur gradient de saccharose. Les solutions de saccharose 20% et 80% sont préparées en tampon phosphate 0.1M pH 7.2 NaCl 0.3M; les conditions de vitesse et de temps de l'ultracentrifugeuse Spinco L. sont fixées à 8500 tours/min pendant 1 heure.

L'anneau de MS sensibilisées est recueilli à l'interface des deux solutions de saccharose. Les ligands non couplés sont restés à la surface de la solution de saccharose 20%. La suspension de MS est ramenée au volume initial de couplage par le tampon et additionnée d'azide de sodium à 2 pour 1000. Cette préparation est conservée à 4°C.

A chaque étape de la préparation, un contrôle néphélométrique est effectué sur une dilution au 1/100 du milieu de réaction en tampon phosphate de sodium 0.1M pH 7.2. Les signaux restent voisins de 70 mV. Ces MS sont donc parfaitement stables.

1.1.1.2. Réactivité des MS-Mb humaine.

La réussite du couplage est vérifiée néphélométriquement par l'agglutinabilité des MS-Mb en présence de dilutions sériées d'un antisérum spécifique.

L'inhibition de cette agglutination par une solution de myoglobine libre confirme le caractère spécifique de la réaction.

1.1.1.2.1. Conditions opératoires.

1.1.1.2.1.1. Tampon de travail.

Dans cette partie, les dilutions des réactifs, les mises en réaction et l'ensemble des tests sont effectués dans un tampon pour néphélométrie commercialisé par Diagnostics Pasteur (tampon DP n°90 090). Ce tampon est caractérisé par une force ionique élevée, par un pH proche de la neutralité, et la présence de PEG de MM 6000 Da (3% en poids / volume); ce dernier accélère la cinétique de la réaction et accroît l'amplitude des signaux.

1.1.1.2.1.2. Stabilité des MS.

On vérifie que la suspension de MS-Mb et ses dilutions sont stables dans ce tampon et on détermine à cette occasion la dilution de travail (1/160) telle que le blanc MS génère un signal de 50 mV.

1.1.1.2.1.3. Appareillage.

Toutes les mesures néphélométriques sont réalisées sur le prototype industriel N601 de Diagnostics Pasteur.

Les prédilutions des réactifs, ainsi que les mises en réaction sont effectuées grâce au préparateur d'échantillons (module III) du néphélomètre Behring.

1.1.1.2.2. Agglutination.

Les MS-Mb à une dilution fixe (1/160), sont mises en présence de dilutions sériées, du 1/400 au 1/25600, d'un sérum anti-myoglobine humaine. Les deux antisérums disponibles sont testés en parallèle, dans le but de sélectionner le plus performant.

Les réactions se font directement dans les cuves néphélométriques, sous un volume final constant de 300 µl.

Les courbes obtenues en 7 heures sont représentées sur la figure 5: l'obtention d'un delta I plus grand pour l'As Dako indique que ce dernier agglutine plus fortement les MS-Mb que l'As Behring. De plus, la dernière dilution agglutinante est plus importante pour l'As Dako. L'As Behring renfermerait une quantité d'Ac anti-Mb plus faible que l'As Dako ou de qualité agglutinante moindre. Les cinétiques d'agglutination sont lentes, les tracés étant obtenus pour une durée de réaction de 7 h.

1.1.1.2.3. Inhibition de l'agglutination.

1.1.1.2.3.1. Par la myoglobine humaine libre.

La dilution de l'As est choisie de façon à se situer dans la zone la plus pentue de la courbe d'agglutination, où une faible diminution de la quantité d'As engendre une baisse importante du signal néphélométrique. Si l'on inhibe une fraction des Ac par la myoglobine libre ajoutée au milieu, cette consommation d'Ac, même minime, va se traduire par une chute importante du signal, ce qui contribue à accroître la sensibilité du dosage.

En fonction de ce qui précède, la dilution de l'As Dako est fixée à 1/3200 et celle de l'As Behring à 1/800. Les MS-Mb sont utilisées plus concentrées (1/80) afin d'accélérer la cinétique de la réaction.

Dans une première étape, des dilutions de raison 2 de la solution de myoglobine sont incubées pendant 30 min à T.A. en présence des dilutions fixes de chacun des deux As, permettant aux molécules de myoglobine de bloquer une partie des sites Ac. Les MS-Mb sont ensuite ajoutées au temps 0 et le volume final est amené à 300 µl.

Les courbes d'inhibition obtenues en 1 h 30 min pour chacun des deux As sont reportées figure 6. Une faible concentration de myoglobine libre induit la formation de très peu de complexes Ag/Ac, certains Ac sont encore disponibles pour se lier aux MS-Mb, ce qui se traduit par un signal élevé. Au fur et à mesure de l'augmentation de la concentration de myoglobine dans le milieu, le nombre de complexes Ag/Ac croît, les MS-Mb fixent de moins en moins d'Ac puis plus du tout: le signal néphélométrique généré par l'agglutination des

Figure 5 Agglutination MS-Mb humaine par As lapin anti-Mb humaine Dako ou Behring

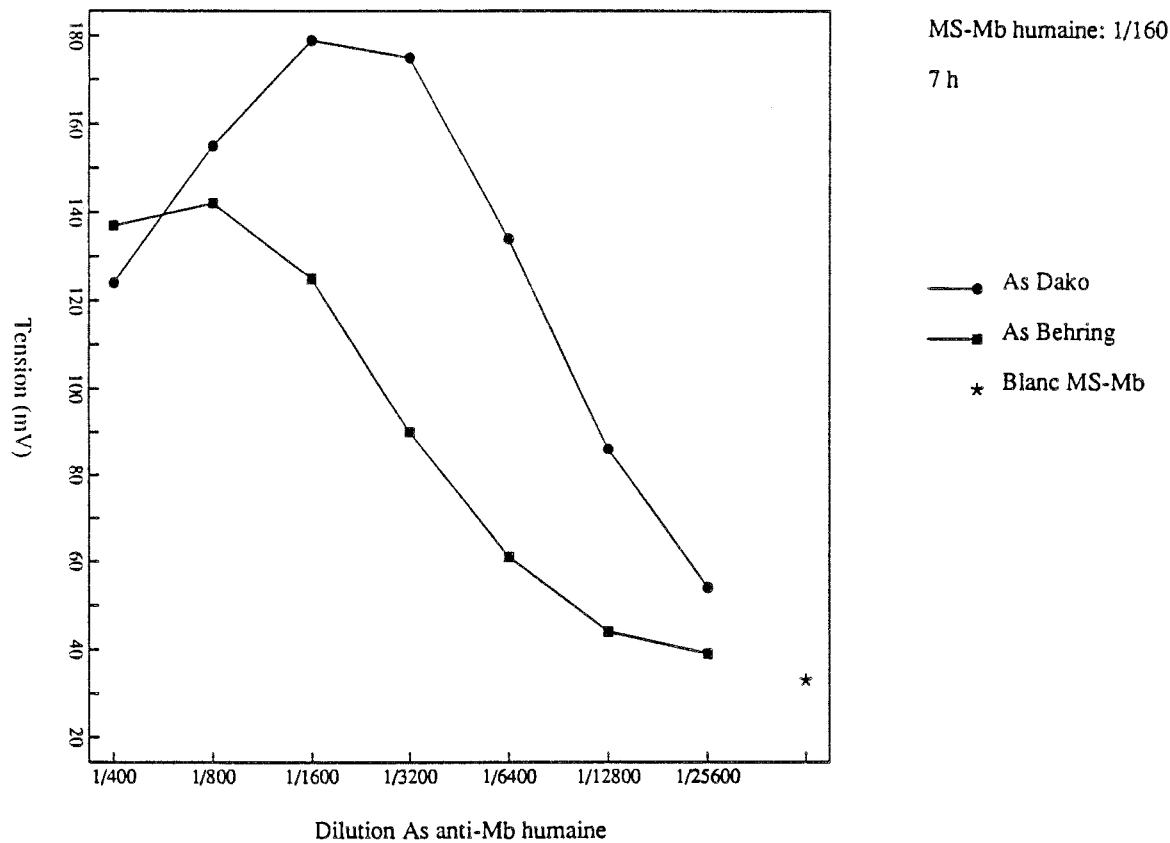
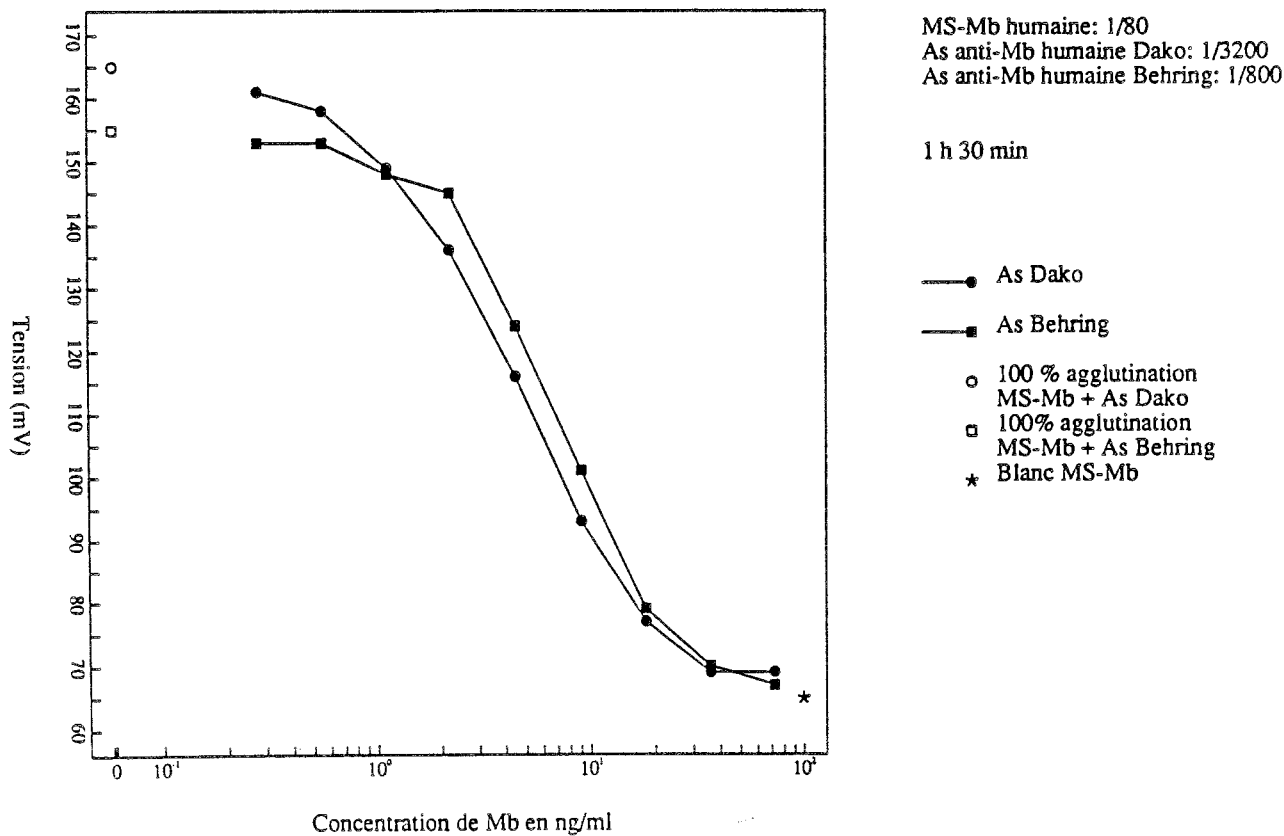


Figure 6 Inhibition de l'agglutination MS-Mb humaine/As lapin anti-Mb humaine Dako ou Behring par la Mb humaine



MS-Mb chute donc jusqu'au blanc MS puisque les complexes Ag/Ac, de trop faible taille, ne sont pas détectés par le néphélémètre.

L'analyse des deux courbes montre que:

- L'agglutination des MS-Mb par l'un ou l'autre des As est spécifique de la myoglobine couplée car la réaction est inhibable par la myoglobine humaine libre; la plage d'inhibition s'étend de 1 ng/ml à 80 ng/ml.
- L'inhibition de l'agglutination est totale, quelque soit l'As utilisé.
- Les cinétiques de réaction sont lentes; un temps de 1 heure 30 min est nécessaire pour que le signal d'agglutination atteigne le double du signal créé par les MS seules (blanc MS). Le blanc MS a été délibérément fixé à un faible voltage pour économiser les MS sensibilisées. Son accroissement, par une augmentation de la concentration des MS, accélérerait la cinétique des signaux.
- Bien que les As soient mis en réaction sous des dilutions différentes, les deux profils d'inhibition sont presque superposables, ce qui tendrait à démontrer que, dans ces deux As, l'avidité des Ac pour la myoglobine libre serait équivalente. Par souci d'économie des réactifs nous poursuivrons toute l'étude avec l'As Dako, fournissant, en outre, des concentrations de Mb à 50% d'inhibition et à 10% d'inhibition (seuil de détection) inférieures (respectivement 4.5 et 1 ng/ml) à celles obtenues avec l'As Behring (respectivement 7 et 2.5 ng/ml).

1.1.1.2.3.2. Par la myoglobine animale libre.

Le système agglutinant MS-Mb / As, totalement inhibable par la myoglobine humaine libre, est spécifique. Le seuil de détection se situe autour de 1 ng/ml.

Le dosage serait cependant rendu plus accessible à l'utilisateur final s'il était possible d'en abaisser le coût en remplaçant la myoglobine humaine couplée sur les MS, chère, par de la myoglobine animale. Nous avons donc évalué la reconnaissance immunologique, par l'As Dako, de la myoglobine provenant de différentes espèces.

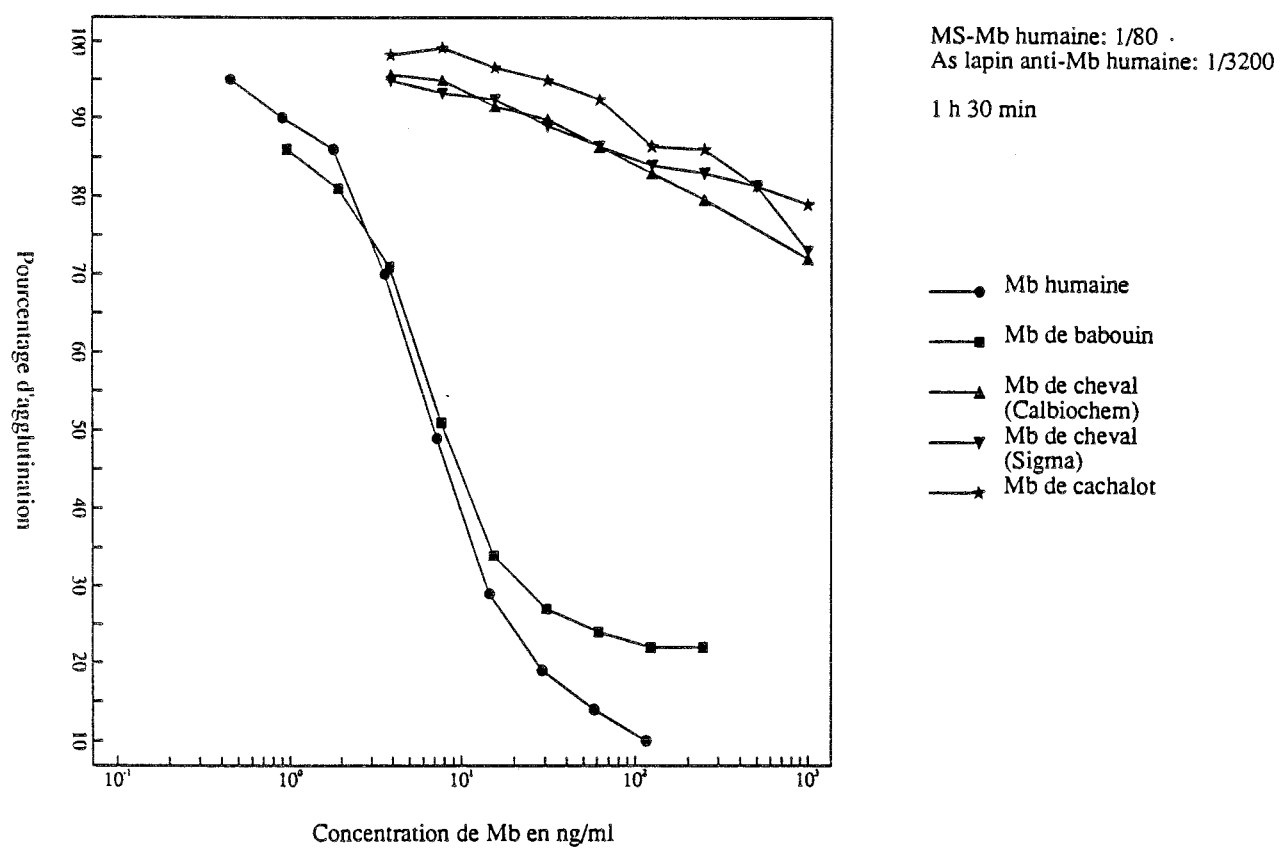
Les myoglobines suivantes ont été utilisées comme agent inhibant de la réaction d'agglutination MS-Mb humaine / As Dako:

- Myoglobine de muscle squelettique de cheval (Sigma).
- Myoglobine de muscle squelettique de cheval (Calbiochem).
- Myoglobine de muscle squelettique de cachalot (Sigma).
- Myoglobine de muscle squelettique de babouin (préparée au Laboratoire, cf. Ch.I.1.1.2.1.).

La figure 7 illustre les profils obtenus. Nous constatons que:

- Les myoglobines de muscle squelettique de cheval ou de cachalot inhibent très peu l'agglutination (les pourcentages de réactions croisées calculés pour 20% d'inhibition sont respectivement de 1% et de 0.27%); quelque soit la concentration en agent inhibant utilisée, les signaux persistent tous au niveau du signal d'agglutination: les anticorps anti-Mb humaine ne reconnaissent pas la myoglobine de ces deux espèces, ce qui témoigne de l'existence d'une spécificité d'espèce assez étroite.
- Cette agglutination est par contre inhibable, bien que non totalement, par une préparation de myoglobine squelettique de babouin: il subsiste une légère agglutination résiduelle de 20%, attribuable à des Ac dirigés spécifiquement contre la myoglobine humaine et ne croisant pas avec la Mb de babouin. Le profil

Figure 7 Inhibition de l'agglutination MS-Mb humaine/As lapin anti-Mb humaine par la Mb squelettique provenant de différentes espèces



d'inhibition est proche de celui obtenu avec la myoglobine humaine en termes de seuil de détection et de 50% d'inhibition.

Ces résultats nous autorisent à tenter de coupler la myoglobine de babouin sur les MS afin d'étudier le système inverse, c'est à dire l'inhibition de l'agglutination de ces MS-Mb de babouin par de la myoglobine humaine.

1.1.2. Synthèse et réactivité des MS-myoglobine de babouin.

1.1.2.1. Préparation de la myoglobine de babouin.

La technique d'isolement de la myoglobine, décrite par Malin (100) repose sur des extractions à faible force ionique.

Le muscle squelettique de babouin sur lequel la préparation est effectuée nous a été fourni sous forme congelée par la Société Sanofi Recherche (Montpellier). 50 g de muscle sont traités après élimination du tissu conjonctif et de la graisse. La séquence des manipulations est représentée sur la figure 8.

Selon Malin et al., pour 50 g de muscle traité, l'extrait brut renferme 0.15 g de myoglobine et 1.13 g de protéines sarcoplasmiques solubles aux faibles forces ioniques. Compte tenu du volume d'extraction de 240 ml, la concentration théorique en myoglobine de cet extrait s'élèverait à 630 µg/ml.

La comparaison des spectres de cet extrait et d'une solution de myoglobine humaine purifiée (Dako) révèle la présence de pics aux longueurs d'onde 415 nm, 542 nm, et 580 nm, démontrant l'existence d'oxymyoglobine. La metmyoglobine (où l'atome de Fe se trouve sous forme Fe³⁺) absorbe quant à elle principalement à 408 nm et 502 nm. En admettant que la préparation soit peu contaminée par de l'hémoglobine, une estimation de la concentration de l'extrait en myoglobine par mesure de la densité optique à 408 nm contre un étalon de myoglobine humaine purifiée fournit un résultat de 680 µg/ml.

Cet extrait brut est couplé sans autre purification sur les microsphères.

1.1.2.2. Synthèse des MS-Mb.

Les modalités d'obtention des MS sensibilisées sont tout à fait superposables à celles décrites ci-dessus pour le couplage de la myoglobine humaine.

1.1.2.3. Réactivité des MS-Mb.

La réactivité des MS synthétisées est testée dans les mêmes conditions que précédemment (tampon et matériels identiques).

1.1.2.3.1. Agglutination.

Une série de dilutions de l'As Dako de 1/800 à 1/25600 est mise en présence des MS-Mb en dilution fixe. Le volume final de réaction est de 300 µl. La figure 9, obtenue pour un temps de réaction de 5 h 30 min montre que l'As agglutine les MS. Certains des Ac dirigés contre la myoglobine humaine se lient donc à la myoglobine de babouin présente à la surface des MS.

Figure 8 **Schéma d'obtention de la myoglobine squelettique de babouin**

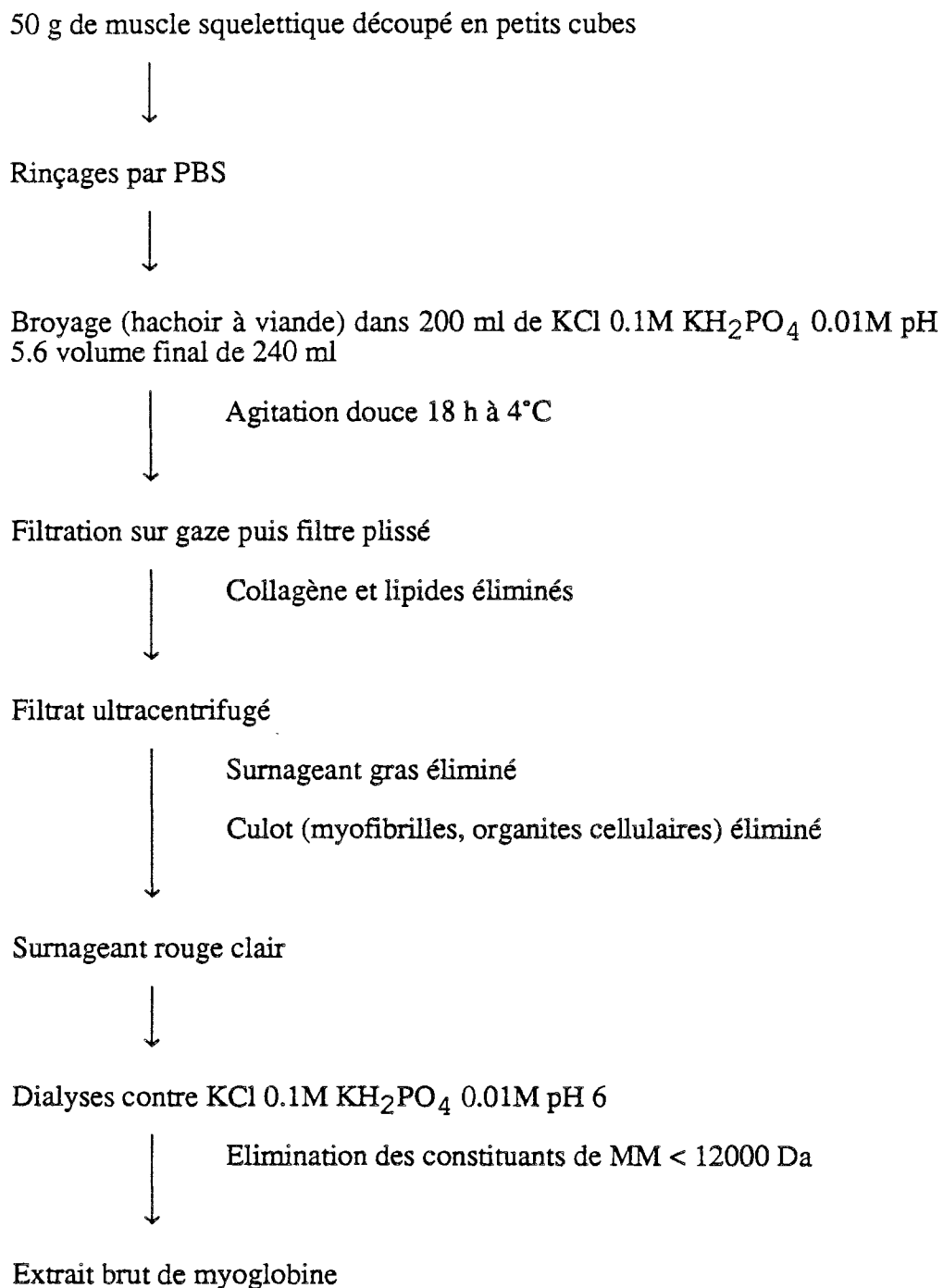


Figure 9 Agglutination MS-Mb babouin par As lapin anti-Mb humaine

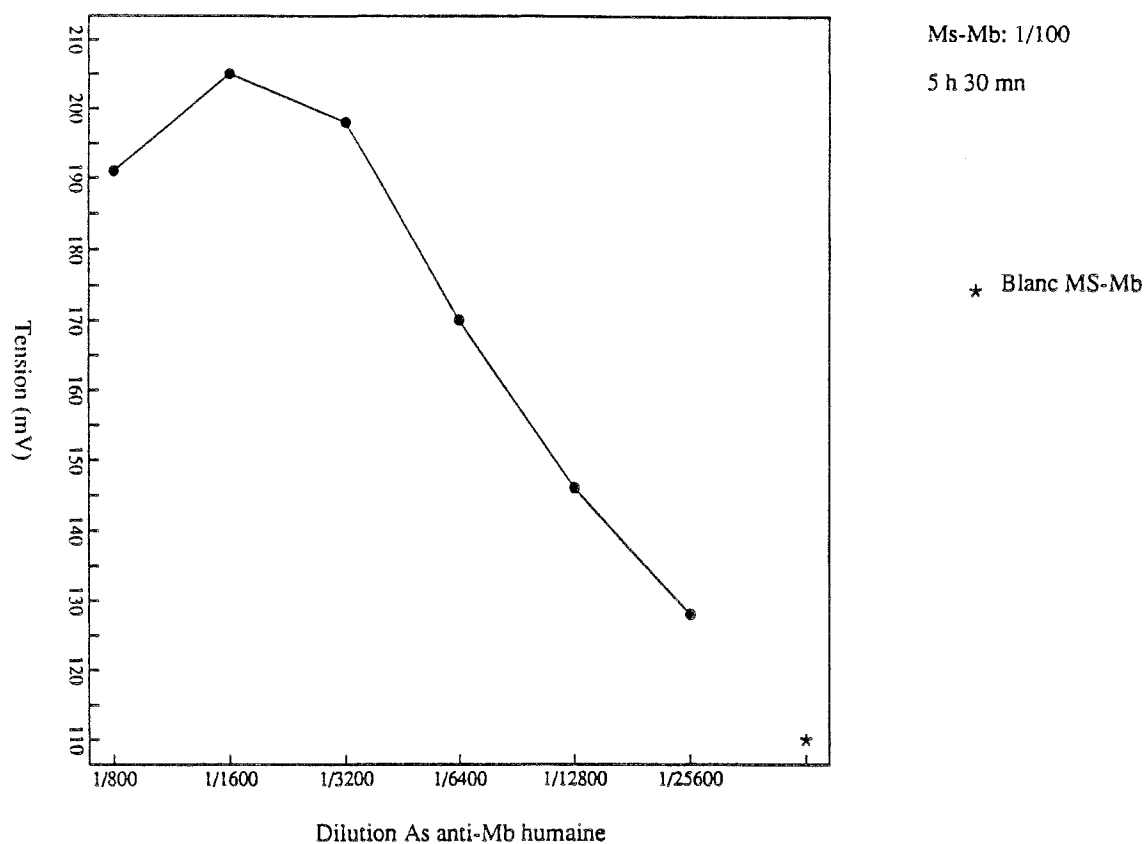
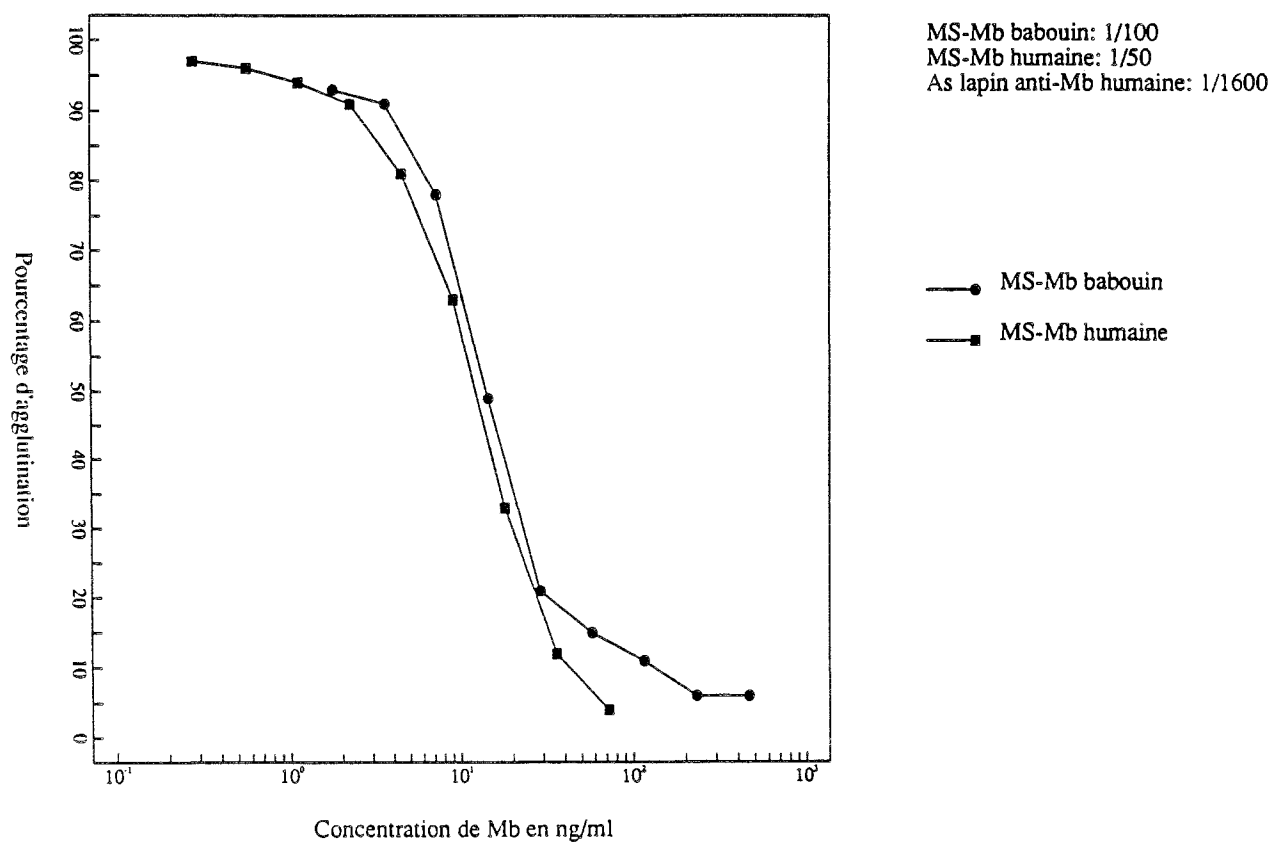


Figure 10 Inhibitions comparatives des deux systèmes MS-Mb babouin/As anti-Mb humaine et MS-Mb humaine/As anti-Mb humaine par la Mb humaine



1.1.2.3.2. Inhibition par la Mb humaine libre.

Une dilution d'As de 1/1600 est choisie; une gamme de dilutions de myoglobine humaine s'échelonnant de 2 ng/ml à 500 ng/ml est incubée en présence de l'As pendant 30 minutes; l'addition des MS-Mb marque le début de la réaction.

La figure 10 présente la courbe d'inhibition obtenue; elle comporte également à titre de comparaison les résultats obtenus dans le système MS-Mb humaine. Nous constatons que:

- La myoglobine humaine inhibe le système agglutinant MS-Mb de babouin / As; la réaction est totale, la myoglobine humaine libre a consommé tous les Ac de l'As anti-Mb humaine capables de reconnaître la myoglobine de babouin. Ceci confirme la réactivité croisée des Ac vis-à-vis de la myoglobine humaine et de la myoglobine de babouin puisque les deux Ag, l'un libre, l'autre lié aux MS, entrent en compétition. Les déterminants antigéniques utiles des deux molécules de myoglobine sont probablement très proches, sinon identiques, en termes de structure et de conformation.
- Les deux tracés d'inhibition sont presque superposables; les plages d'inhibition sont identiques, les 50% d'inhibition se situent à 12 ng/ml de myoglobine, les seuils de détection proches (2.5 ng/ml pour le système MS-Mb humaine et moins de 5 ng/ml pour le système MS-Mb de babouin). Les deux systèmes, différant par l'origine de la myoglobine couplée sur les MS, sont sensiblement équivalents, ce qui souligne l'étroite homologie de structure de ces deux variétés de myoglobine.

1.1.3. Conclusion.

Les systèmes agglutinant MS-Mb humaine / As anti-Mb humaine et MS-Mb de babouin / As anti-Mb humaine peuvent être inhibés indifféremment et de façon spécifique par de la myoglobine des deux espèces. Un dosage de myoglobine humaine sérique par inhibition de l'agglutination est donc envisageable par l'un ou l'autre de ces deux systèmes. La myoglobine de babouin, disponible en grandes quantités et peu coûteuse, est donc adoptée pour le couplage ultérieur sur les MS.

Ce chapitre préliminaire, destiné à définir les conditions expérimentales et à fixer le choix des réactifs, laisse entrevoir la possibilité d'un dosage de myoglobine humaine par inhibition de l'agglutination des MS-Mb de babouin / As anti-Mb humaine.

Cependant un dosage d'urgence requerrait de raccourcir les temps d'incubation afin d'affiner rapidement le diagnostic et d'argumenter la décision d'instaurer ou non un traitement thrombolytique.

1.2. Mise au point d'un dosage en 15 min de la myoglobine humaine.

Un dosage rapide de myoglobine par inhibition impose l'addition simultanée de tous les réactifs, sans temps de préincubation. La durée de réaction peut être diminuée au prix de quelques modifications des conditions expérimentales: une augmentation de la concentration des MS, bien qu'élevant le blanc MS, accroît la probabilité de rencontre des MS avec les Ac et donc raccourcit le temps requis pour engendrer un signal significatif. Toutefois, la consommation d'Ac par les MS augmentant, la quantité d'Ac présents à l'inhibition sera également accrue et donc davantage de myoglobine libre sera nécessaire pour les neutraliser; ceci entraîne une hausse du seuil de détection s'opposant à la sensibilisation du système.

1.2.1. Modifications de certains paramètres.

1.2.1.1. Modalités de couplage et tampon de réaction.

Le dosage de la myoglobine devra se faire en présence d'un milieu biologique, le sérum ou le plasma, susceptible de déstabiliser les MS. Les conditions de couplage ont donc été modifiées afin d'accroître la stabilité du réactif MS-Mb:

- Le couplage se fait en tampon borate 0.1M à pH 9.
- L'étape de saturation par la solution d'éthanolamine se prolonge pendant 24 heures à 4°C.
- La concentration de couplage de la myoglobine de babouin passe de 340 à 500 µg/ml soit 3.10^{-8} moles/ml. Nous avons utilisé une préparation fournie par Diagnostics Pasteur, repurifiée par gel filtration pour en éliminer les composants de haute masse moléculaire.

Les MS de couplage proviennent du lot 1006, leur diamètre est supérieur à 300 nm et leur concentration est de 19.4 mg/ml.

Le pH du tampon de néphélémétrie est monté à 8.2.

Exceptées ces quelques modifications, le couplage de la myoglobine de babouin passe par une suite d'étapes identiques à celles décrites précédemment.

1.2.1.2. Conservation des MS sensibilisées.

La réactivité des MS-Mb, maintenues à 4°C et à l'obscurité en présence d'azide de sodium, est contrôlée au cours de leur conservation. Les paramètres d'agglutination de ces MS-Mb par l'As sont ainsi comparés au temps 0 de fabrication (J0) et 2 mois plus tard, dans les mêmes conditions expérimentales. Les blancs MS sont équivalents, les dilutions finales de l'As s'échelonnent du 1/100 au 1/25600.

Les courbes d'agglutination, reportées sur la figure 11 (les profils sont ici obtenus avec les MS-Mb humaine) sont proches, certes, mais les temps d'obtention des signaux sont très différents; près de 8 heures d'incubation entre les MS-Mb âgées et l'As sont nécessaires pour rejoindre les signaux obtenus en 50 min avec les MS fraîches.

Le comportement des MS âgées pourrait s'expliquer par une diminution de réactivité de la myoglobine une fois couplée sur les MS; le titre agglutinant de l'As étant préservé, il ne peut s'agir a priori d'un relargage de myoglobine par les MS.

Ce problème a été contourné en congelant à -20°C les MS sensibilisées. Après récupération de l'anneau de MS-Mb à l'interface du gradient 20% - 80% de saccharose, les MS sont dialysées pour éliminer le saccharose, puis congelées après addition de PEG 6000 Da et de saccharose en concentration contrôlée.

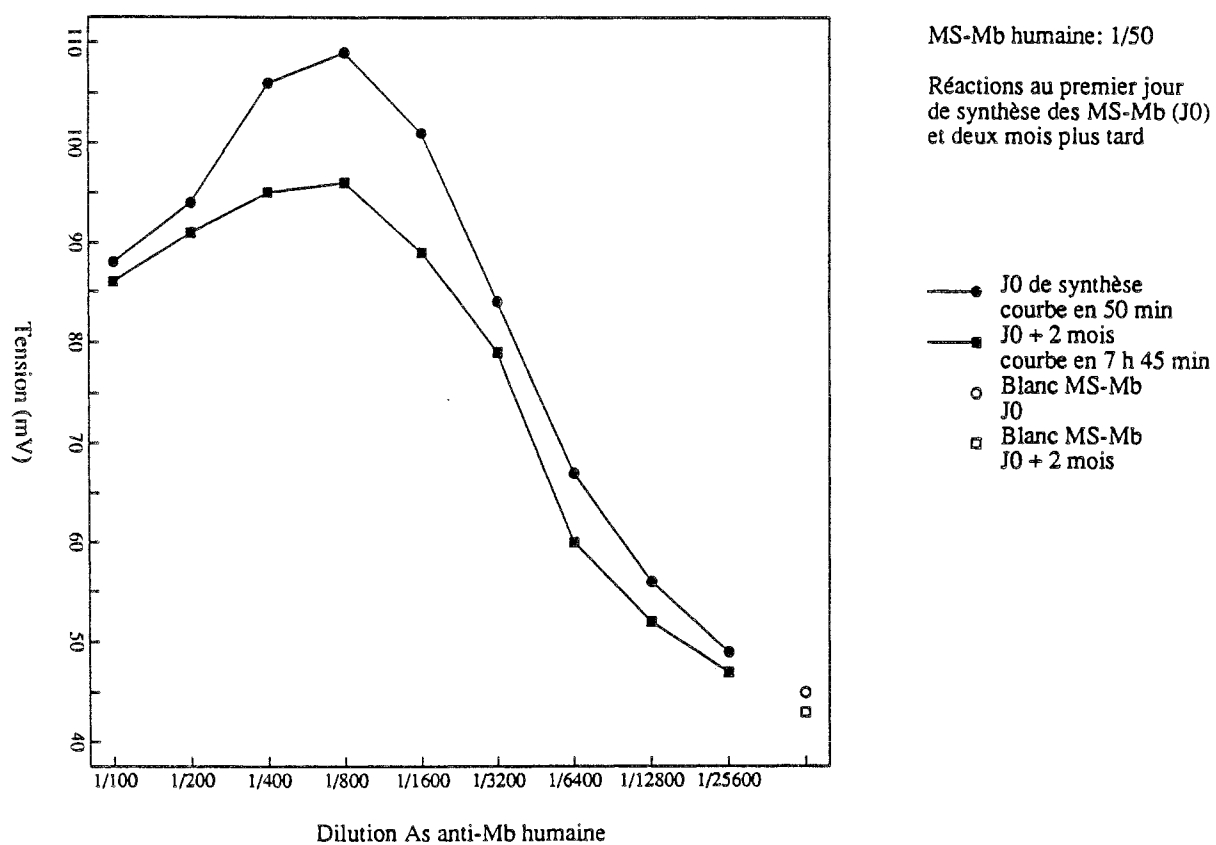
1.2.2. Réactivité.

1.2.2.1. Agglutination par l'antisérum Dako.

Le temps de réaction est fixé à 15 min après la mise en présence des MS-Mb et de l'As.

La dilution de l'As choisie pour l'inhibition est telle qu'une différence de 300 mV entre le signal d'agglutination et le blanc MS soit obtenue.

Figure 11 Agglutination MS-Mb humaine par As lapin anti-Mb humaine
Influence de la durée de conservation des MS-Mb



Afin d'optimiser les concentrations de MS et d'As pour l'inhibition, trois dilutions de MS-Mb (1/5, 1/10, 1/20) sont mises en présence de dilutions de l'As allant du 1/200 au 1/51200.

Les profils d'agglutination en 15 min (figure 12) montrent un décalage des pentes vers les faibles dilutions d'As lorsque les MS sont plus concentrées. Les dilutions 1/10 et 1/20 des MS-Mb ne permettent pas d'obtenir une élévation du signal de 300 mV en présence de l'As. Une dilution des MS au 1/5 est finalement retenue, le blanc MS provoquant un signal de 210 mV. L'As sera utilisé au 1/400.

1.2.2.2. Inhibition par la Mb humaine libre.

Une série de prédilutions de myoglobine humaine est mise à réagir avec l'As au 1/40. Après passage du rack portant les cuves (3 min 45 s), les MS-Mb sont distribuées dans les cuves au temps 0. Les signaux de la figure 13 sont obtenus après 15 min d'incubation.

La zone d'inhibition s'étend de 10 ng/ml à plus de 1 µg/ml de myoglobine. Le seuil de détection est ici plus élevé que celui (environ 5 ng/ml) rencontré dans le chapitre précédent. De plus la pente moins raide de la courbe permet d'élargir la gamme de concentrations de myoglobine. Ces constatations résultent du choix des conditions de travail: la nécessaire diminution du temps de réaction impose de concentrer davantage les réactifs, d'où une moindre sensibilité du système, se traduisant par un seuil de détection plus important, une pente moins forte, impliquant une moindre précision des dosages.

L'objectif étant la détermination rapide de la myoglobulinémie de patients suspectés de présenter un infarctus du myocarde, la précision du résultat est importante, certes, et surtout le seuil de détection, mais la persistance d'une certaine marge d'incertitude peut être tolérée sans nuire à la signification diagnostique. Les valeurs publiées dans la littérature font ressortir un décalage considérable entre le taux physiologique de myoglobine circulante et les taux pathologiques.

En conclusion, l'exploitation de ce profil d'inhibition pour le passage en milieu sérique indique qu'une dilution au 1/10 du sérum est requise pour un seuil de positivité situé à 100 ng/ml; ainsi, la plage des concentrations dosables de myoglobine va de 100 ng/ml à plus de 10 µg/ml et autorise la détection de toutes les valeurs pathologiques. L'adaptation de ce système de dosage de la myoglobine au milieu sérique fera l'objet de la troisième partie (cf. Ch.I.1.).

2. Mise au point d'un système réactionnel d'immunocapture à MS-Ac.

2.1. Synthèse des MS-Acm.

La synthèse passe par trois phases principales:

- fabrication de dextran amino.
- couplage du dextran amino sur les MS.
- couplage de l'Acm sur les MS-dextran.

Le principe de ce protocole a été exposé dans la première partie (cf. Ch.II.3.3.2.). Nous n'en rapporterons donc ici que les paramètres purement techniques.

Réactifs:

- Dextran T500 (Pharmacia).
- Periodate de sodium (NaIO_4) (Merck).
- 1,7-diaminoheptane (Merck).
- Borohydrure de sodium (NaBH_4) (Merck).
- Cyanoborohydrure de sodium (NaBH_3CN) (Merck).
- Orcinol ($\text{C}_7\text{H}_8\text{O}_2$, H_2O) (Serva).

Figure 12 Agglutination MS-Mb babouin par As lapin anti-Mb humaine
Influence de la dilution des MS-Mb

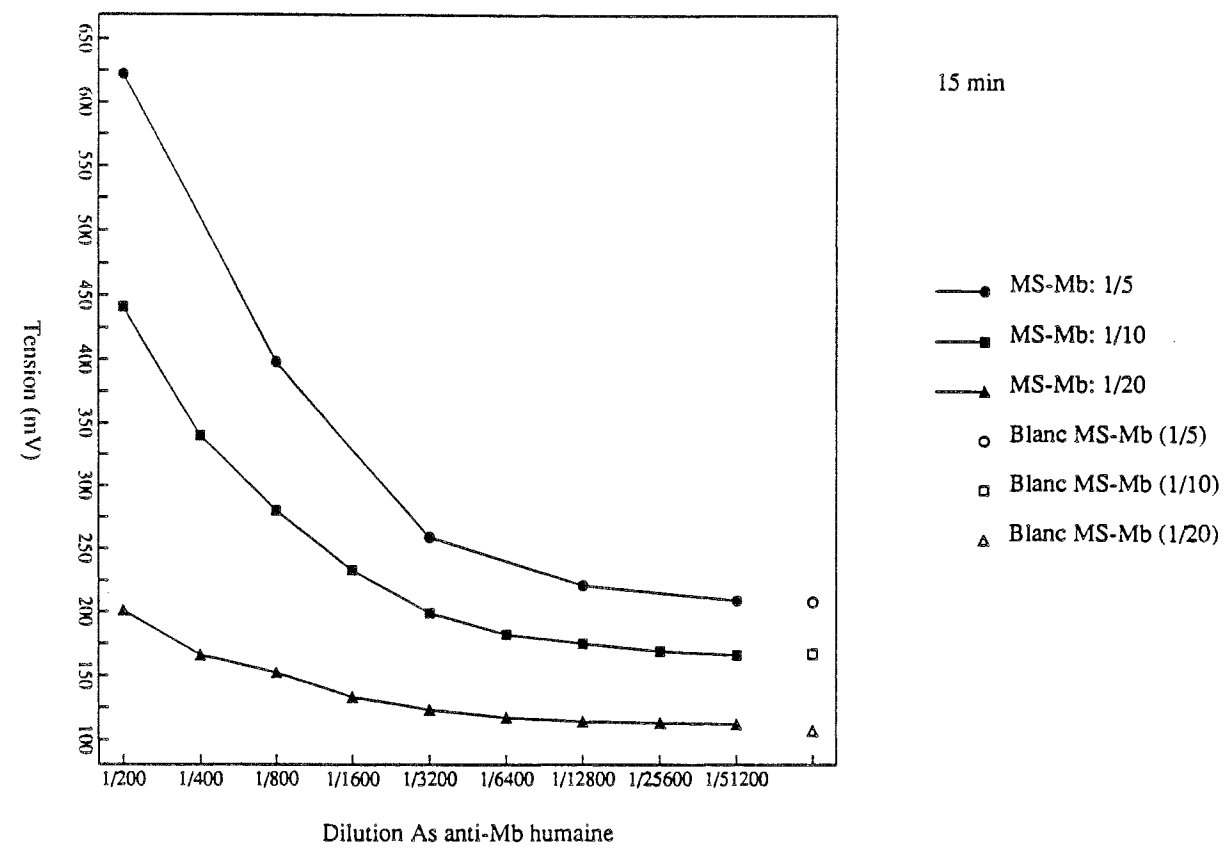
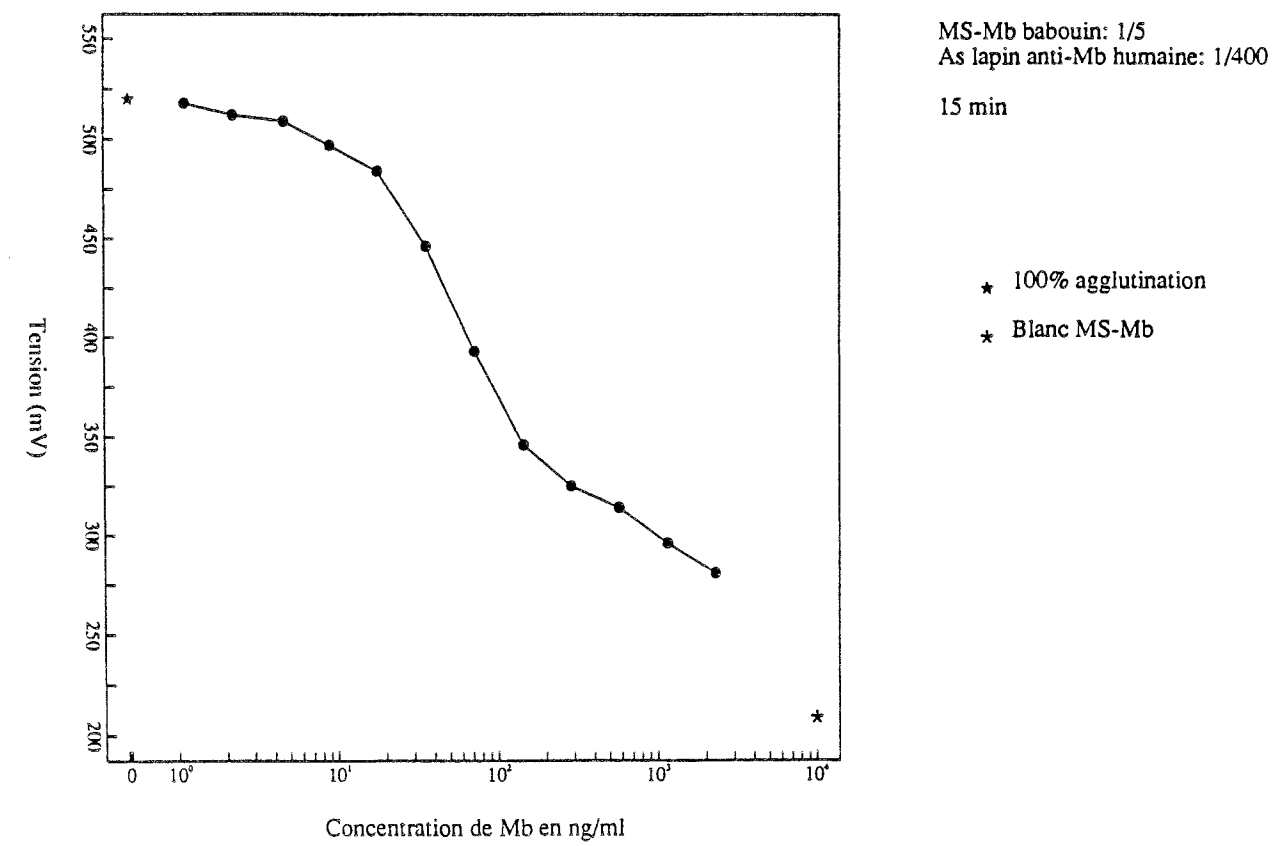


Figure 13 Inhibition de l'agglutination MS-Mb babouin/As lapin anti-Mb humaine
par la Mb humaine



- Perchlorure de fer (FeCl_3 , $6\text{H}_2\text{O}$) (Prolabo).
- Triton X100 (Merck).
- Azide de sodium NaN_3 (Merck).
- MS 16 (diamètre > 300 nm, concentration de 38.9 mg/ml).
- Albumine sérique humaine (HSA) (Sigma).

2.1.1. Préparation du dextran amino.

2.1.1.1. Fabrication.

2.1.1.1.1. Activation du dextran par le periodate de sodium.

- Solution 1: 6 g de dextran T500 de MM 500000 Da sont dissous dans l'eau distillée (16 ml).
- Solution 2: solution de periodate de sodium (NaIO_4) à 7.11 mg/ml dans l'eau distillée.

Les solutions sont mélangées de telle sorte que 20 moles de NaIO_4 soient en contact avec 1 mole de dextran; 10.67 mg de la solution de periodate sont incubés en présence de 4.6 g de la solution de dextran, pendant 1 heure sous agitation magnétique à température ambiante.

2.1.1.1.2. Couplage de diaminoheptane.

Le nombre de moles de diaminoheptane introduit est 10 fois plus élevé que celui de NaIO_4 utilisé lors de l'étape précédente d'oxydation.

Une solution à 1 g/ml dans l'eau distillée est préparée; 130 μl de cette préparation sont ajoutés à la solution de dextran, le mélange est incubé 18 heures sous agitation rotative lente à température ambiante.

2.1.1.1.3. Réduction.

Cette étape requiert l'utilisation du borohydrure de sodium (NaBH_4). Un excès de 10 moles de NaBH_4 par mole de NaIO_4 mis en oeuvre est nécessaire. 20 mg de poudre de NaBH_4 sont ajoutés sous agitation à la préparation de dextran placée dans un bain de glace fondante afin d'éviter l'échauffement de la solution; la réaction est terminée au bout de 30 min d'agitation.

2.1.1.1.4. Purification.

La solution de dextran amino est introduite dans un sac de dialyse de seuil de coupure 3500 Da. Trois dialyses de 2 h chacune à 4°C sont réalisées contre 50 volumes du tampon phosphate de sodium 0.06M pH 7.2.

2.1.1.2. Détermination de la concentration et conservation.

Pendant l'étape de dialyse, des fragments de chaînes de dextran sont susceptibles de traverser la membrane; la concentration finale de la solution de dextran amino risque de chuter.

Un dosage de dextran amino est donc effectué en fin de purification par détermination colorimétrique des oses neutres en présence de dérivé de phénol.

Dans une première étape, l'échantillon subit une hydrolyse totale afin de libérer tous les résidus de glucose de la molécule, sous l'action d'un acide concentré et à chaud:

- Préparation de dextran amino: 4 dilutions en eau distillée sont préparées: 1/50; 1/100; 1/250; 1/500.
- Préparation de la gamme d'étalonnage: solution mère de dextran T500 à 20 mg/ml à partir de laquelle on effectue 7 dilutions allant de 100 à 2000 µg/ml.

A 50 µl de chaque échantillon sont ajoutés 500 µl d'HCl 12N, les tubes sont ensuite portés dans un bain-marie bouillant pendant 5 min.

Les oses libérés vont donner naissance à des dérivés méthylés du furfural sous l'action de l'acide concentré et de la chaleur. Dans une seconde étape, ces dérivés se condensent avec l'orcinol en présence du fer, provoquant l'apparition d'une coloration brun jaune détectée à 670 nm.

La solution d'orcinol est préparée de la façon suivante:

- 100 volumes d'HCl 12N.
- 10 volumes d'orcinol à 10% en éthanol 95%.
- 1 volume de FeCl₃ à 10% en eau distillée.

Après refroidissement des tubes, 750 µl de cette solution sont introduits dans chaque échantillon, puis les tubes sont incubés au bain-marie à 60°C pendant 1 h 30 min. La lecture spectrophotométrique à 670 nm des tubes refroidis permet d'établir une droite d'étalonnage et de déterminer la concentration de la solution de dextran amino. Une moyenne des résultats obtenus en double pour chaque dilution testée fournit une concentration de dextran amino de 141.5 mg/ml.

La solution de dextran amino est aliquotée en fractions correspondant au volume nécessaire pour la préparation ultérieure de 10 ml de MS-dextran. Les aliquots sont conservés à -20°C.

2.1.2. Couplage de la solution de dextran amino aux MS.

2.1.2.1. Dialyse des MS.

Les MS sont soumises à plusieurs dialyses successives à 4°C dans le but d'éliminer l'hydroquinone et les monomères en excès. Le tampon de dialyse est identique à celui dans lequel se trouve la solution de dextran amino; il s'agit donc d'un tampon phosphate de sodium 0.06M pH 7.2, dégazé et saturé d'argon.

2.1.2.2. Couplage et réduction.

Les conditions de couplage de dextran amino sur les MS dialysées et de réduction sont les suivantes:

- Pour 1 ml de milieu de couplage:
 - . 10 mg de MS.
 - . 10 mg de dextran amino.
 - . 10 µl d'une solution de NaBH₃CN en borate 0.1M pH 10.
 - . Tampon phosphate de Na 0.06M pH 7.2 q.s.p. 1 ml.
- 10 ml de milieu de couplage étant souhaités, les réactifs sont introduits sous les volumes suivants:

- . 2.45 ml de MS 16.
- . 707 µl de dextran amino.
- . 100 µl de la solution de NaBH_3CN .
- . 6.74 ml de tampon phosphate de Na 0.06M pH 7.2.

Le mélange est incubé une nuit à T.A. sans agitation.

2.1.2.3. Purification.

L'élimination des molécules de dextran amino non fixées par les MS est effectuée par ultracentrifugation sur gradient discontinu de saccharose 20% - 80% préparé en eau distillée. Le dextran amino en excès demeure sur la solution à 20%, les MS sensibilisées se trouvent à l'interface des deux solutions de saccharose.

La vitesse et la durée de centrifugation (ultracentrifugeuse Spinco L, rotor SW 25), dictées par le diamètre des MS, sont fixées à 10000 t/min pendant 1 h 30 min.

Le saccharose résiduel est éliminé par dialyse contre du tampon phosphate de Na 0.06M. Puis la suspension est équilibrée par deux dialyses contre un tampon borate 0.01M pH 9 pour se rapprocher des conditions de couplage.

La suspension purifiée de MS-dextran est conservée à 4°C dans ce tampon jusqu'au moment de son utilisation. Lors du couplage de l'Acm, elle subira une dialyse supplémentaire contre du tampon borate 0.1M additionné de sulfate de sodium 0.25M, pH 9, milieu dans lequel le couplage de l'Acm sera effectué.

2.1.3. Couplage des Acm sur les MS-dextran.

2.1.3.1. Oxydation des MS-dextran par NaIO_4 .

Après dialyse contre le tampon borate 0.1M, sulfate de sodium 0.25M, pH 9, la suspension de MS-dextran est ajustée à une concentration de 4 mg/ml.

A 1 ml de MS-dextran à 4 mg/ml, on ajoute 20 µl d'une solution de NaIO_4 à 85 mg/ml en eau distillée.

Le mélange est incubé 2 h à T.A. sans agitation, puis dialysé contre le tampon de couplage une nuit à 4°C afin d'éliminer l'excès de NaIO_4 .

2.1.3.2. Couplage des Acm.

2.1.3.2.1. Caractéristiques des Acm.

Le centre de Recherche de la Sanofi (Montpellier) a mis à notre disposition 11 Acm, dont 10 issus de la même fusion, dirigés contre plusieurs domaines de la myoglobine humaine. Un autre Acm inclus dans cette étude, a été produit à la Faculté de Pharmacie de Montpellier.

Ces Acm, produits en ascite, ont été purifiés sur protéine A Sépharose et dialysés en tampon PBS; tous sont des immunoglobulines G de sous-classe 1.

Les concentrations et constantes d'affinités de ces Acm sont reportées dans le tableau ci-dessous.

Caractéristiques des Acm anti-Mb humaine.

Nom de l'Acm anti-Mb	Concentration (mg/ml)	Constante d'affinité K (l/mole)
F176 7E10	1.4	$1.0 \cdot 10^7$
F193 17G2	1.4	$1.1 \cdot 10^7$
F193 17E11	2.4	$2.6 \cdot 10^8$
F193 6G12	0.6	$3.2 \cdot 10^8$
F193 17A10	1.2	$9.6 \cdot 10^8$
F193 10D10	0.5	$1.0 \cdot 10^9$
F193 3A7	1.3	$1.9 \cdot 10^9$
F192 23B7	2.0	$5.0 \cdot 10^9$
F193 7B4	1.0	$7.0 \cdot 10^9$
F193 9E8	1.9	$7.4 \cdot 10^9$
F193 19A2	1.4	$8.4 \cdot 10^9$
F193 10A7	0.7	$1.5 \cdot 10^{10}$

Les Acm F193 10A7, F193 17A10 et F193 9E8 sont dirigés contre le même épitope de la molécule de myoglobine. L'Acm F193 17E11 reconnaît un autre déterminant antigénique.

2.1.3.2.2. Couplage.

Les Acm sont introduits sous une forme concentrée afin de diluer le moins possible la suspension de MS. La variation de volume due à l'ajout des Acm ne devrait pas dépasser 20% (au plus 200 µl de la solution d'Acm sont ajoutés à 1 ml de la préparation de MS-dextran).

Par ailleurs, la quantité d'Acm nécessaire pour recouvrir les MS-dextran varie selon le diamètre des MS considérées; en effet, à poids égal, des MS de faible diamètre seront en plus grand nombre et offriront une surface totale accessible plus importante que des MS de gros diamètre.

Les conditions de couplage adoptées sont généralement les suivantes:

- Pour les MS de diamètre faible, inférieur à 300 nm, une quantité de 800 µg d'Acm est requise pour 4 mg de MS.
- Pour les MS de diamètre supérieur ou égal à 300 nm, 400 µg d'Acm sont ajoutés à 4 mg de MS.

Les faibles concentrations des Acm nous orientent vers un couplage de 400 µg afin d'éviter de trop diluer les MS. Deux lots d'Acm (le F193 6G12 et le F193 10D10) seront néanmoins reconcentrés avant couplage (ultrafiltration sur Centriscart I SM 13249, Sartorius, de seuil de séparation 20000 Da). Les conditions de centrifugation des tubes d'ultrafiltration de 2000 t/min pendant 10 min sont telles que les volumes recueillis atteignent une concentration de 0.8 mg/ml.

Le protocole de couplage des Acm pour 2 ml de MS-dextran est le suivant:

- 800 µg d'Acm.
- 2 ml de MS-dextran à 4 mg/ml.
- Addition de tampon de couplage afin d'égaliser tous les volumes.

Les tubes sont incubés une nuit à 4°C sans agitation.

2.1.3.2.3. Saturations.

Deux saturations successives sont effectuées par l'addition, d'une part, d'une solution d'HSA apportant 1 mg par ml de milieu de couplage, pendant une nuit à 4°C, puis, d'autre part, d'une solution d'éthanolamine tamponnée à raison de 50 µl par ml de MS, pendant 2 h à T.A. L'ensemble des fonctions aldéhydes encore disponible est ainsi bloqué.

2.1.3.2.4. Purification.

Une ultracentrifugation sur gradient de saccharose 20% - 80% pendant 1 h 30 min et à 10000 t/min permet l'obtention du réactif final MS-Acm.

Les solutions de saccharose sont préparées en tampon borate 0.01M pH 8.5. On ajoute du triton X100 à la solution de saccharose à 20% et à la suspension de couplage pour une concentration finale de 1 g/l et l'on agite au Vortex avant le dépôt sur le gradient.

L'ajout de triton minimise les adsorptions non covalentes d'Acm libres sur les MS.

Les MS sensibilisées recueillies à l'interface des deux solutions de saccharose sont conservées à 4°C après addition d'azide de sodium à 2 pour mille.

Les contrôles néphélométriques effectués à chaque phase du couplage ne détectent pas de variations des signaux. Les MS ne sont donc pas déstabilisées au cours de cette opération.

2.2. Réactivité des MS-Acm.

Le modèle le plus simple à mettre en oeuvre pour détecter la myoglobine par le biais de MS-Acm serait une réaction directe entre ces deux partenaires. La myoglobine interviendrait en tant qu'agent agglutinant des MS-Acm. Mais le caractère monoclonal de l'Ac fixé sur la MS limite ce genre de dosage au seul cas où l'épitope reconnu est répétitif.

Les MS-Acm ont donc été étudiées dans un système d'immunocapture, la myoglobine étant prise en sandwich entre les MS-Acm et les Ac de l'As Dako.

2.2.1. Système MS-Acm / Mb / As polyclonal.

Le principe de cette réaction repose sur la prise en sandwich de la myoglobine entre l'Acm et les Ac polyclonaux (As Dako de lapin anti-Mb humaine) reconnaissant d'autres épitopes que l'Acm.

Dans un premier temps les dilutions de myoglobine sont incubées en présence des MS-Acm, aboutissant en quelque sorte à la formation de MS-Acm-myoglobine. L'addition du second Ac provoquera ensuite l'agglutination des MS-Acm-Mb.

2.2.1.1. Réaction en tampon de néphélométrie à pH 8.2.

L'ensemble des prédilutions et mises en réaction s'effectue par l'intermédiaire du module III du LN Behring, et en tampon de néphélométrie.

Le schéma réactionnel est décomposé comme suit, les dilutions indiquées correspondant aux dilutions finales:

- Dans une première étape, les dilutions de myoglobine, de 3 ng/ml à 192 ng/ml, sont ajoutées aux différentes suspensions de MS-Acm. Les dilutions fixées pour chaque lot de MS sont telles qu'elles génèrent un signal de 50 mV. Les cuves sont incubées 30 min à T.A.

- Dans la deuxième étape, l'As polyclonal (Dako) est additionné au 1/600. La lecture des cuves au néphélémètre intervient après 30 min de mise en réaction.

Les tracés des figures 14a et 14b illustrent les différences de comportements des lots de MS testés. Les signaux néphélémétriques d'agglutination sont d'autant plus élevés que la quantité de myoglobine mise en jeu est importante, dans les limites de concentration du test.

Certains lots de MS montrent un tracé plat, situé au niveau du blanc MS. Trois lots seulement (MS-F193 17A10, MS-F193 3A7, MS-F193 7B4) se démarquent mais les seuils de détection d'environ 25 ng/ml sont élevés.

Ce système fonctionne mais il est nécessaire d'en accroître la sensibilité; un allongement du temps d'incubation de la première étape, ainsi qu'une augmentation de la concentration de l'As contribueraient à l'amélioration des résultats des lots réactifs. Mais un accroissement du temps d'incubation n'est pas souhaitable dans l'optique de notre travail. Nous avons donc cherché à accélérer la cinétique en modifiant la composition du milieu de réaction.

2.2.1.2. Réaction en tampon pH 8.2 dont le PEG est remplacé par du dextran sulfate.

Le PEG à 3% contenu dans le tampon de réaction est remplacé par du dextran sulfate de MM 500000 Da (Pharmacia). On sait en effet que des polysaccharides de MM variées ont pour effet d'augmenter la sensibilité de détection des complexes immuns car, comme le PEG, ils en facilitent la précipitation (119).

Dans notre cas, ce produit est destiné à limiter la stabilité des MS, donc à en faciliter l'agglutination et à obtenir plus rapidement un signal néphélémétrique significatif.

2.2.1.2.1. Recherche du pourcentage optimal de dextran sulfate pour chaque lot.

L'ajout de dextran sulfate dans le milieu réactionnel doit être parfaitement contrôlé afin que le signal reste spécifique de la réaction MS-Acm / myoglobine. Pour chaque lot de MS-Acm, il faut déterminer, dans une étude préliminaire, la concentration qui commence à en déstabiliser la suspension. Nous nous guiderons sur le comportement du blanc MS en présence de pourcentages variables en dextran sulfate pour fixer les pourcentages à utiliser.

Pratiquement, deux tampons sont préparés:

- Tampon 1: tampon de néphélémétrie mais sans PEG et sans dextran sulfate.
- Tampon 2: tampon de néphélémétrie sans PEG, dextran sulfate à 3% (poids / volume).

Une dilution fixe de la suspension de MS dans le premier tampon est mise à réagir en présence de proportions croissantes du tampon 2. Le pourcentage de dextran augmente ainsi de 0.05% entre chaque cuve de MS, le pourcentage maximal testé atteignant 2.2%.

Des courbes de déstabilisation des MS-Acm en fonction de la concentration de dextran sulfate sont enregistrées. Le pourcentage de dextran sulfate retenu pour chaque lot de MS est tel qu'il ne provoque qu'une légère hausse du blanc MS de 15 mV en 2 h d'incubation. On peut espérer dans ces conditions augmenter la cinétique de réaction sans masquer la réaction immunologique par un phénomène non spécifique.

Nous avons sélectionné les lots de MS-Acm nécessitant moins de 2% de dextran sulfate, qui sont les plus faciles à amener en limite de stabilité. Le tableau ci-dessous résume les pourcentages déterminés pour chacun de ces lots:

Figure 14a Sandwich MS-Acm/Mb humaine/As lapin anti-Mb humaine - Comparaison des lots de MS-Acm - Réaction en tampon de néphélémétrie

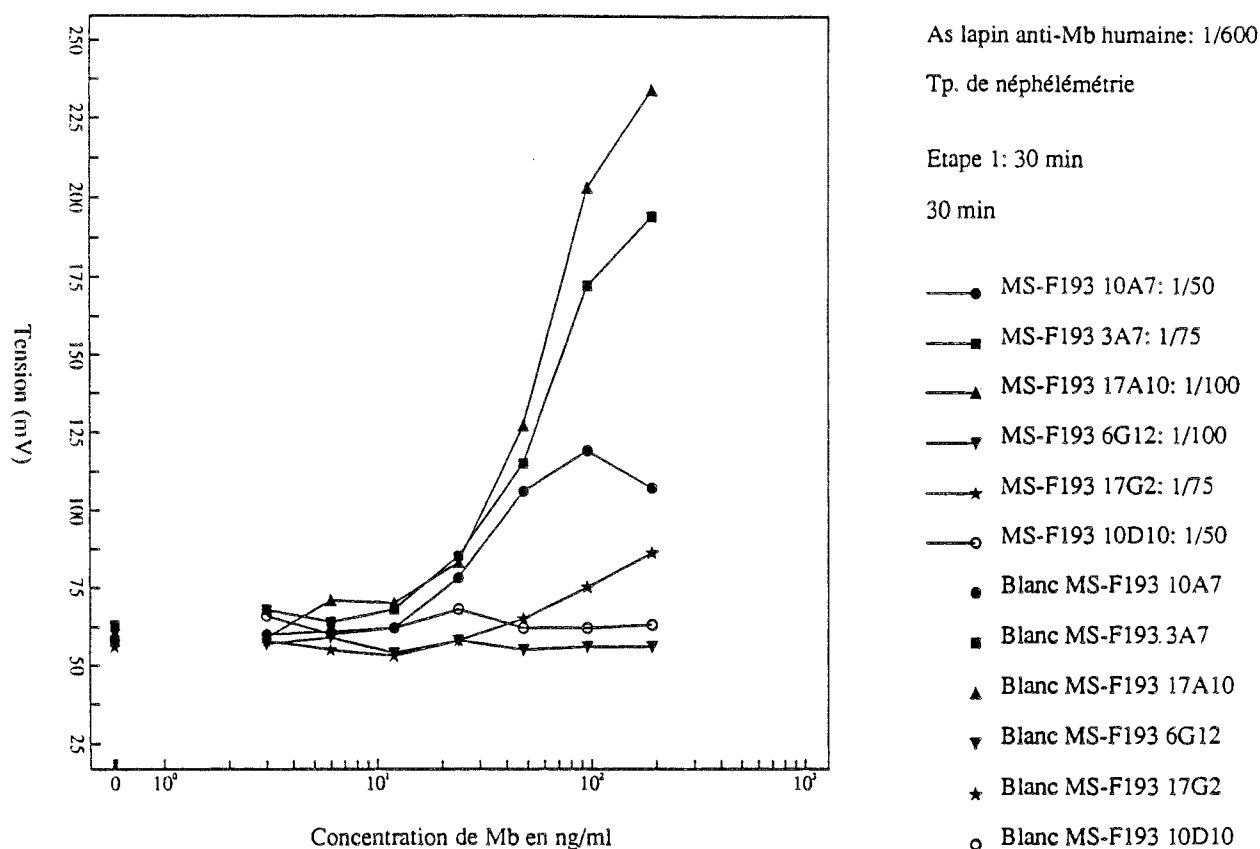
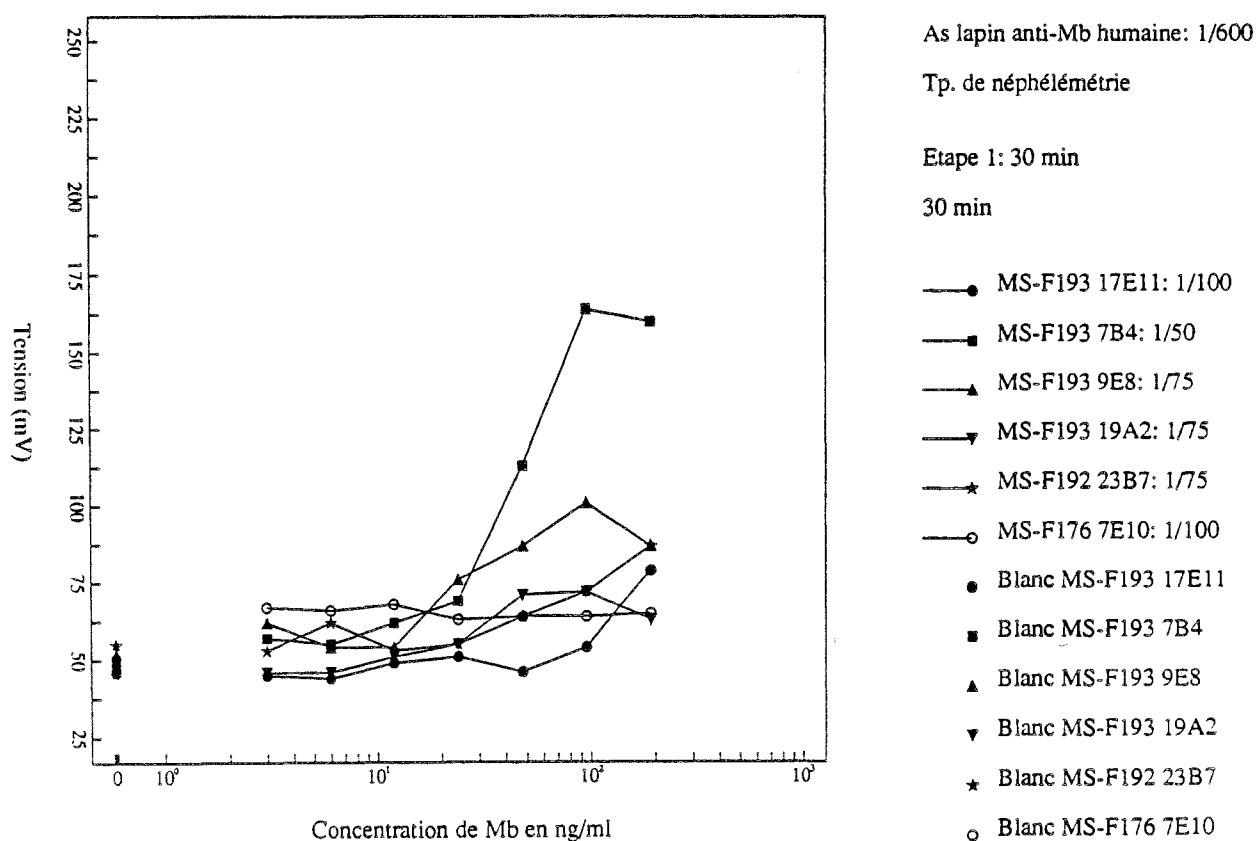


Figure 14b Sandwich MS-Acm/Mb humaine/As lapin anti-Mb humaine - Comparaison des lots de MS-Acm - Réaction en tampon de néphélémétrie



Pourcentages de dextran sulfate requis.

Nom de l'Acm anti-Mb	Pourcentage de dextran sulfate
F193 17E11	1.55
F193 6G12	1.95
F193 17A10	1.85
F193 10D10	1.95
F193 3A7	1.85
F193 7B4	1.95
F193 9E8	1.95
F193 10A7	1.95

2.2.1.2.2. Réaction.

La mise en réaction s'effectue dans les mêmes conditions de dilutions qu'en tampon standard de néphélémétrie:

- La première phase met en présence la série de dilutions de myoglobine incubées en présence des MS-Acm pendant 30 min dans le tampon 1, donc dans un milieu dépourvu de dextran sulfate.
- Dans la deuxième étape, l'As prédilué en tampon 1 est ajouté. Un volume de tampon 2 est ajouté, tel que la concentration finale de dextran sulfate soit celle fixée pour chaque lot de MS-Acm.

Les profils d'agglutination (figures 15a et 15b) permettent de comparer le comportement des différents lots de MS. Le lot de MS-F193 10A7 semble largement plus performant que les autres, suivi par les MS-F193 7B4, les MS-F193 17A10 et les MS-F193 3A7.

La comparaison de ces courbes avec celles des figures 14a et 14b, obtenues en tampon standard de néphélémétrie, montre que les lots de MS les plus performants sont retrouvés dans les deux systèmes. Nous constatons de plus que:

- Tous les profils obtenus en dextran sulfate sont extrêmement pentus jusque 25 ng/ml de myoglobine pour les 4 meilleurs lots de MS. Puis les signaux se stabilisent, malgré la hausse de concentration de myoglobine. Cette zone d'équivalence s'étale sur une gamme de concentrations large; aucune baisse importante des signaux n'est ensuite décelée, les concentrations de myoglobine n'étant probablement pas assez importantes pour que l'excès d'Ag soit atteint. En outre, l'ensemble des courbes en dextran sulfate est décalé vers les faibles concentrations de myoglobine.
- Comparaison des seuils de détection des lots les plus performants: proche de 30 ng/ml en tampon classique, il avoisine 5 ng/ml en dextran sulfate. Le point situé à 30 ng/ml correspond en tampon additionné de dextran sulfate au sommet des courbes.

L'avantage essentiel de l'apport de dextran sulfate dans le tampon de réaction réside dans le gain de sensibilité du seuil de détection (ce dernier est 5 fois plus faible).

Le handicap majeur, excluant l'utilisation ultérieure de dextran sulfate pour un dosage en milieu sérique, provient de l'étroitesse de la gamme de concentrations de myoglobine, s'échelonnant de 5 ng/ml à 25 ng/ml. Le seuil de détection bas autoriserait certes d'introduire un sérum dilué au 1/20; mais le domaine de concentrations susceptible d'être détecté s'étalerait de 100 ng/ml à seulement 500 ng/ml; au delà de cette valeur, la validité des résultats serait douteuse compte tenu de l'imprécision due au signal en plateau.

Figure 15a Sandwich MS-Acm/Mb humaine/As lapin anti-Mb humaine - Comparaison des lots de MS-Acm - Réaction en Tp. de néphélémétrie additionné de dextran sulfate

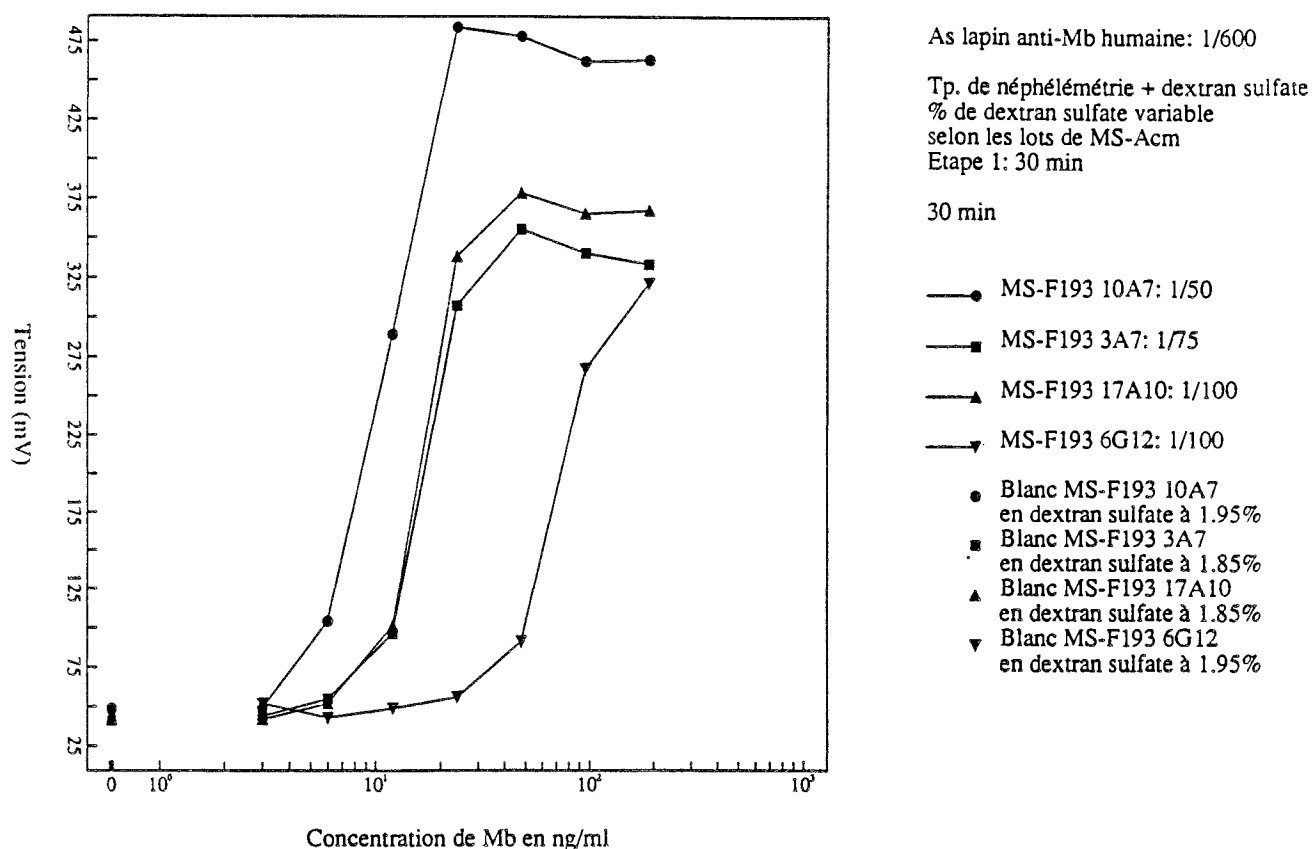
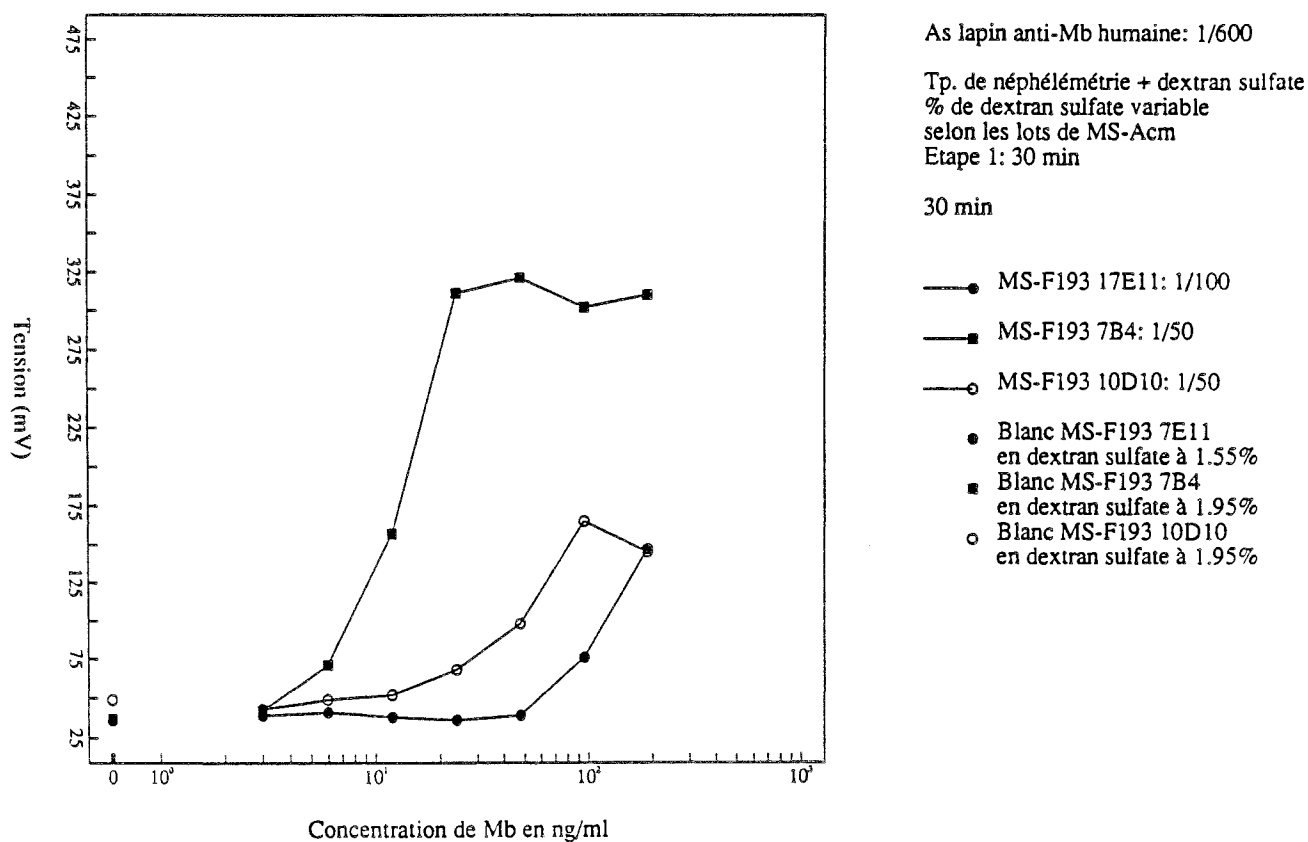


Figure 15b Sandwich MS-Acm/Mb humaine/As lapin anti-Mb humaine - Comparaison des lots de MS-Acm - Réaction en Tp. de néphélémétrie additionné de dextran sulfate



L'amplification physico-chimique de ce modèle réactionnel par addition de dextran sulfate a cependant montré qu'une nette amélioration de la sensibilité pouvait être obtenue. Nous avons tenté d'élaborer un système d'amplification immunologique de la réaction, développé dans le paragraphe suivant.

2.2.2. Système MS-Acm / Mb / As de lapin (Dako) anti-Mb humaine / As de chèvre anti-Ig de lapin.

2.2.2.1. Principe.

Ce modèle met en présence 3 populations d'Ac intervenant séquentiellement: les deux premières catégories d'Ac, les Acm fixés aux MS et les Ac polyclonaux de lapin anti-myoglobine humaine, participent en présence de myoglobine libre à la formation du sandwich précédemment étudié (MS-Acm-Mb-Ac de l'As).

L'addition d'un troisième As polyclonal de chèvre, dont les Ac sont dirigés contre les Ig de lapin (As de chèvre anti-Ig de lapin), provoque une précipitation en milieu liquide de l'As de lapin anti-myoglobine par une réaction de type espèce / anti-espèce, entraînant les complexes MS-Acm-Mb-As formés.

L'originalité de ce modèle provient du fait que les MS participent à la formation de la réaction en tant que support permettant de révéler un signal détectable au néphélémètre. Les conditions d'expérimentation sont telles que la réaction repose sur une précipitation Ag/Ac avec entraînement des MS proportionnel à la quantité de myoglobine présente.

2.2.2.2. Réaction.

La mise en réaction se faisant en trois phases, il nous fallait déterminer l'influence des temps d'incubation sur chaque étape. Ce travail a été mené sur un des lots de MS-Acm.

De plus, une étude préliminaire du système As de lapin anti-Mb / As de chèvre anti-Ig de lapin en milieu liquide et en présence des MS-Acm permettra d'établir les dilutions et les conditions de travail.

Réactifs:

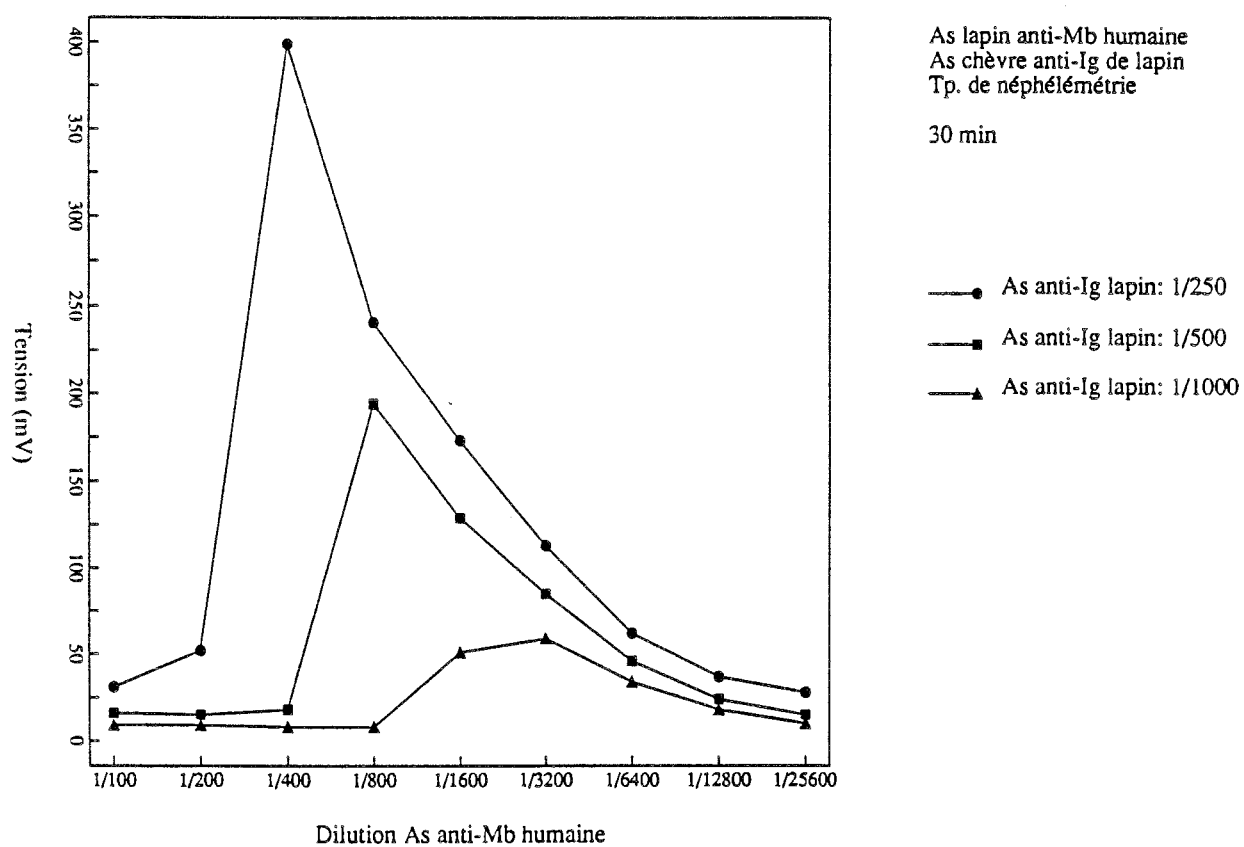
- MS-Acm.
- Antisérums de lapin anti-myoglobine humaine (Dako).
- Antisérums de chèvre anti-immunoglobulines (H + L) de lapin à 19 mg/ml, lot n° LA 05 DGS (Diagnostics Pasteur).
- Myoglobine humaine (Dako) à 4.63 mg/ml.
- Tampon de néphélémétrie pH 8.2.

2.2.2.2.1. Etude du système espèce / anti-espèce.

Des dilutions croissantes de l'As de lapin anti-Mb, du 1/100 au 1/25600 final sont mises en présence de 3 dilutions de l'As de chèvre anti-Ig de lapin (1/250, 1/500, 1/1000) en tampon de néphélémétrie. Le signal néphélémétrique dû à la réaction de précipitation Ag/Ac en phase liquide est lu après 30 min d'incubation.

Les courbes de précipitation de la figure 16 mettent en évidence un déplacement proportionnel de la zone d'équivalence lorsque les dilutions de l'As de lapin anti-Mb augmentent. La dilution au 1/1000 de l'As de chèvre ne permet pas de déceler de delta I important; celle au 1/250 semble par contre trop faible.

Figure 16 Précipitation As lapin anti-Mb humaine/As chèvre anti-Ig de lapin en milieu liquide



Nous retiendrons la dilution au 1/500 de l'As de chèvre anti-Ig de lapin qui provoque la formation d'un réseau de taille maximale pour une dilution de l'As de lapin anti-Mb autour du 1/800.

2.2.2.2.2. Stabilité des MS-Acm en présence des deux As.

Les blancs MS-Acm sont systématiquement testés vis à vis des deux As dans le but de contrôler leur stabilité.

Les MS-F176 7E10 dont le blanc est de 60 mV sont additionnées soit de l'As de lapin anti-Mb au 1/800, soit de l'As de chèvre anti-Ig de lapin au 1/500, qui sont les dilutions fixées précédemment. Le tableau ci-dessous présente les résultats néphélométriques obtenus:

Valeurs des signaux des MS-Acm en présence des deux As.

	Blanc MS	MS + As de lapin 1/800	MS + As de chèvre 1/500
Signal (mV) à 30 min	62	64	192
Signal (mV) à 1 h	61	62	276

Les MS-Acm présentent des comportements différents selon l'As présent; additionnées de l'As de lapin anti-Mb, les MS ne montrent aucune déstabilisation. En revanche l'As de chèvre anti-Ig de lapin provoque une agglutination non spécifique des MS.

Nous verrons dans la prochaine partie que ce phénomène de déstabilisation non spécifique du blanc MS est constaté également lorsque des sérums concentrés sont introduits dans le milieu réactionnel. Ce problème a été éliminé en procédant à ce que nous nommerons un "traitement" préalable des sérums.

Ce traitement est décrit en détail dans la partie suivante (cf. Ch.I.2.1.2.). Il permet d'éliminer des constituants sériques intervenant dans la déstabilisation des MS. A la suite de ce traitement le signal des MS en présence de l'As de chèvre anti-Ig de lapin n'est plus que de 80 mV en 1 h; la stabilisation n'est cependant pas totale, il subsiste une très légère agglutination. Par ailleurs, cette opération n'entraîne aucune perte d'Ac anti-Ig de lapin. En effet, l'amplitude des signaux et la zone d'équivalence de la courbe de précipitation de l'As de lapin par l'As de chèvre anti-Ig de lapin traité sont identiques à ceux enregistrés figure 16 avec un As non traité.

Pour la suite du travail, l'As de chèvre anti-Ig de lapin sera systématiquement traité au 1/25 par des MS-Ethanolamine (MS-Eth) pour éliminer l'agglutination non spécifique des MS.

2.2.2.2.3. Etude des temps d'incubation.

Le modèle implique une mise en réaction en trois phases:

- 1^{ère} étape: mélange des MS-Acm et de la myoglobine.
- 2^{ième} étape: addition de l'As de lapin anti-Mb (au 1/600, dilution finale au 1/800).
- 3^{ième} étape: ajout de l'As de chèvre anti-Ig de lapin traité (au 1/20, dilution finale au 1/500).

L'optimisation des conditions expérimentales a été menée sur le lot de MS-F176 7E10, pour lequel le sandwich MS-Acm / Mb / As ne permettait pas de détecter de réaction.

2.2.2.2.3.1. Temps d'incubation de la première étape.

Après mélange, les MS-Acm et les dilutions de myoglobine humaine sont incubées à T.A. pendant des temps de 3 min 45 (temps minimum compatible avec le préparateur utilisé), 30 min, 1 h, 1 h 30 min, et 2 h. Après addition de l'As de lapin anti-Mb, les cuves sont incubées pendant une durée fixe de 1 h. Les signaux sont lus 30 min après ajout de l'As de chèvre anti-Ig de lapin traité.

La figure 17 illustre les résultats obtenus après 3 min 45 d'incubation, les tracés d'agglutination correspondant aux différents temps étant tous superposables. Elle conduit à formuler deux remarques:

- Dans nos conditions de manipulation, le sandwich simple MS-F176 7E10 / Mb/ As de lapin sans amplification ne produit aucun signal. L'addition de l'As de chèvre anti-Ig de lapin traité révèle et amplifie la réaction. Le sandwich a donc bien lieu, mais les concentrations de myoglobine, d'As de lapin anti-Mb et de MS sont telles qu'elles ne permettent pas de le mettre en évidence sans l'adjonction de l'As de chèvre anti-Ig de lapin traité. 10 ng/ml de myoglobine sont détectés dans la cuve.
- La durée d'incubation n'a aucune incidence sur les résultats; l'addition de l'As de lapin 3 min 45 après la mise en réaction des MS-Acm et de la Mb ne semble donc pas perturber la fixation de la Mb aux MS. Les Ac présents dans l'As de lapin anti-Mb ne gênent et n'empêchent pas la réaction de s'effectuer. Malgré la faible affinité de l'Acm immobilisé sur la MS, celui-ci possède probablement une vitesse de fixation à la myoglobine supérieure à celle des Ac polyclonaux constitutifs de l'As.

Le même système est testé en mélangeant dans un premier temps les MS-Acm et l'As de lapin anti-Mb Dako; la série de dilutions de myoglobine est ajoutée après 3 min 45. La figure 17 permet de comparer les comportements d'agglutination des deux systèmes. L'identité des tracés confirme que la présence de l'As de lapin ne modifie pas la reconnaissance de la myoglobine par les Acm fixés aux MS.

En conclusion, il apparaît que les trois réactifs MS-Acm, myoglobine en dilutions et As de lapin anti-Mb peuvent être lancés en réaction simultanément. Nous allons maintenant étudier l'incidence du temps de contact de ces trois partenaires avant l'addition de l'As anti-Ig de lapin.

2.2.2.2.3.2. Temps d'incubation de la deuxième étape.

La mise en réaction des MS-Acm et des dilutions de myoglobine est immédiatement suivie de l'addition de l'As de lapin. Le mélange est incubé à T.A. pendant des périodes de 3 min 45 s, 30 min, 1 h, 1 h 30 min ou 2 h avant la révélation par l'As de chèvre anti-Ig de lapin traité.

Les courbes d'agglutination obtenues à ces différents temps sont représentées sur la figure 18. Au fur et à mesure de l'allongement des temps d'incubation, les pentes des tracés se déplacent vers les faibles concentrations de myoglobine et deviennent de plus en plus fortes puisque le delta I augmente. Le gain de sensibilité est particulièrement important entre les temps 3 min 45 et 1 h; au delà de 1 h, les tracés ont tendance à se rapprocher.

Une phase d'incubation semble donc indispensable, durant laquelle le sandwich se constitue. Plus le temps de contact croît, plus nombreux seront les Ac susceptibles de se lier à

Figure 17 Sandwich MS-Acm/Mb humaine/As lapin anti-Mb humaine/As chèvre anti-Ig lapin - Influence de l'ordre d'introduction des réactifs

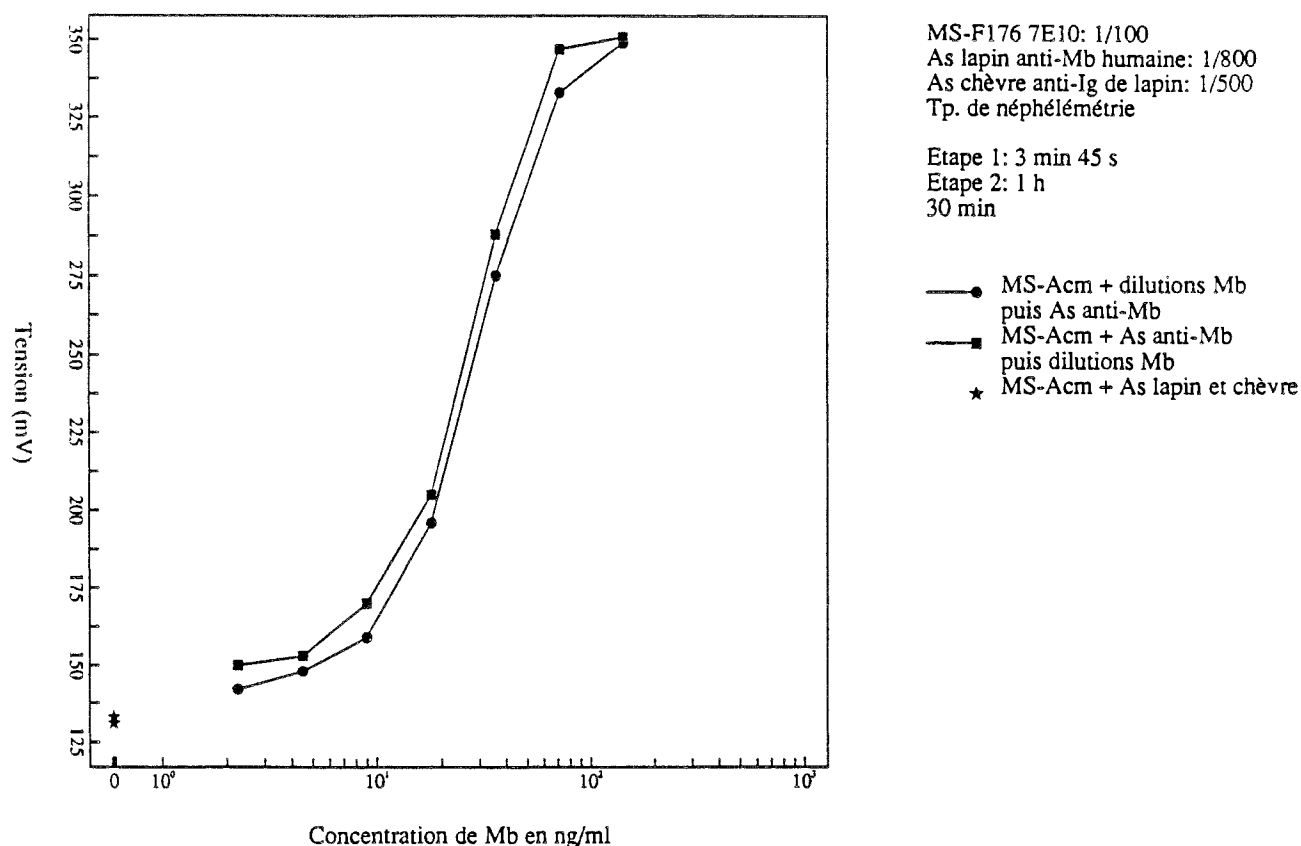
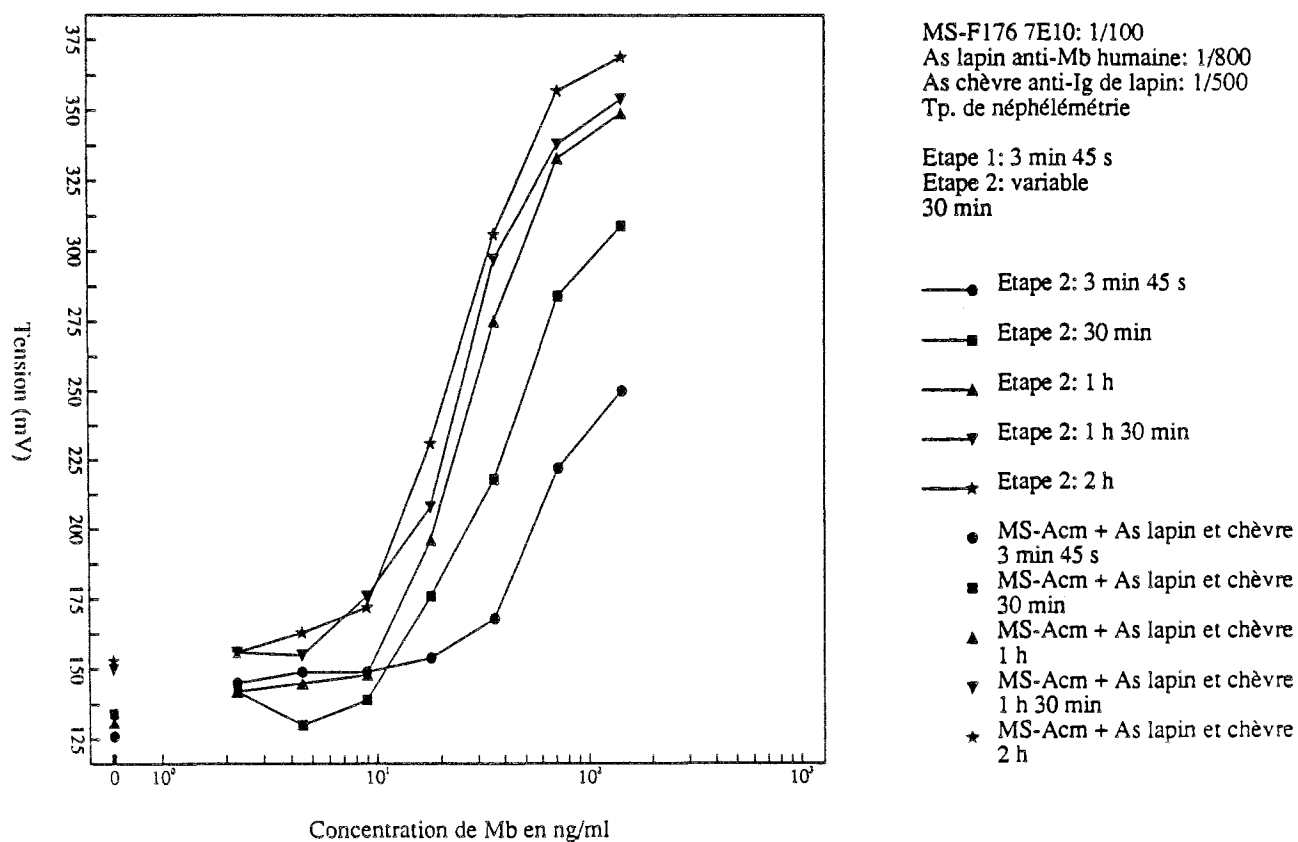


Figure 18 Sandwich MS-Acm/Mb humaine/As lapin anti-Mb humaine/As chèvre anti-Ig lapin - Influence du temps d'incubation de la deuxième étape



la myoglobine. La fixation optimale semble obtenue en 1 h, tous les épitopes accessibles de la myoglobine sont alors occupés. Une incubation supérieure à 1 h n'améliore plus notablement la sensibilité.

En conclusion, ce modèle de réaction sandwich amplifié, dont les paramètres opérationnels ont été optimisés pour un lot particulier de MS, semble exploitable; il permet de détecter 10 ng/ml de myoglobine avec un lot de MS dont l'Acm possède un coefficient d'affinité faible.

2.2.2.2.4. Comparaison des différents lots de MS-Acm.

Les lots de MS-Acm étudiés au paragraphe 2.2.1.1. fonctionnaient en sandwich mais les meilleurs seuils de détection avoisinaient 30 ng/ml de myoglobine. Ce modèle d'amplification par l'As de chèvre anti-Ig de lapin traité est testé sur tous les lots afin d'une part de tenter de diminuer ce seuil de détection et d'autre part de sélectionner le lot de MS-Acm qui sera utilisé pour le dosage en milieu sérique.

2.2.2.2.4.1. Réaction en tampon de néphélométrie pH 8.2.

Les conditions opératoires et les dilutions finales des réactifs sont les suivantes:

- Les MS-Acm, ajustées à un blanc de 50 mV, sont mises en présence de la série de dilutions de myoglobine de 1.125 ng/ml à 72 ng/ml. La manipulation est menée en deux fois en raison du nombre élevé de lots de MS-Acm à analyser. Le passage de tous les racks sur le préparateur automatique d'échantillons requiert une durée de 20 min. Un temps de 30 min est donc fixé pour la première étape et ce dans les deux expériences.
- L'addition de l'As de lapin anti-Mb au 1/800 dans toutes les cuves est suivie d'une incubation d'une 1 h à T.A.
- La dilution au 1/500 de l'As de chèvre anti-Ig de lapin est distribuée dans les cuves.
- Les signaux néphélométriques sont lus après 30 min.

Les figures 19a et 19b montrent les courbes d'agglutination données par chaque lot de MS-Acm. En comparant les différents profils on constate que:

- Les courbes diffèrent nettement selon l'Acm immobilisé sur les MS. Les lots les plus sensibles sont les MS-F193 9E8, les MS-F193 10A7 et les MS-F193 17 A10. Leurs Acm possèdent des affinités différentes mais ils reconnaissent tous trois le même épitope de la myoglobine. Cet épitope semble rester accessible en présence de l'As de lapin anti-Mb.
- Avec les meilleurs lots de MS, ce modèle permet de détecter moins de 2 ng/ml de myoglobine, soit 12 fois moins que dans le système non amplifié.

Connaissant les coefficients d'affinité de chacun des Acm, nous avons recherché si les résultats néphélométriques leur étaient corrélés. Le signal obtenu pour une concentration de 8.98 ng/ml de myoglobine est corrigé pour le blanc MS du lot considéré. Le coefficient de corrélation calculé sur ces valeurs s'élève à 0.75 ($p < 0.01$). Il existe donc un lien entre l'amplitude des signaux et l'affinité des Acm couplés.

Figure 19a Sandwich MS-Acm/Mb humaine/As lapin anti-Mb humaine/As chèvre anti-Ig lapin - Comparaison des différents lots de MS-Acm en Tp. de néphélémétrie

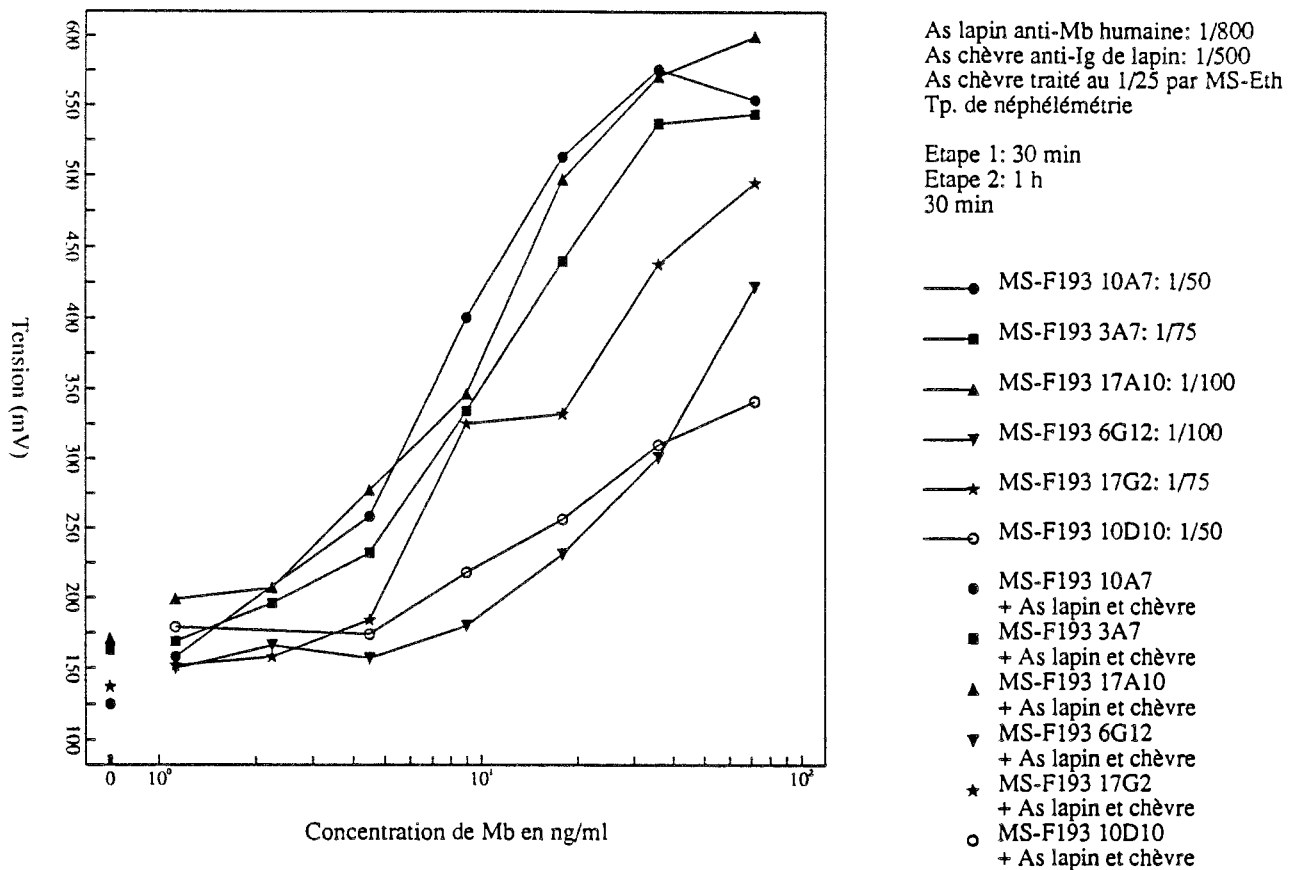
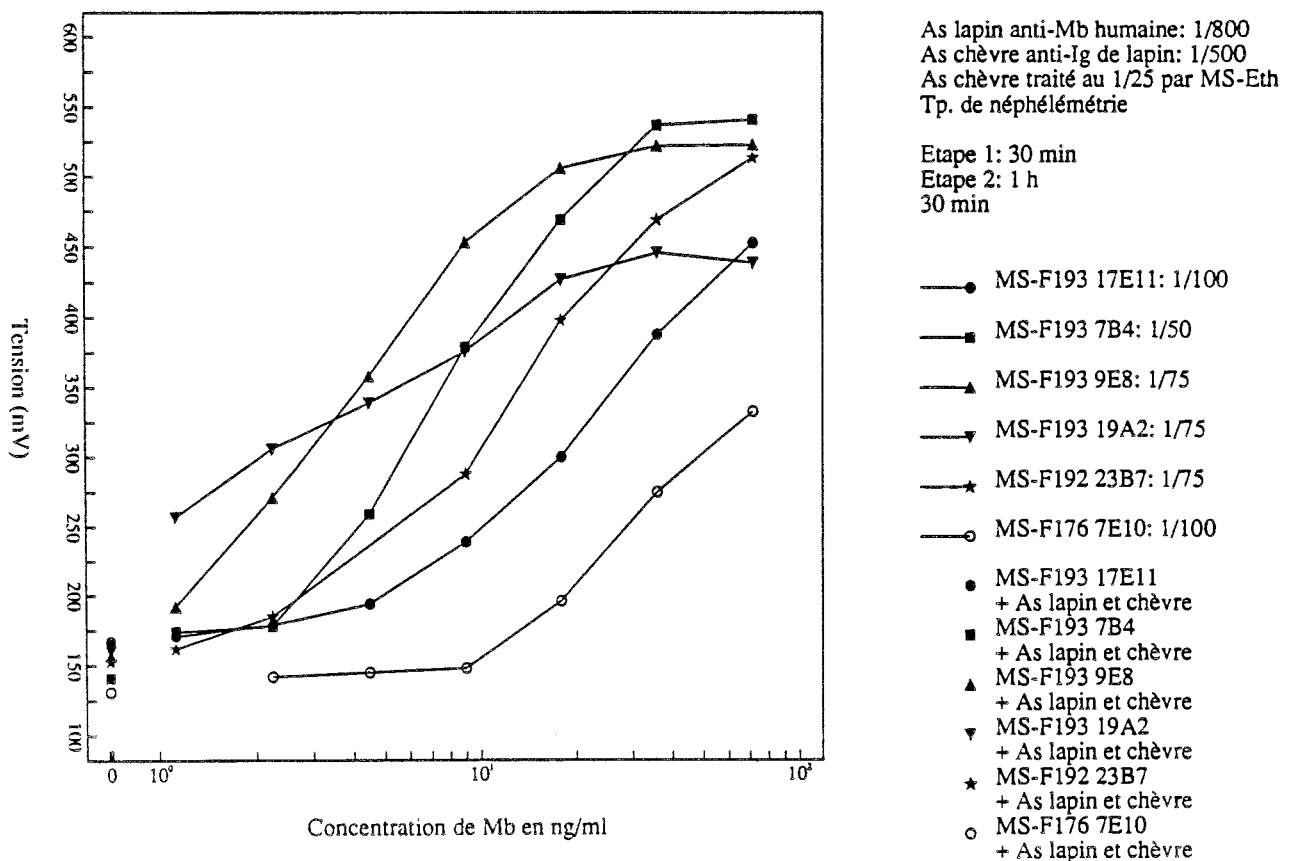


Figure 19b Sandwich MS-Acm/Mb humaine/As lapin anti-Mb humaine/As chèvre anti-Ig lapin - Comparaison des différents lots de MS-Acm en Tp. de néphélémétrie



2.2.2.2.4.2. Réaction en tampon pH 8.2 dont le PEG est remplacé par du dextran sulfate.

Les MS-Acm fournissant les meilleurs seuils de détection, MS-F193 10A7 et MS-F193 9E8, ont été retenues pour cette étude où les deux agents amplificateurs sont mis en présence, l'un chimique (le dextran sulfate), l'autre immunologique (As de chèvre anti-Ig de lapin). Nous avons établi précédemment que ces deux lots de MS sont en limite de stabilité pour 1.95% de dextran sulfate.

La mise en réaction des différents partenaires est effectuée de la façon suivante:

- Les dilutions de myoglobine de 0.56 ng/ml à 71.9 ng/ml sont incubées 30 min en présence des MS-Acm dans le tampon 1, donc sans dextran sulfate.
- L'As de lapin anti-Mb est ajouté au 1/800 en tampon 1.
- Après une heure d'incubation, l'As de chèvre anti-Ig de lapin est apporté au 1/500 ainsi que le tampon 2, renfermant du dextran sulfate en concentration telle que le milieu final en contienne 1.95%.

Les résultats obtenus après 30 min de réaction sont reportés sur la figure 20. Le profil donné par le lot MS-F193 10A7 montre un accroissement marqué des signaux de 0.56 à 10 ng/ml; les points suivants n'évoluent plus bien que la concentration de myoglobine continue à augmenter dans le milieu. Les MS-F193 9E8 fournissent également des signaux élevés, quoique plus faibles que ceux de l'autre lot. Nous constatons par ailleurs que le seuil de détection est encore amélioré, il est inférieur à 1 ng/ml.

En conclusion, l'étude de ces systèmes de sandwich, amplifiés chimiquement ou immunologiquement, fait apparaître un gain de sensibilité considérable apporté par l'amplification du signal. Cet avantage ressort nettement de l'examen de la figure 21 où sont comparés les comportements d'un même lot de MS (les MS-F193 10A7) dans tous les systèmes envisagés.

L'apport d'un amplificateur immunologique dans le système sandwich a pour conséquence de faire passer le seuil de détection de 25 à moins de 2 ng/ml. Le dextran sulfate seul apparaît moins efficace, il abaisse ce seuil à 5 ng/ml. L'addition simultanée des deux agents d'amplification permet de décaler encore la courbe vers les faibles concentrations de myoglobine, si bien que moins de 1 ng/ml est détecté dans la cuve.

Nous sélectionnerons le système sandwich à amplification immunologique pour le passage en milieu sérique, en raison de son seuil de détection bas (inférieur à 2 ng/ml) et de la large gamme de concentrations de myoglobine accessibles au dosage. Le seuil pathologique de la myoglobinémie étant situé autour de 100 ng/ml, la sensibilité de ce système autoriserait le dosage de myoglobine sur un sérum dilué au 1/50. En outre, la plage des concentrations sériques dosables s'étend de moins de 100 ng/ml à plus de 1800 ng/ml, ce qui permet de détecter la majorité des variations pathologiques.

3. Conclusion.

Le système d'inhibition de l'agglutination, certes rapide dans sa mise en oeuvre, a une sensibilité de détection de 10 ng/ml de myoglobine dans le milieu de réaction, ce qui implique que le sérum à doser devra être utilisé relativement concentré (dilution au 1/10). Par contre, le modèle de sandwich amplifié offre la possibilité d'envisager le dosage sur un sérum 5 fois plus dilué (1/50), ce qui limitera les problèmes liés aux interférences éventuelles du milieu sérique; il présente cependant l'inconvénient d'être plus lent dans son exécution, la formation du sandwich nécessitant une certaine durée d'incubation.

Figure 20 Sandwich MS-Acm/Mb humaine/As lapin anti-Mb humaine/As chèvre anti-Ig lapin - Réaction en tampon de néphélémétrie additionné de dextran sulfate

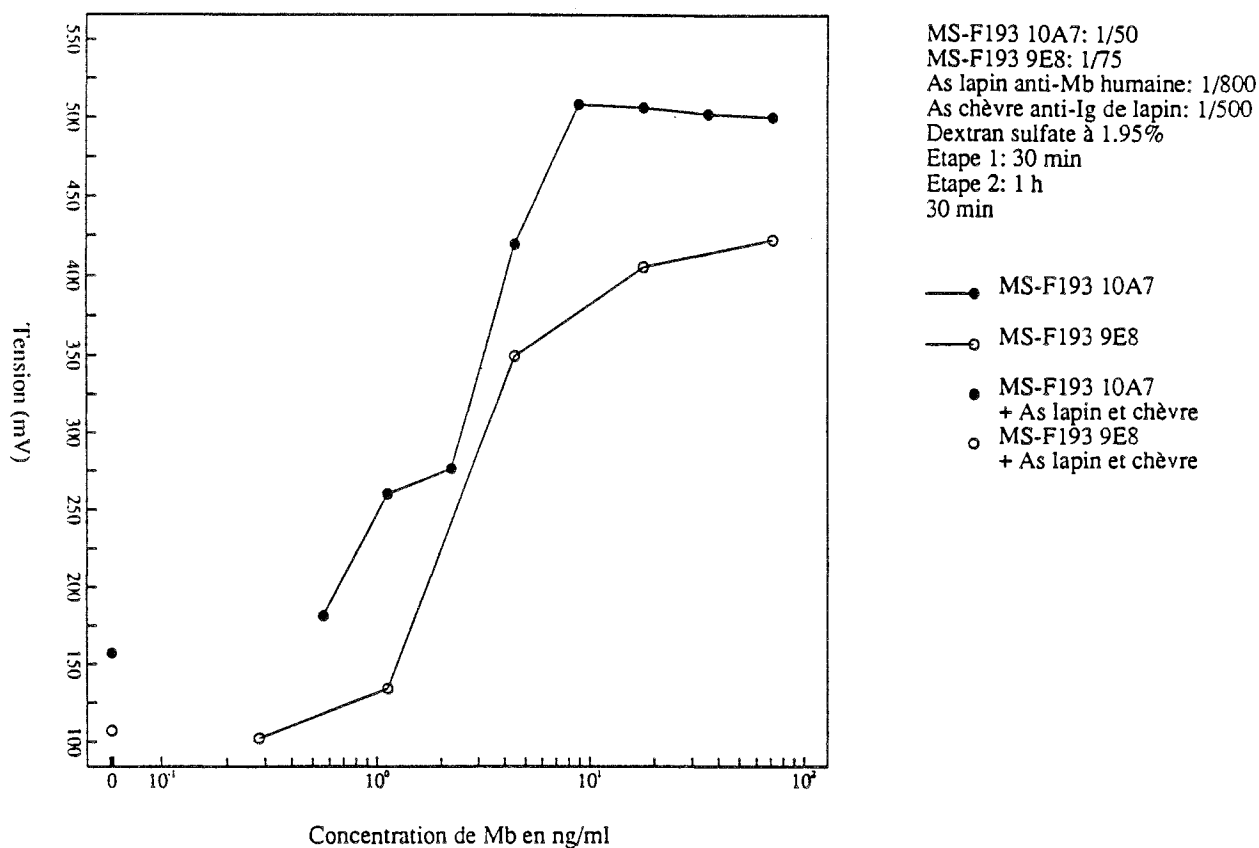
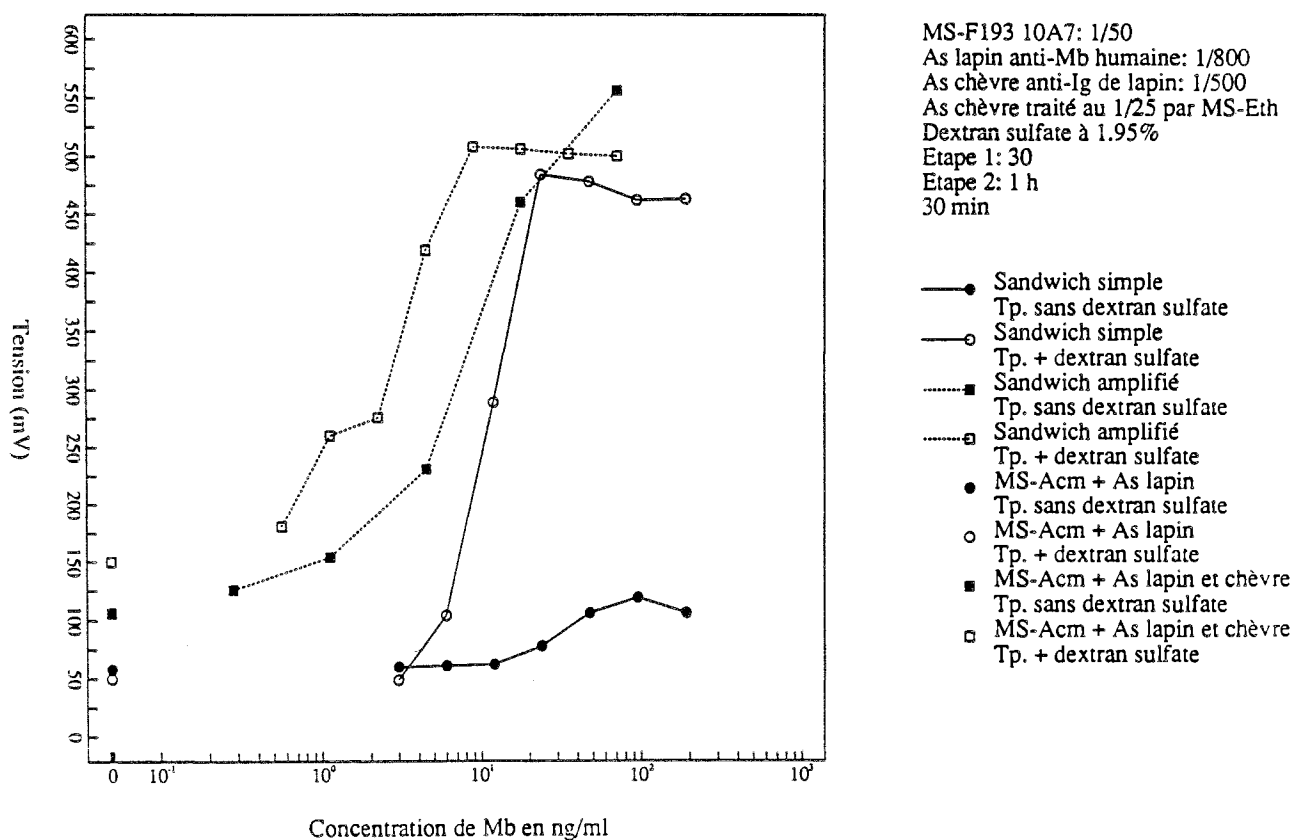


Figure 21 Comparaison des différents systèmes et tampons pour un des lots de MS-Acm Sandwich simple et amplifié - Tp. de néphélémétrie avec et sans dextran sulfate



Ces deux modèles de détection de la myoglobine, mettant en oeuvre, l'un des MS-Ag, l'autre des MS-Acm (l'Acm retenu est le F193 17A10) vont faire l'objet d'une étude en milieu sérique dans le but de les adapter au dosage de myoglobine en sérum humain pathologique.

CHAPITRE II: Application du système sandwich au dosage de la myosine cardiaque humaine.

Un système basé sur une immunocapture de la myosine suivie d'une amplification immunologique a été développé.

Réactifs utilisés:

- MS 1006 (diamètre > 300 nm, concentration de 19.4 mg/ml).
- Myosine cardiaque entière humaine.
- Acn F36 5G12 (lot 8761) à 13.6 mg/ml (Sanofi production), reconnaissant la zone centrale (S₂) des chaînes lourdes β de myosine ventriculaire; sa constante d'affinité vis à vis de la myosine de ventricule en solution est de 10^{10} l.mole⁻¹.
- Antisérums de lapin anti-myosine cardiaque humaine (Sanofi).
- Antisérums de chèvre anti-immunoglobulines (H + L) de lapin à 19 mg/ml d'Ac, lot L5 (Diagnostics Pasteur).
- Adénosine triphosphate (ATP) (Merck).
- Dithio-1,4-thréitol (Merck).
- Sulfate d'ammonium (Prolabo).
- Tétrahydro-sodium diphosphate (Labosi).
- Ethylène diamine tétraacétique (EDTA) (Merck).
- Chlorure de potassium (KCl) (Prolabo).
- Potassium hydroxyde (KOH) (Prolabo).
- Di-potassium hydrogénophosphate (K₂HPO₄) (Prolabo).
- Potassium dihydrogénophosphate (KH₂PO₄) (Prolabo).
- Caséine Kappa: préparation du Laboratoire à partir de caséine entière (28).

1. Préparation de la myosine.

1.1. Extraction.

La myosine est extraite du ventricule de coeur humain (18). Il s'agit d'un coeur âgé (homme de 75 ans mort d'une cirrhose du foie). Ce coeur a été congelé à -20°C pendant deux jours avant la dissection, décongelé à +4°C la veille de l'expérience. L'ensemble des manipulations s'effectue à +4°C. La myosine est extraite de 117 g de myocarde traités par un tampon dont la solution stock concentrée (Guba Straub) a la composition suivante: KH₂PO₄ 0.1M, K₂HPO₄ 0.05M, pyrophosphate de sodium 0.01M, EDTA 0.001M, KCl 0.3M, pH ajusté à 6.5 par addition de KOH.

Le protocole d'obtention de la myosine est résumé dans la figure 22.

La myosine est stockée à -20°C après addition de glycérol (V / V), et peut se conserver ainsi pendant plus d'une année. La concentration protéique de la préparation est de 10 mg/ml, déterminée par la méthode de Lowry (95) (réactifs Sigma Diagnostics).

1.2. Contrôle électrophorétique.

L'échantillon est analysé par électrophorèse en gel de polyacrylamide réticulé à 6% d'acrylamide, selon la méthode de Weber et Osborn (162), en tampon phosphate de sodium 0.075 M pH 7 et en présence de 0.1 % de SDS. La myosine déposée (10 μ g) migre parallèlement à des marqueurs de masse moléculaire (Pharmacia) pendant 8 h sous une tension de 500 V et un courant de 60 mA. Les protéines du gel sont ensuite fixées une nuit dans une solution d'acide trichloroacétique (TCA) à 12% et colorées au bleu de Coomassie

Figure 22 **Schéma d'obtention de la myosine cardiaque humaine de ventricule**

Préparation du ventricule (élimination de la graisse, des vaisseaux, tendons et des piliers), découpage du muscle - Broyage à l'aide d'un mixer en tampon Guba Straub (360 ml) 1/100

↓ Centrifugation 20 min +4°C à 5000 t/min

Lavage du culot repris par 360 ml de Guba Straub 1/100 puis centrifugation et second lavage

↓

Extraction du culot par 360 ml de Guba Straub 1/5

↓ Centrifugation 40 min +4°C 5000 t/min

Précipitation du surnageant filtré sur coton par EDTA 1mM pH 7. Décantation une nuit à +4°C. Elimination du surnageant.

↓ Centrifugation 40 min +4°C 5000 t/min.

Culot repris avec agitation par 275 ml de pyrophosphate de Na 50 mM, EDTA 1 mM, dithiotréitol 1 mM, ATP 2 mM, pH 7.4.

↓ Centrifugation 40 min +4°C 5000 t/min
Culot éliminé

Précipitation de l'actomyosine par du sulfate d'ammonium saturé.

↓ Centrifugation 40 min +4°C 5000 t/min
Culot éliminé

Précipitation de la myosine par sulfate ammonium saturé.

↓ Centrifugation 40 min +4°C 5000 t/min
Surnageant éliminé

Solubilisation de la myosine par pyrophosphate de Na 160 mM pH 7

R250 (0.1%, dans une solution eau / méthanol (1 / 1; V / V) renfermant 2% de TCA). Puis le gel est décoloré dans le mélange méthanol / acide acétique / eau (3 / 0.75 / 6.25; V / V).

L'électrophorèse (figure 23) montre peu de bandes, attestant d'une pureté satisfaisante. L'échantillon renferme essentiellement des chaînes lourdes de myosine (MM de 200000 Da). Les deux bandes supplémentaires observées pourraient correspondre à des produits de dégradation des chaînes lourdes.

2. Préparation des MS-Acm.

Le protocole de fabrication des MS-F36 5G12 passe par des étapes identiques à celles décrites précédemment pour la myoglobine. Plus ancienne, la variante mise en oeuvre ici en diffère cependant en quelques points:

- La préparation du dextran amino met en jeu 10 moles de NaIO₄ par mole de dextran.
- Le couplage du dextran amino sur les MS s'effectue indépendamment de la réduction qui a lieu après incubation d'une nuit entre les MS et le dextran amino.

Exceptées ces modifications, la procédure de couplage des Acm F36 5G12 est équivalente à celle du couplage des Acm anti-Mb.

3. Mise au point du dosage par sandwich.

Le système repose sur un principe identique à celui décrit pour le dosage de la myoglobine et comporte les mêmes étapes:

- Etape 1: MS-Acm + dilutions de la myosine humaine.
- Etape 2: addition de l'As de lapin anti-myosine humaine.
- Etape 3: addition de l'As de chèvre anti-Ig de lapin.

Le milieu de mise en réaction et de dilutions des échantillons est le tampon de néphélométrie.

3.1. Etude du système espèce / anti-espèce.

La réaction de précipitation classique des deux As en phase liquide permet de définir leurs dilutions d'emploi: 1/500 pour l'As de chèvre anti-Ig de lapin (elle équivaut à celle adoptée dans le système myoglobine) et 1/640 pour l'As de lapin anti-myosine.

3.2. Stabilité des MS-Acm en présence des deux As.

Le blanc MS-Acm est fixé dans un premier temps à environ 100 mV, correspondant à une dilution des MS-Acm de 1/100.

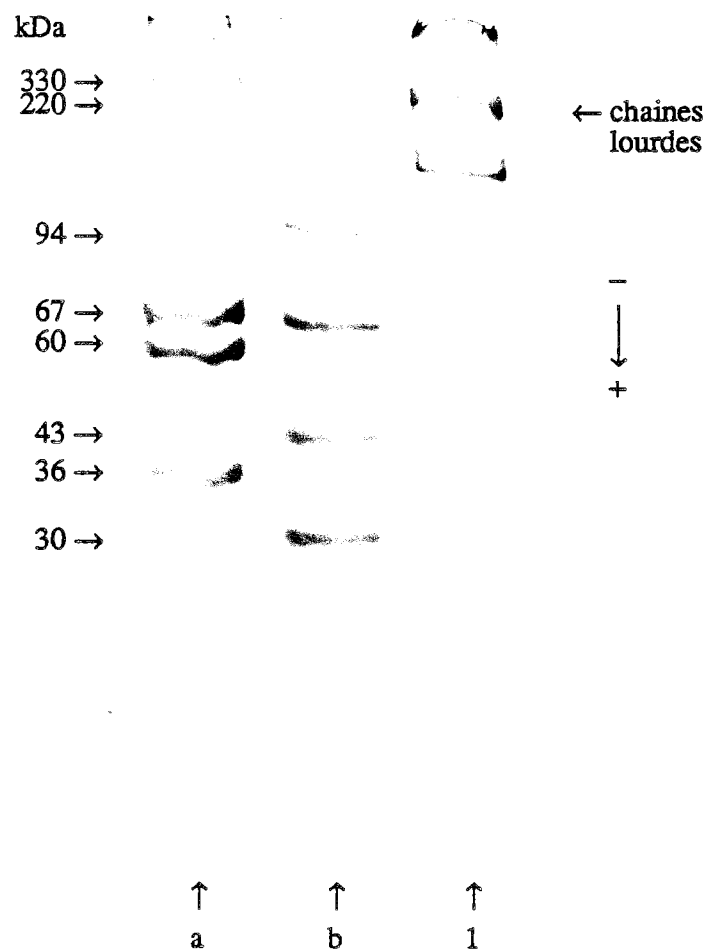
Le blanc MS-Acm n'est pas déstabilisé par la présence de l'As de lapin anti-myosine. En revanche, comme nous l'avons déjà observé dans le système myoglobine, l'introduction de l'As de chèvre anti-Ig de lapin au 1/500 déstabilise les MS-Acm.

Dans le système myoglobine, la déstabilisation avait pu être éliminée par l'utilisation d'un traitement de l'As, décrit en détail dans la troisième partie (cf. Ch.I.2.1.2.).

Nous avons tenté ici un traitement différent en ajoutant dans le milieu réactionnel une substance stabilisante particulière, la caséine Kappa; cette protéine asymétrique, constituée d'une partie hydrophobe et d'une partie hydrophile, a la propriété de stabiliser les micelles de caséine dans le lait.

**Figure
23**

Electrophorèse en gel de polyacrylamide (T = 6%) en tampon phosphate de sodium 0.075M pH 7 en présence de 0.1% de SDS



a: Protéines du kit de calibration de hautes MM

b: Protéines du kit de calibration de faibles MM

1: Myosine cardiaque humaine entière: dépôt de 0.01 mg en tampon phosphate de sodium 0.075M pH 7

Des concentrations croissantes, de 6.25 à 100 µg/ml, d'une solution de caséine Kappa ont été introduites en présence des MS-Acm au 1/100 et de l'As de chèvre anti-Ig de lapin au 1/500. Les signaux (mV) obtenus en 1 h sont les suivants:

Valeurs des signaux des MS-Acm en présence de l'As de chèvre au 1/500 et de la caséine Kappa en concentration croissante.

Concentration de caséine Kappa (µg/ml)	Signal en mV (1 h)
0	400
6.23	290
12.5	180
25	120
50	110
100	110
Blanc MS	100

Une concentration de caséine de 50 µg/ml permet d'éviter la déstabilisation des MS-Acm en présence de l'As de chèvre anti-Ig de lapin. Le mécanisme d'action de cette protéine est inconnu. On peut cependant émettre l'hypothèse qu'en raison de sa structure particulière, elle agirait vraisemblablement par blocage de certains constituants de l'As de chèvre.

3.3. Etude des temps d'incubation de chaque étape.

3.3.1. Temps d'incubation de la première étape.

Les dilutions de myosine de 3.9 ng/ml à 1000 ng/ml et les MS-F36 5G12 sont incubées pendant des durées variables s'étendant de 3 min 45 s à 2 h.

Puis l'As de lapin anti-myosine est ajouté au 1/640 final et les cuves sont incubées 1 h; l'As de chèvre anti-Ig de lapin au 1/500 et la caséine Kappa à 50 µg/ml sont additionnés dans la dernière étape. Le volume final est ajusté à 300 µl et les cuves sont incubées 10 min avant la lecture au néphélémètre.

Les signaux obtenus aux différents temps d'incubation sont représentés sur la figure 24. Ces premiers résultats conduisent aux observations suivantes:

- La réaction de sandwich a bien lieu.
- L'accroissement du temps d'incubation jusqu'à 1 h favorise la formation de Delta I plus important, au delà de 1 h, le gain apporté devient négligeable. Le seuil de détection proche de 20 ng/ml semble peu affecté par la durée d'incubation. Pour un temps final de 1 h 40 min (soit un temps d'incubation de 30 min), la réaction permet de détecter 20 ng/ml dans la cuve, le Delta I est de 160 mV.

La figure 25 illustre la réaction obtenue en 1 h avant l'addition de l'As de chèvre anti-Ig de lapin, et pour un temps d'incubation de la première étape de 30 min. Les réactifs se trouvent donc plus concentrés. La réaction est positive, le Delta I est de 140 mV, le seuil de détection proche de 60 ng/ml. La courbe supérieure, obtenue 1 h après l'addition de l'As de chèvre montre un Delta I de 190 mV et un seuil de détection d'un peu plus de 10 ng/ml. L'apport de l'As de chèvre a pour conséquence d'abaisser le seuil de détection.

Contrairement à ce que nous avons constaté dans le système myoglobine, une incubation s'avère nécessaire pour que la myosine se lie aux MS-F36 5G12.

Figure 24 Sandwich MS-Acm/myosine/As lapin anti-myosine humaine/As chèvre anti-Ig lapin - Influence du temps d'incubation de la première étape

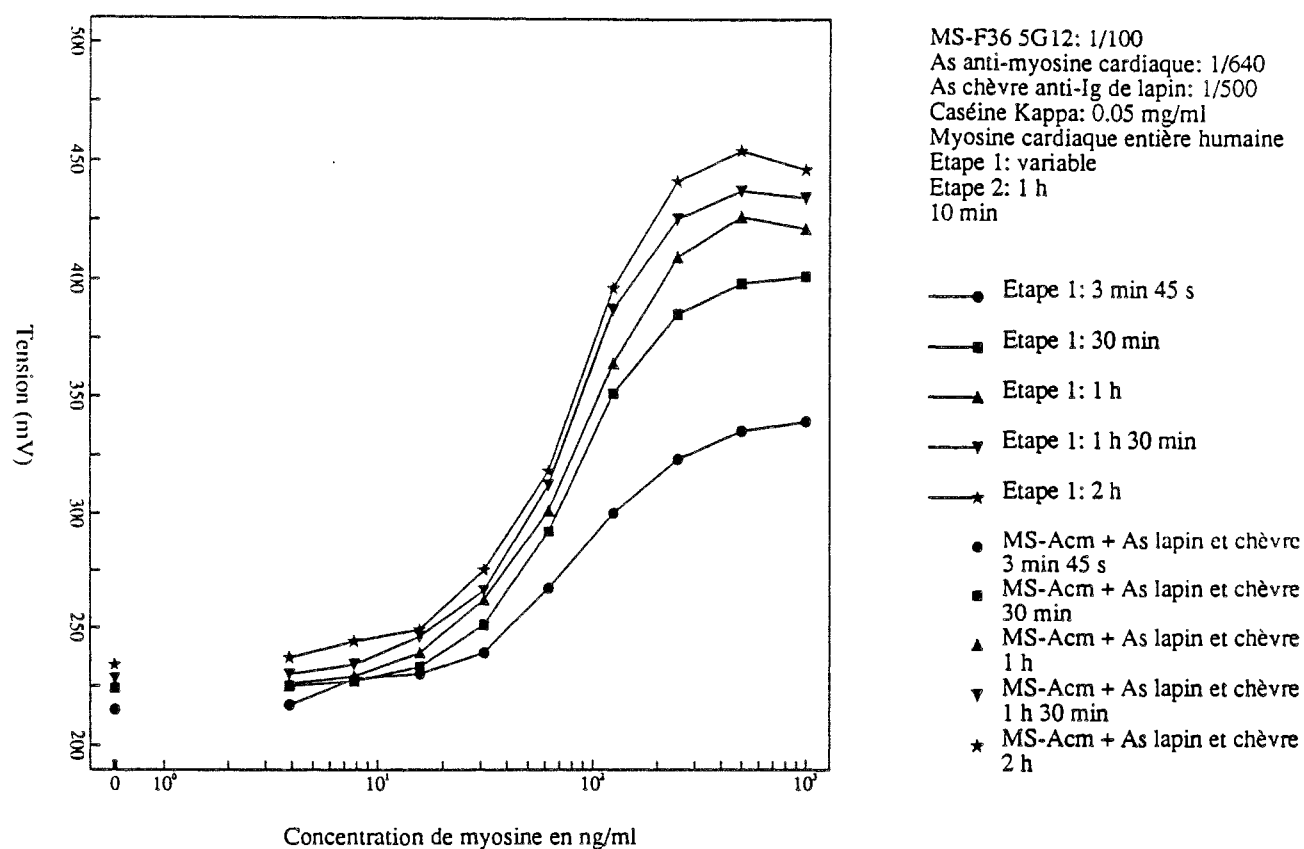
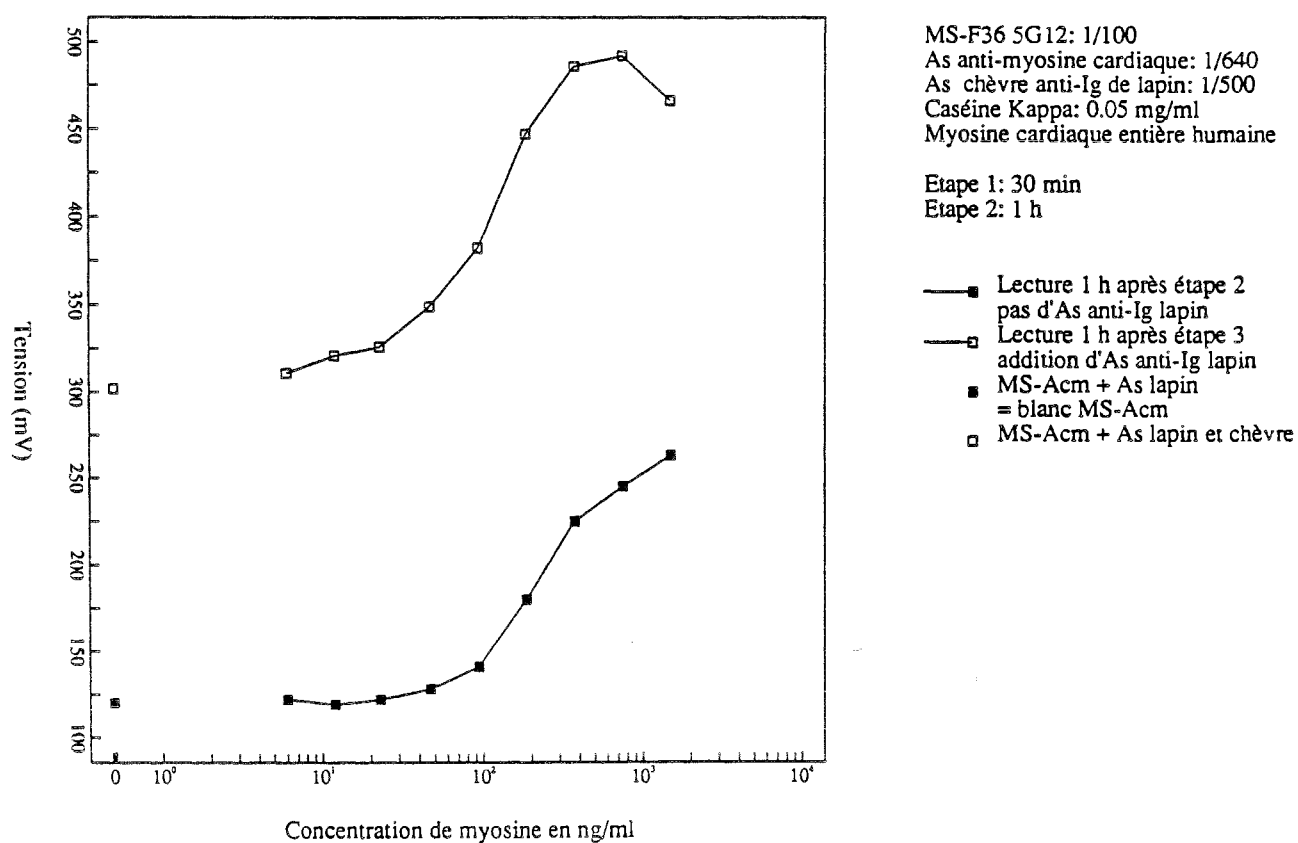


Figure 25 Sandwich MS-Acm/myosine/As lapin anti-myosine humaine amplifié ou non par As chèvre anti-Ig lapin



3.3.2. Temps d'incubation de la deuxième étape.

La durée d'incubation entre les MS-Acm et les dilutions de myosine est fixée à 30 min et nous faisons varier le temps de contact avec l'As de lapin de 3 min 45 s à 2 h.

La figure 26 présente les signaux obtenus 10 min après l'addition de l'As de chèvre anti-Ig de lapin. Au fur et à mesure de l'augmentation du temps d'incubation, les signaux s'élèvent et les pentes des courbes s'accroissent. Les Deltas I et sensibilités de détection varient en fonction des temps d'incubation; à 3 min 45, ils sont respectivement de 42 mV et 100 ng/ml; ces valeurs s'élèvent respectivement à 163 mV et 15 ng/ml au temps 1 h.

Jusqu'à 1 h d'incubation, les gains de Delta I et surtout de seuil de détection sont importants; ils tendent à se stabiliser au delà de 1 h. Une période d'incubation est donc nécessaire pour que les Ac anti-myosine de l'As reconnaissent la myosine fixée sur les MS-F36 5G12.

Cette durée de 1 h d'incubation lors de la deuxième étape constitue le temps minimal requis pour que le seuil de détection de la myosine réponde aux exigences de sensibilité du dosage: la durée totale de celui-ci se trouve portée à 1 h 40 min. Le seuil pathologique de la myosine sérique (chaînes lourdes) se situant, comme pour la myoglobine, autour de 100 ng/ml, le sérum humain devrait être introduit dans les cuves de réaction à la dilution finale de 1/6.

3.4. Influence de la concentration en MS-Acm et de la dilution de l'As de lapin anti-myosine.

Afin de tenter de réduire les durées d'incubation, nous avons étudié les effets d'une augmentation de la concentration des réactifs intervenant dans les deux premières étapes, c'est à dire des MS-F36 5G12 et de l'As de lapin.

Les dilutions finales des MS-Ac sont abaissées au 1/50 et l'As de lapin est introduit au 1/320 final.

Les temps d'incubation des deux premières étapes sont réduits de moitié:

- 15 min de contact entre les MS-Acm et les dilutions de myosine.
- addition de l'As de lapin et incubation de 30 min.
- ajout de l'As de chèvre anti-Ig de lapin et incubation de 15 min.

Les signaux d'agglutination observés pour un temps total de réaction de 1 h sont représentés sur la figure 27. Le Delta I est inchangé par rapport aux résultats précédents. De plus, le seuil de détection de la myosine (environ 20 ng/ml) n'est pas affecté par l'accroissement de la concentration des réactifs. Ces résultats suggèrent qu'une amélioration de la sensibilité pourrait probablement être obtenue avec des Ac plus affins, en particulier au niveau de l'As polyclonal de lapin. L'Acm F36 5G12 possède en phase liquide un coefficient d'affinité élevé, déterminé par RIA; les contraintes conformationnelles et environnementales induites par la fixation de l'Ac sur les MS peuvent modifier la reconnaissance immunologique d'un antigène de MM aussi importante que la myosine (MM de 500000 Da).

Par ailleurs, la myosine ayant servi d'immunogène a pu subir des dégradations protéolytiques dans la circulation si bien que les Ac de lapin pourraient reconnaître davantage les fragments de dégradation que la myosine entière.

Figure 26 Sandwich MS-Acm/myosine/As lapin anti-myosine humaine/As chèvre anti-Ig lapin - Influence du temps d'incubation de la deuxième étape

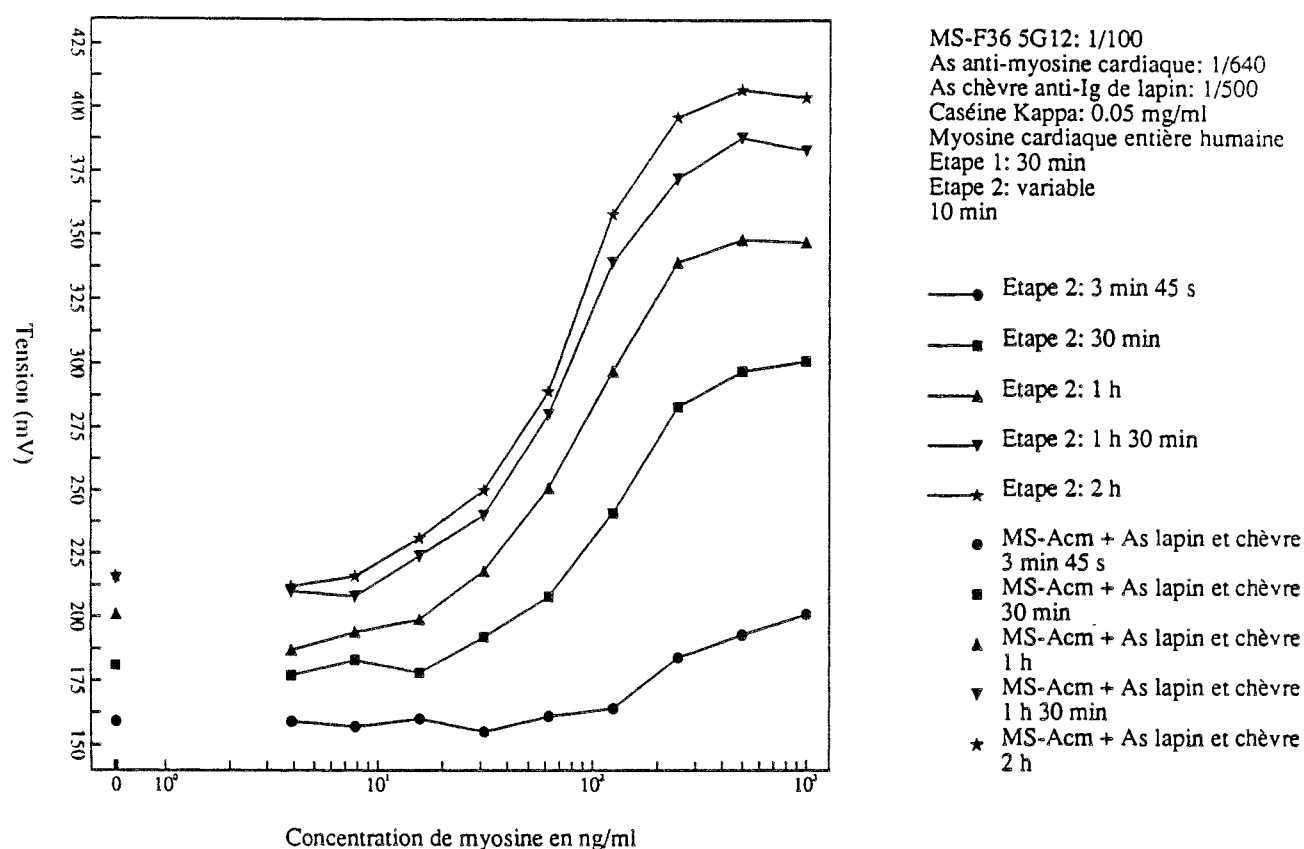
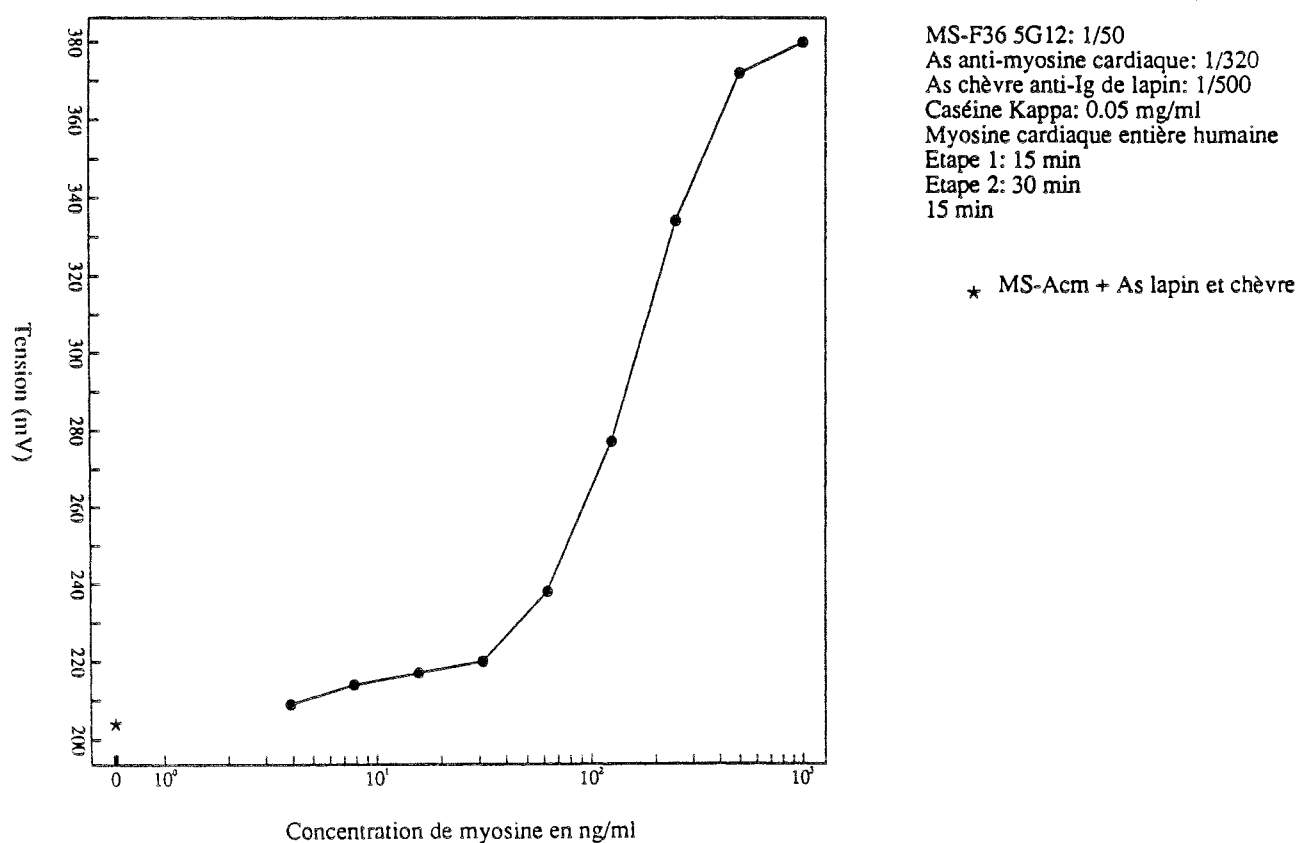


Figure 27 Sandwich MS-Acm/myosine/As lapin anti-myosine humaine/As chèvre anti-Ig lapin



4. Conclusion.

Le dosage de la myosine en milieu synthétique par un système d'immunocapture amplifié est réalisable. Le seuil de détection proche de 15 ng/ml est cependant élevé, impliquant de diluer le milieu sérique au 1/6.

Ce système d'immunocapture a prouvé ses performances pour le dosage de deux molécules aussi différentes que la myoglobine et la myosine. Les résultats obtenus avec la myoglobine permettent cependant d'envisager un dosage sur des sérums humains plus dilués (1/50).

PARTIE III

PARTIE III: Dosage de la myoglobine en milieu sérique concentré - Applications à la détection de myoglobine pathologique.

INTRODUCTION.

Les conditions de dosage de la myoglobine en milieu sérique concentré, par un système d'inhibition de l'agglutination ou d'immunocapture (sandwich) ont nécessité de procéder préalablement à un "traitement" des sérums avant leur introduction dans le milieu réactionnel; les sérums concentrés non traités provoquent en effet une déstabilisation des MS-Mb et des MS-Acm telle que le dosage est impossible.

Nous étudierons dans un premier chapitre les conditions d'utilisation de ce traitement sur les deux systèmes, en détaillant plus particulièrement le système en inhibition.

Dans un second chapitre, nous décrirons l'application de la technique de dosage par inhibition à la détection de myoglobine sérique pathologique dans des sérums de patients atteints d'infarctus.

Réactifs:

- Microsphères:
 - . 16 (diamètre > 300 nm, concentration de 38.9 mg/ml).
 - . 1006 (diamètre > 300 nm, concentration de 19.4 mg/ml).
 - . 901 (diamètre de 200 nm, concentration de 14.5 mg/ml).
- MS-Mb de babouin.
- MS-F193 17A10.
- Myoglobine de muscle squelettique humain sous forme réduite de cyanmetmyoglobine (Dako X555); 1 mg dans 175 µl de PBS.
- Sérums de contrôles négatif (HHI) et positif (HHH) (Behring).
- Trousse de détection des facteurs rhumatoïdes (Behring).
- Trousse de détection de la myoglobine: Rapi Tex®-Myoglobine (OUHE) (Behring).
- Antisérums de lapin anti-myoglobine humaine (A324, Dako).
- Antisérums de chèvre anti-Ig (H + L) de lapin à 19 mg/ml d'Ac, lot n°LA 05 DGS (Diagnostics Pasteur).

CHAPITRE I: Mise au point de dosages de la myoglobine en milieu sérique par immunonéphélémétrie.

1. Mise au point d'un dosage de la myoglobine par inhibition de l'agglutination en milieu sérique.

1.1. Etalonnage - Problème posé par l'emploi de sérum concentré.

Le dosage de la myoglobine sérique par inhibition de l'agglutination implique la mise en réaction du sérum à doser en présence de l'As de lapin anti-Mb puis des MS-Mb de babouin. La composition de l'étalon devant être aussi proche que possible de celle de l'échantillon à doser, le standard serait avantageusement constitué par un sérum étalon enrichi en Mb humaine à une concentration connue. Cela implique que:

- La myoglobine purifiée ajoutée au sérum étalon ait les mêmes propriétés immunochimiques que la myoglobine contenue dans les échantillons à doser. D'une part, les modalités d'extraction de la myoglobine comportent un risque de dénaturation, altérant la conformation et modifiant les propriétés antigéniques. D'autre part, la myoglobine contenue dans les sérums infarctiques provient de tissus nécrosés où elle a pu subir les altérations de nature différente.
- La concentration du milieu sérique choisie pour l'établissement de la courbe d'étalonnage soit telle que la présence même des constituants sériques autres que la myoglobine ne modifie pas les signaux d'agglutination par rapport à ceux obtenus sans sérum. Ces constituants ne doivent pas, en interférant dans le système immunologique, participer à la formation du signal, sinon celui-ci ne serait plus représentatif de la réaction.
- De plus, il faudra s'assurer que les sérums à doser, introduits à la même dilution que le sérum étalon, ne perturbent pas non plus la réaction immunologique, ou la perturbent de façon identique au milieu d'étalonnage.

Nous avons dans un premier temps étudié ces trois points sur la réaction d'inhibition de l'agglutination en milieu sérique dilué, dans le but de nous assurer que le choix des conditions d'étalonnage était correct. Puis les essais en milieu sérique concentré ont été entrepris.

1.1.1. Identité immunochimique de la myoglobine étalon et de la myoglobine contenue dans les échantillons pathologiques.

La réponse à cette question a été obtenue en comparant les courbes d'inhibition induites par de la myoglobine soit purifiée et dissoute en milieu sans sérum, soit contenue dans un sérum pathologique.

1.1.1.1. Conditions opératoires.

La réaction est réalisée dans des conditions de test lent, l'objectif étant de vérifier que la myoglobine contenue dans un sérum pathologique est reconnue immunologiquement de façon identique à de la myoglobine purifiée.

Une série de réactions d'inhibition a été réalisée dans les milieux suivants:

- Sérum humain: contrôle positif dont la concentration en myoglobine est supérieure à 140 ng/ml.
- Sérum humain: contrôle négatif dont la concentration en myoglobine est inférieure à 50 ng/ml.
- Milieu synthétique (ms): Mb humaine purifiée dissoute dans un milieu sans sérum.

Les conditions de dilutions finales sont les suivantes:

- Les MS-Mb de babouin (MS 1006) sont diluées au 1/25, l'As de lapin anti-Mb au 1/3200.
- La gamme de dilutions de Mb s'étend de 0.28 ng/ml à 36 ng/ml.
- Les sérums humains sont introduits dilués du 1/25 au 1/800 pour le sérum négatif et du 1/50 au 1/1600 pour le sérum positif.
- Le volume réactionnel est de 300 μ l.
- Le temps d'incubation avant la lecture des cuves est de 1 h.

1.1.1.2. Résultats.

Les courbes d'inhibition sont présentées figure 28. L'étalonnage en milieu synthétique fournit les concentrations réelles contenues dans les sérums négatif et positif (respectivement 16 ng/ml et 525 ng/ml de Mb). Les courbes d'inhibition obtenues en milieu sérique sont superposables à celle en milieu synthétique. La Mb purifiée et celle que renferment les sérums de contrôle se comportent donc bien de façon identique dans le système d'inhibition.

De plus, nous constatons que, à ces taux de dilution, le milieu sérique ne perturbe pas la réaction immunologique: les constituants sériques n'interfèrent pas avec le signal spécifique.

Il serait donc permis de proposer pour étalonner la méthode une gamme de dilutions de Mb humaine en milieu sérique; néanmoins, les conditions fixées précédemment dans la deuxième partie imposent de concentrer davantage le sérum à doser. Une dilution de 1/10 est en effet requise pour couvrir la plage des concentrations normales et pathologiques.

1.1.2. Inhibition de l'agglutination MS-Mb / As de lapin anti-Mb en milieu sérique concentré au 1/10 final.

1.1.2.1. Conditions opératoires.

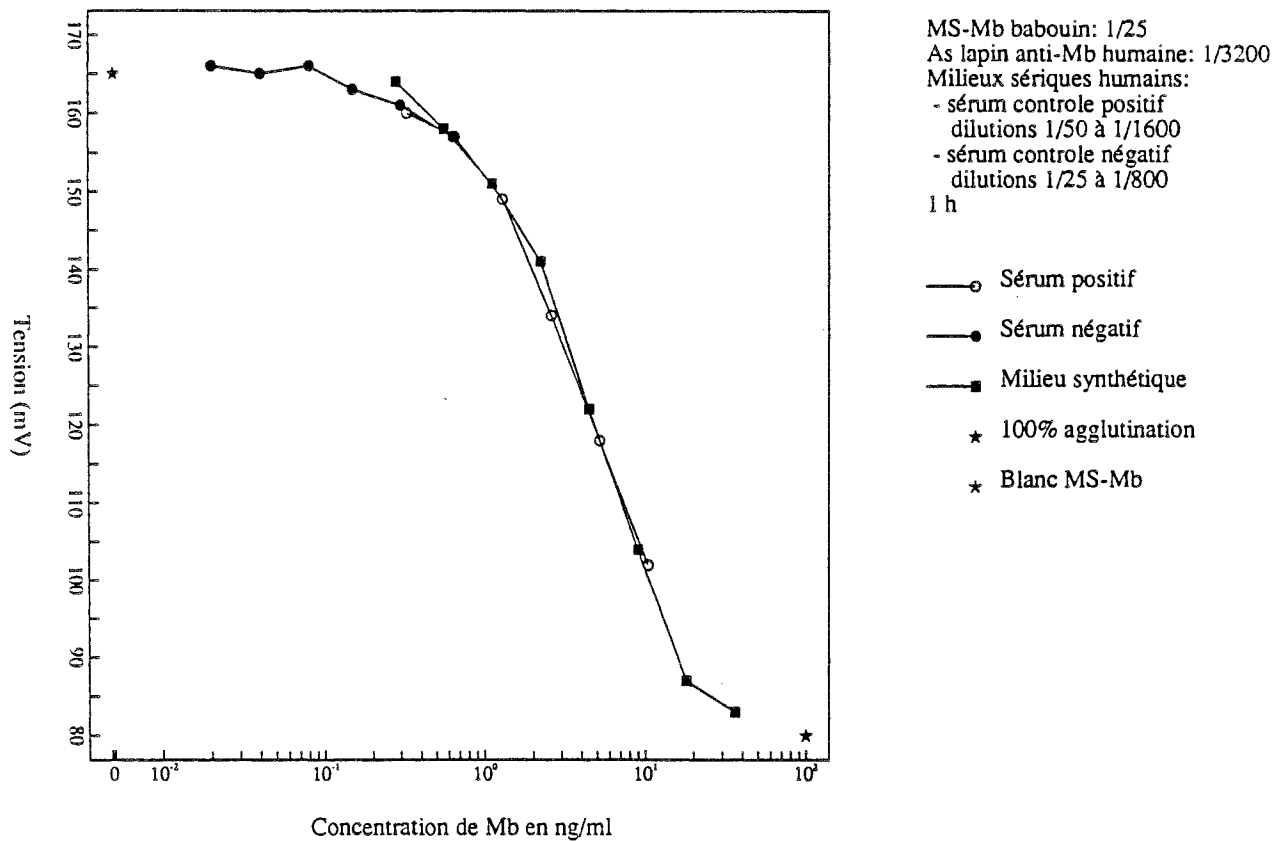
1.1.2.1.1. Constitution d'un pool de sérums humains.

Le milieu sérique retenu pour constituer le milieu d'étalonnage est composé d'un mélange de sérums humains sélectionnés parmi ceux disponibles au Laboratoire sur les critères suivants:

- Absence de facteurs rhumatoïdes.
- Absence de myoglobine détectable par le test rapide d'agglutination sur lame (trousse Behring) décrit dans la première partie (cf. Ch.I.1.4.2.2.4.).

Dix sérums répondant à ces critères sont mélangés sous des volumes identiques, additionnés d'azide de sodium à 2 pour mille, puis conservés à 4°C. Le mélange sera dénommé "pool" dans la suite de ce travail.

Figure 28 Inhibitions comparatives de l'agglutination MS-Mb/As lapin anti-Mb humaine par la Mb humaine apportée en milieux synthétique ou sérique



1.1.2.1.2. Protocole.

L'inhibition est effectuée en milieu synthétique, et en présence de sérum (pool). La Mb humaine est ajoutée dans les deux milieux. Les dilutions finales des réactifs sont celles fixées dans la deuxième partie de notre mémoire:

- MS-Mb de babouin diluées au 1/5 (blanc de 200 mV).
- As de lapin anti-Mb au 1/400.
- Pool de sérums au 1/10.
- Les concentrations de Mb s'échelonnent de 4.5 ng/ml à 1.15 µg/ml.
- La lecture des cuves s'effectue après 15 min d'incubation.

1.1.2.1.3. Résultats.

Les profils d'inhibition obtenus sont représentés sur la figure 29. Nous constatons que la courbe obtenue en présence du pool est déplacée vers les hauts voltages par rapport à celle en milieu synthétique. Le blanc MS-Mb est également augmenté en présence du pool.

Les constituants sériques concentrés interfèrent donc dans le système en augmentant les signaux de façon non spécifique.

L'allure de la courbe n'est cependant pas modifiée, les signaux ne sont que traduits vers de forts voltages, la réaction immunologique proprement dite ne semble donc pas affectée.

Cet étalonnage en milieu sérique concentré, contrairement à celui observé en milieu sérique dilué, n'est plus satisfaisant car, selon la nature des sérums à doser, les signaux risqueront d'être décalés de façon imprévisible de part et d'autre de la courbe.

L'objectif consistant à faire coïncider, comme en milieu sérique dilué, les courbes des milieux synthétique et sérique, nous avons tenté d'éliminer ce qui pouvait être à l'origine des signaux non spécifiques par ce que nous appellerons un traitement du pool de sérums, dont les caractéristiques sont développées dans le paragraphe suivant.

1.2. Traitement du milieu sérique et incidences sur la réaction d'agglutination MS-Mb / As de lapin anti-Mb.

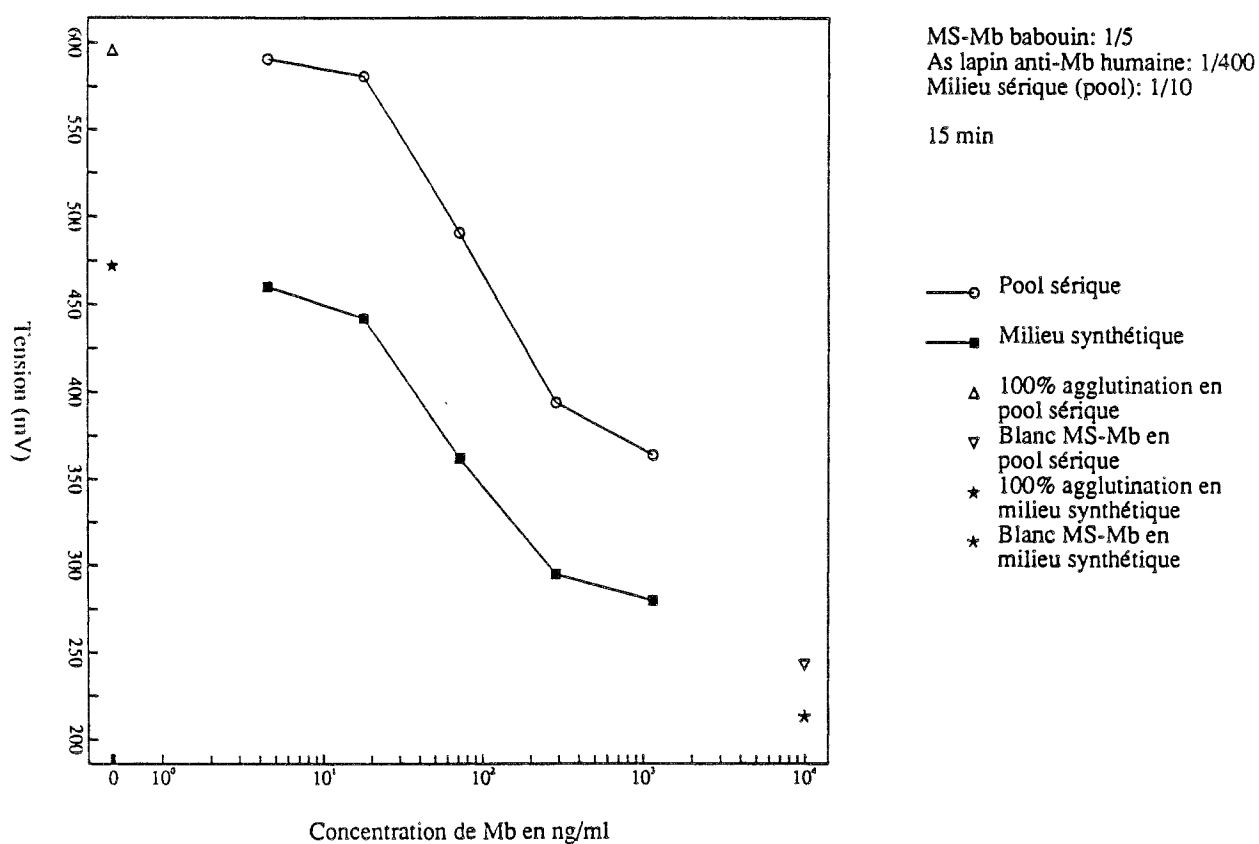
1.2.1. Hypothèse de travail.

Les MS-Mb seules en suspension possèdent des charges électriques négatives identiques, elles interagissent entre elles en se repoussant, ce qui stabilise leurs suspensions.

Lorsqu'une solution protéique se trouve en présence d'une phase étrangère sous forme liquide, solide ou gazeuse, une proportion déterminée de certaines protéines s'adsorbe rapidement sur cette interface (77). Ce phénomène complexe dépend de la nature chimique de la surface mais aussi de la structure et de la concentration des protéines présentes. L'interaction résulterait d'un changement de conformation des protéines, permettant à certains résidus d'acides aminés de se lier, en particulier ceux d'acides aminés hydrophobes. Ces changements de conformation ne s'accompagnent pas nécessairement de la destruction des propriétés biologiques des protéines adsorbées. Les caractéristiques physico-chimiques de la surface déterminent également la nature de la liaison (forces de Van der Waals, ponts hydrogène, électrovalences).

Nous avons constaté précédemment que le pool sérique au 1/10 provoquait une élévation du blanc MS-Mb, accroissant d'autant le signal de la réaction immunologique.

Figure 29 Inhibition de l'agglutination MS-Mb/As lapin anti-Mb humaine par la Mb humaine en milieu synthétique ou en milieu sérique concentré



L'introduction de constituants sériques concentrés modifiait donc la stabilité des MS-Mb de telle sorte que ces dernières s'agglutinaient pour une part de façon non spécifique.

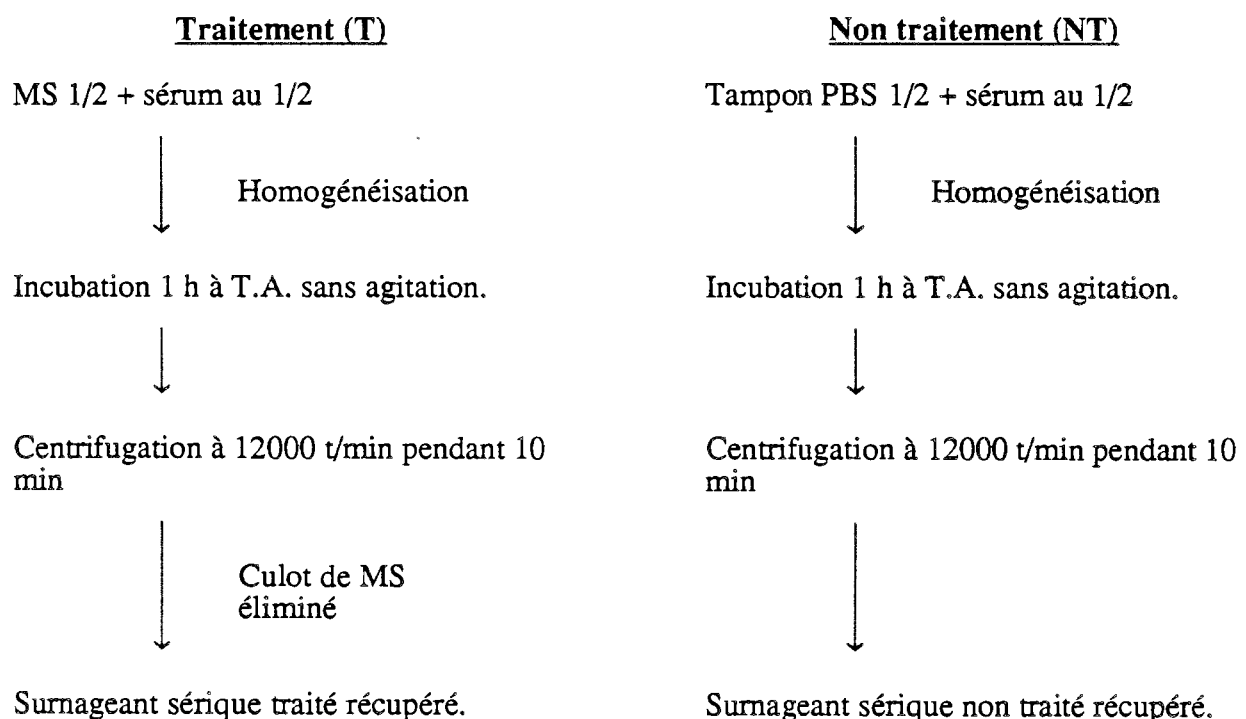
Nous avons émis l'hypothèse que cette déstabilisation aspécifique des MS en milieu sérique concentré résultait de la fixation sur ces dernières de constituants particuliers du sérum (ce qui sera vérifié expérimentalement dans la quatrième partie de ce travail). Un traitement préalable du milieu sérique par une suspension de MS proches de celles utilisées pour le test d'inhibition devrait donc permettre d'adsorber les constituants interférants et d'éliminer les signaux non spécifiques. Les courbes d'inhibition en milieu synthétique et en milieu sérique concentré seraient alors superposées: ce critère sera retenu pour apprécier l'efficacité d'un tel traitement.

1.2.2. Stabilisation des signaux d'agglutination en milieu sérique concentré traité.

Les conditions de traitement ont été étudiées dans un système d'inhibition en 1 h ou 30 min, utilisant l'As de lapin anti-Mb plus dilué (1/3200 et 1/500 respectivement) que pour le test en 15 min qui sera mis au point par la suite, le sérum humain est introduit au 1/20.

1.2.2.1. Protocole de traitement.

Le protocole schématisé comme suit sera systématiquement appliqué quelque soit le milieu sérique (sérum individuel ou pool):



Le test s'effectue sur 3 échantillons:

- Sérum traité (T): le sérum est additionné de MS (V / V).
- Sérum non traité (NT): ce témoin de déstabilisation accompagne toujours le sérum traité, permettant d'évaluer l'efficacité du traitement. Les MS de traitement sont remplacées par le même volume de PBS.

- Milieu synthétique (ms): le milieu synthétique constitue le modèle de réaction sans sérum sur lequel la réaction en milieu sérique doit se calquer. Deux volumes équivalents de PBS sont incubés 1 h et centrifugés dans les mêmes conditions que les tubes renfermant le sérum.

Si, comme nous le supposons, des constituants interférants sériques se fixent sur les MS de traitement pendant l'heure d'incubation, ils sont entraînés avec les MS lors de la centrifugation. Le surnageant devrait donc être débarrassé au moins en partie de ces substances.

L'introduction du milieu traité, même concentré, dans la suspension de MS-Mb ne devrait plus en accroître le blanc si tous les constituants indésirables ont été éliminés.

1.2.2.2. Traitement du pool et de sérums individuels.

Dans une première étude, le choix des MS de traitement s'est orienté logiquement vers des MS-Mb de babouin, identiques à celles déstabilisées par des constituants du sérum au cours des tests néphélométriques.

Les conditions de couplage de ces MS sont celles décrites précédemment (cf. partie II, Ch.I.1.4.1.1.).

L'étude a porté d'une part sur le pool, d'autre part sur 30 sérums humains choisis au hasard parmi ceux disponibles au Laboratoire, dans le but d'analyser l'incidence du traitement pour chaque sérum et de relever d'éventuelles différences inter-individuelles.

Une concentration de MS-Mb de 5 mg/ml de milieu sérique est adoptée pour le traitement. Chaque tube de sérum ou de pool traité est accompagné de son tube témoin non traité (addition de diluant sans MS-Mb). Un témoin de réaction en milieu synthétique (ms) est constitué par un tube où le sérum est remplacé par un même volume de PBS. Les surnageants recueillis après centrifugation seront introduits dans les cuves selon le schéma réactionnel ci-dessous.

1.2.2.3. Evaluation de l'efficacité du traitement: mesure des signaux d'agglutination en milieu sérique traité et non traité.

Plutôt que de tester les surnageants des centrifugations sur les MS-Mb seules, nous avons choisi de les étudier dans le système agglutinant MS-Mb / As de lapin anti-Mb utilisé à la dilution fournissant le 100% d'agglutination; les résultats obtenus nous informeront de la stabilisation tant des signaux d'agglutination que du blanc MS-Mb en milieu sérique concentré.

1.2.2.3.1. Conditions expérimentales.

Les conditions des tests d'agglutination sont les suivantes pour tous les échantillons traités et non traités:

- 30 µl de chaque surnageant de centrifugation (pools T et NT, sérums T et NT, ms) sont mis en présence de 30 µl de l'As anti-Mb prédilué au 1/320.
- 30 µl de MS-Mb sont ajoutés dans chaque cuve. Les volumes sont complétés à 300 µl par addition de tampon de néphélométrie. Le milieu final renferme ici 1% de PEG mais les résultats sont identiques en PEG 3% final. Les cuves sont incubées pendant 1 h avant la lecture des signaux d'agglutination.

1.2.2.3.2. Résultats.

Les résultats obtenus pour l'ensemble des sérums et du pool, traités et non traités, sont présentés sur la figure 30.

Les signaux d'agglutination en présence de tous les sérums non traités sont très élevés, à l'exception cependant du sérum 25. Par contre, pour 29 des sérums traités testés, les signaux d'agglutination sont inférieurs au signal obtenu en milieu synthétique. L'explication la plus probable est que ces sérums contiennent physiologiquement de faibles quantités de myoglobine (moins de 100 ng/ml) qui inhibent légèrement la réaction et abaissent le signal d'agglutination. Il en va de même pour le pool. Le seuil de détection du test rapide sur lame se situe en effet à 100 ± 20 ng/ml, et la négativité du test n'exclut pas la présence de traces de myoglobine dans les échantillons.

Nous vérifierons expérimentalement un peu plus loin le bien fondé de cette explication de la légère baisse du signal d'agglutination en sérum traité par rapport à celui observé en milieu synthétique.

Le signal d'agglutination en présence du sérum 25 est faible car ce sérum renferme de la myoglobine (cf. Ch.I.1.6.3.2.2).

Le traitement a donc bien eu pour conséquence d'éliminer les substances interférentes de tous les sérums, malgré cependant une efficacité moindre pour l'un d'entre eux (le n°19).

Les figures 31 et 32 reprennent les résultats en les présentant en termes de pourcentages de variation pour le groupe des échantillons traités et celui non traité par rapport au signal du pool, traduisant la dispersion des valeurs; leur comparaison montre que:

- Les signaux des sérums traités se répartissent de façon serrée autour du signal d'agglutination créé en présence du pool. 4 sérums se trouvent légèrement au dessus du 100%. Les autres sérums sont tous regroupés en dessous du 100%. Les écarts maximaux de part et d'autre du 100% sont de -14% et +14%, en éliminant le sérum pathologique 25.
- Les signaux de déstabilisation se répartissent uniformément de part et d'autre du 100% correspondant au pool non traité; les pourcentages maximaux de dispersion s'étendent, hormis le sérum 25, de -26% à +68%.
- La comparaison des pourcentages de dispersion des sérums traités et non traités par rapport au pool suggère quelques remarques:
 - . Les signaux d'agglutination obtenus en milieu sérique non traité présentent de grandes variations individuelles. L'importance de la déstabilisation des MS-Mb dépendrait de la composition intrinsèque de chaque sérum.
 - . En éliminant les agents interférants, le traitement a permis de minimiser considérablement les variations inter-individuelles. Les concentrations de certaines de ces substances interférentes, variables selon les sérums, influeraient donc directement sur la déstabilisation. Cette hypothèse fera l'objet d'une étude détaillée dans la quatrième partie de notre travail.

En conclusion, le traitement a permis d'éliminer de façon efficace l'effet sérique du pool et des sérums testés sur le 100% d'agglutination.

Figure 30 Valeurs des 100 % d'agglutination du système MS-Mb/As lapin anti-Mb humaine en présence de sérums humains non traités et traités

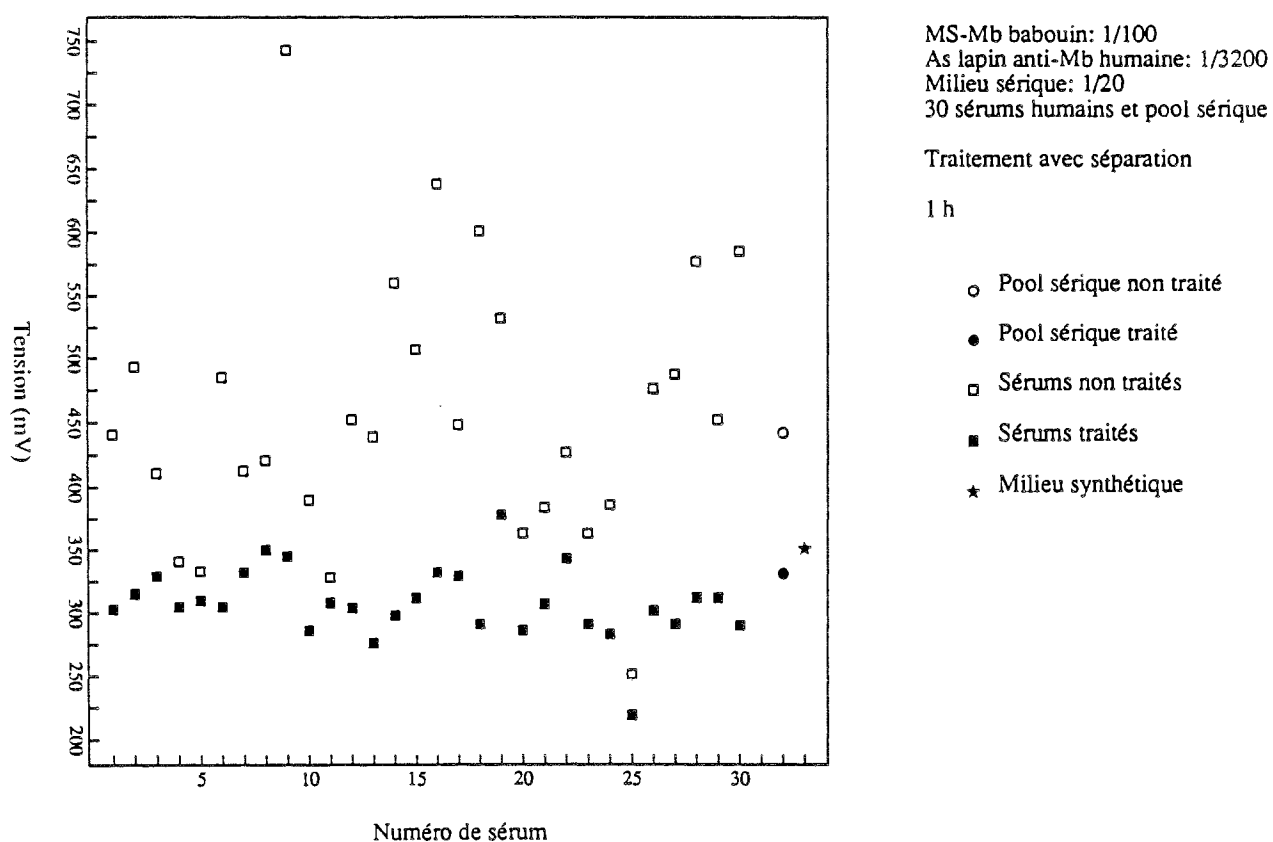


Figure 31 Pourcentages des signaux d'agglutination obtenus pour 30 sérums traités par rapport au signal d'agglutination obtenu en milieu pool sérique traité

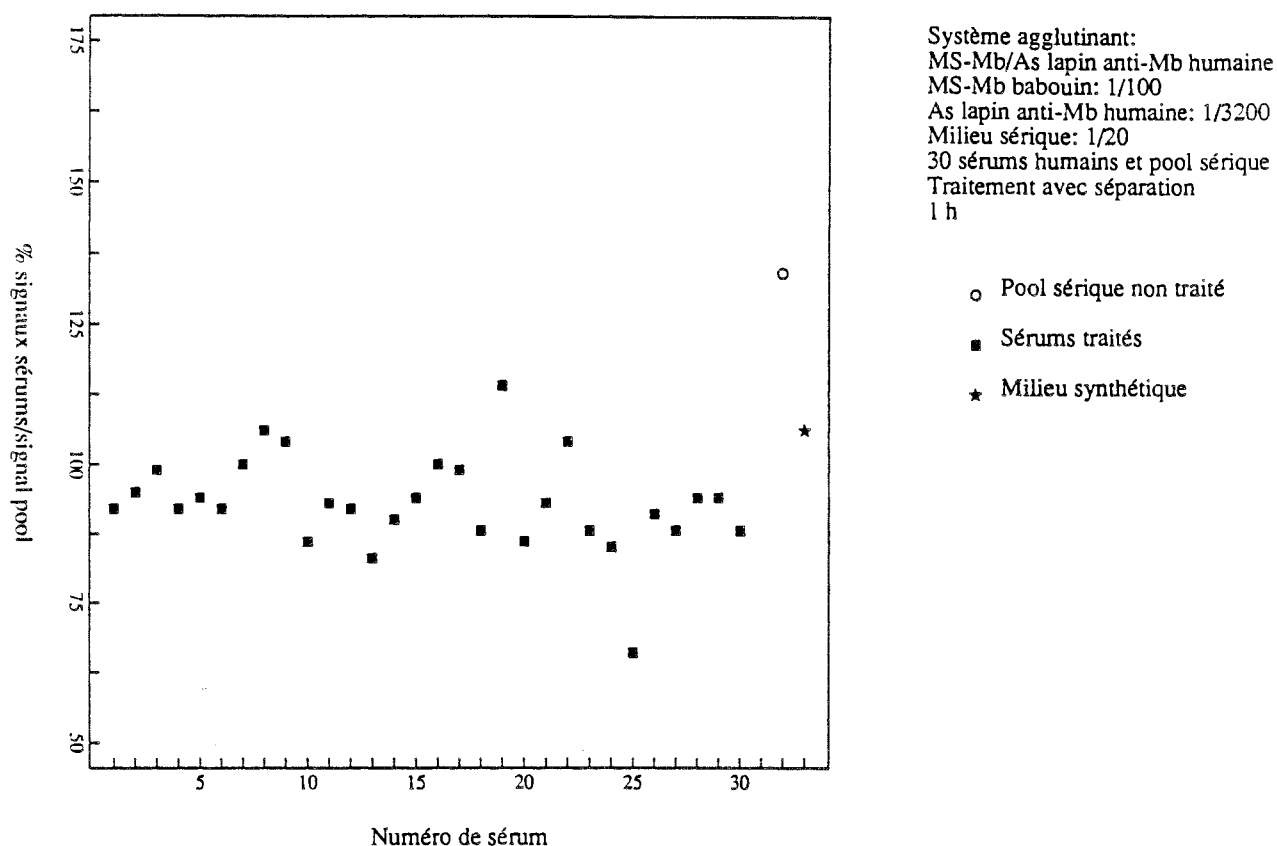
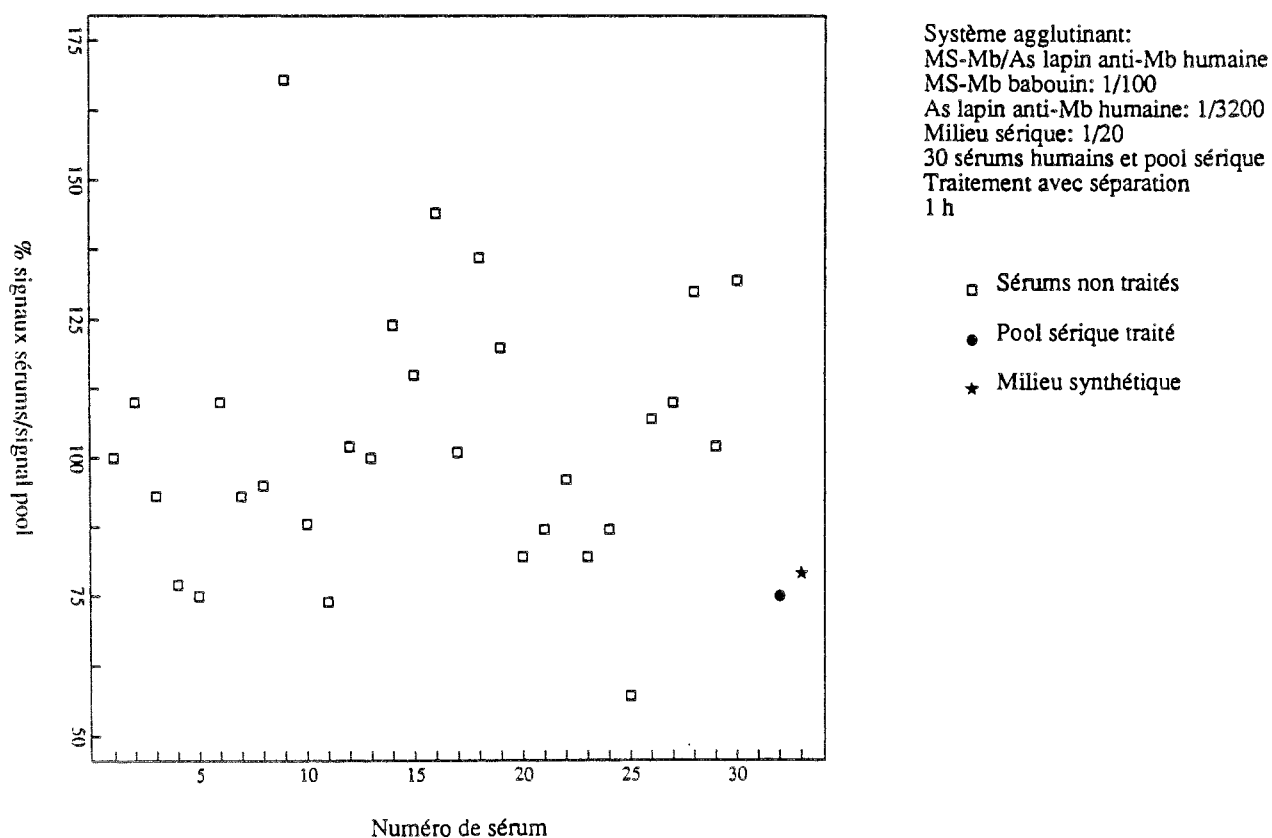


Figure 32 Pourcentages des signaux d'agglutination obtenus pour 30 sérums non traités par rapport au signal d'agglutination obtenu en milieu pool sérique non traité



1.3. Traitement du milieu sérique sans séparation.

Un traitement identique à celui que nous venons de décrire a été tenté en recourant cette fois à des MS de traitement de faible diamètre (50 nm), peu visibles au néphélémètre; le milieu sérique est mis en présence de ces MS, couplées à de l'éthanolamine (nous verrons plus loin que les MS-Ethanolamine fonctionnent de façon identique aux MS-Mb) pendant 1 h. Les MS de traitement ne sont pas éliminées par centrifugation en fin d'opération mais restent dans le milieu sérique traité.

Le traitement met en présence 15 µl de sérum pur, 15 µl de MS de traitement à 40 mg/ml (2 mg/ml final) et 30 µl de tampon de néphélémétrie. Après 1 h d'incubation à T.A., les MS-Mb et l'As de lapin anti-Mb sont ajoutés et le volume réactionnel final est ajusté à 300 µl.

La manipulation a été menée sur le pool de sérums et sur les 30 sérums humains précédemment utilisés. Les valeurs des pourcentages d'agglutination des sérums traités par rapport au pool traité sont représentées sur la figure 33.

La dispersion des points par rapport au pool traité s'étend de -11% à +13%, compte non tenu du sérum pathologique 25 (ce sérum renfermait de la myoglobine); ces pourcentages se rapprochent de ceux constatés précédemment lorsque le milieu sérique est séparé des MS de traitement.

Le traitement par des MS de faible diamètre s'avère efficace pour éliminer l'effet sérique. Ne nécessitant pas de séparation, il semble plus intéressant que le traitement avec centrifugation pour une éventuelle exploitation pratique. Néanmoins nous avons poursuivi nos travaux en traitant les milieux sériques par des MS de diamètre plus important; en effet, l'étude réalisée dans la quatrième partie consacrée à l'analyse des produits interférents est plus aisée lorsque MS de traitement et milieu sérique peuvent être séparés. Or les MS de faible diamètre sont difficilement séparables du milieu sérique par simple centrifugation.

1.4. Variations de certains paramètres du traitement.

1.4.1. Concentration des MS de traitement.

Les MS-Mb sont introduites au contact du pool au 1/2 final, à des dilutions de 2 mg/ml à 10 mg/ml de milieu réactionnel. Des témoins pool non traité et ms sont également inclus dans l'expérience.

Les surnageants sont introduits dans le système agglutinant MS-Mb / As; le milieu sérique se retrouve au 1/20 final, l'As au 1/3200, les cuves sont lues après une heure de contact.

Les résultats sont présentés figure 34, où sont portés les signaux obtenus en fonction de la concentration des MS-Mb de traitement. Les signaux de déstabilisation du pool traité chutent de façon importante jusqu'à ce que soit atteinte une concentration de 5 mg/ml de MS-Mb (la chute importante des signaux se situant pour des concentrations inférieures à 2 mg/ml, elle n'apparaît pas sur la courbe), puis se stabilisent: ils sont alors équivalents au signal d'agglutination obtenu en milieu synthétique. On en déduit donc que:

- 5 mg/ml de MS-Mb permettent d'éliminer totalement les constituants interférents.
- La décroissance régulière et rapide des signaux de déstabilisation lorsque croît la concentration des MS-Mb montre que ces dernières interviennent directement dans la stabilisation; l'augmentation de la concentration en MS de traitement favoriserait la fixation sur ces MS d'un nombre croissant de molécules supposées

Figure 33 Pourcentages des signaux d'agglutination obtenus pour 30 sérums traités par rapport au signal d'agglutination obtenu en milieu pool sérique traité

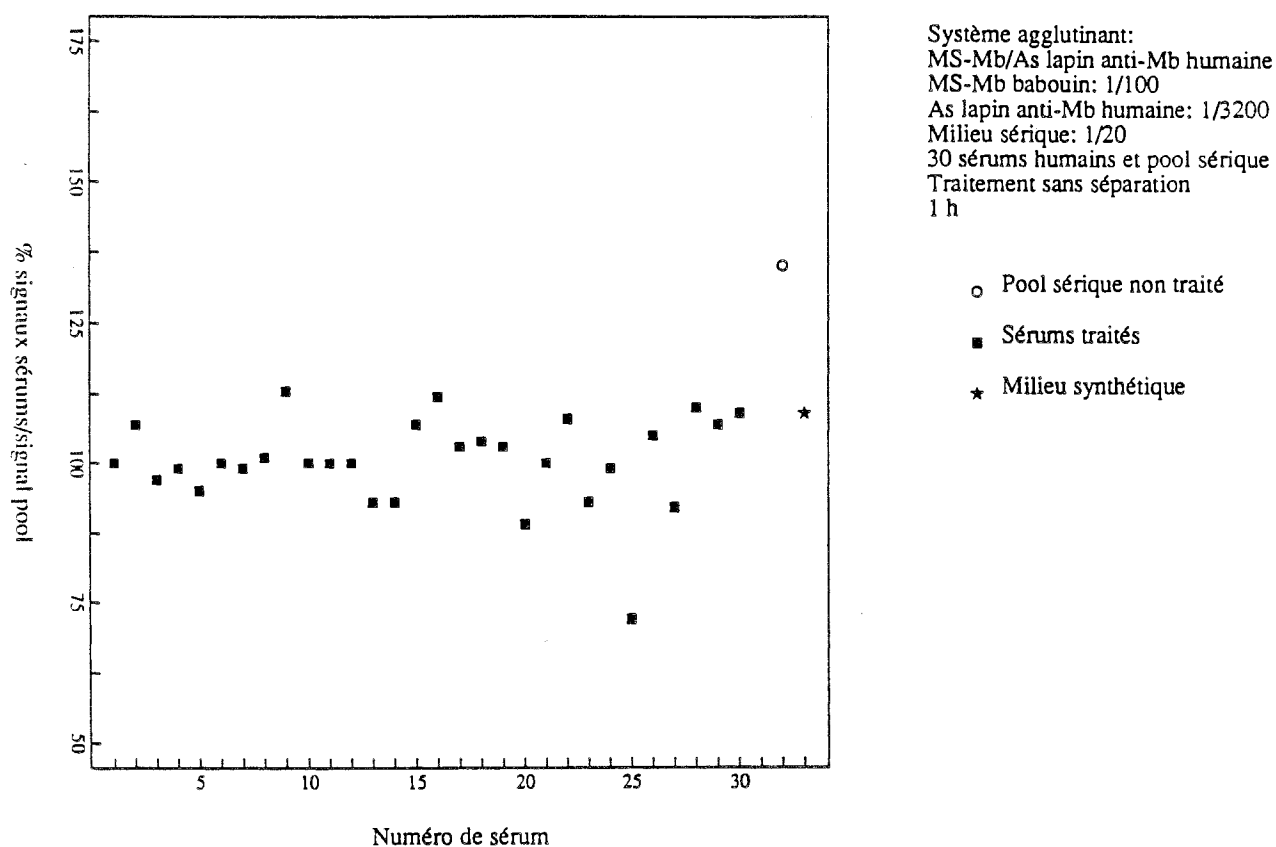
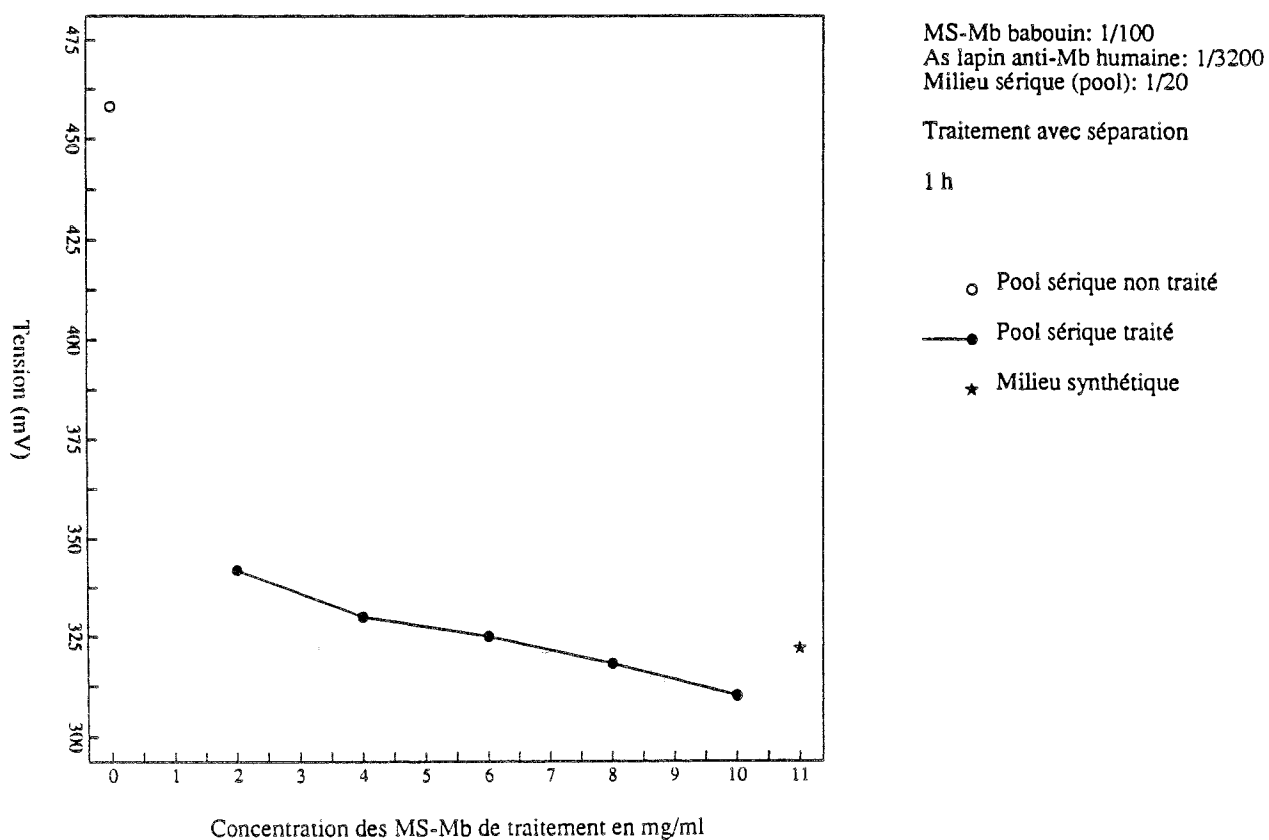


Figure 34 Valeurs des 100 % d'agglutination du système MS-Mb/As lapin anti-Mb humaine en milieu sérique traité - Influence de la concentration des MS-Mb de traitement



interférentes, ce qui se traduit par une diminution de la déstabilisation des MS-Mb ultérieurement ajoutées.

En résumé, le traitement élimine de façon particulièrement efficace les constituants interférents contenus dans le pool de sérums, et cette efficacité est directement liée à la concentration des MS-Mb.

1.4.2. Nature du produit couplé sur les MS.

Plusieurs lots de MS de traitement ont été synthétisés en modifiant le produit de couplage. Les lots suivants ont été préparés:

- MS-Mb (utilisées précédemment).
- MS non couplées: MS n'ayant subi que la première étape de dialyse.
- MS-Ethanolamine (MS-Eth): ces MS sont synthétisées selon le même protocole que les MS-Mb, elles n'en diffèrent que par l'absence de l'antigène. Elles sont saturées 2 h à T.A., dialysées une nuit à 4°C contre du tampon PBS, puis centrifugées afin d'ajuster leur concentration finale à 50 mg/ml.

Le pool traité par l'une ou l'autre de ces préparations ne déstabilise plus la réaction d'agglutination MS-Mb / As de lapin anti-Mb (figure 35). Mais les concentrations de MS requises au traitement sont supérieures pour les MS non couplées et les MS-Eth.

On peut donc conclure que la nature du produit couplé n'a que peu d'influence sur l'efficacité du traitement, la MS seule semble intervenir. Des MS nues, non couplées, sont capables de retenir des constituants déstabilisants du sérum.

1.4.3. Diamètre des MS de traitement.

Plusieurs lots de MS-Eth différant par leurs diamètres, donc par la plus ou moins grande surface de contact avec le milieu sérique, sont synthétisées dans les mêmes conditions; les lots de MS de départ sont les suivants:

- MS 839: diamètre de 50 nm.
- MS 845: diamètre de 110 nm.
- MS 502: diamètre de 125 nm.
- MS 901: diamètre de 245 nm.
- MS 315: diamètre de 295 nm.

Pour chaque lot de MS-Eth, nous faisons varier la concentration de MS au traitement de 0.2 à 25 mg/ml.

Une partie des MS 839 demeure dans le surnageant après centrifugation, ce qui, pour ce lot, rend difficile l'obtention de surnageant sans MS.

Les résultats obtenus pour chaque lot de MS sont illustrés sur la figure 36.

On constate que, quelque soit le lot de MS de traitement, le pool est stabilisé; de plus, la concentration requise pour stabiliser ne semble pas liée au diamètre des MS de traitement.

1.4.4. Temps de contact entre les MS de traitement et le milieu sérique.

Le protocole de traitement adopté jusque là utilisait un temps d'incubation de 1 h entre la suspension de MS et le milieu sérique.

Figure 35 Valeurs des 100 % d'agglutination du système MS-Mb/As lapin anti-Mb humaine en milieu sérique traité - Influence du produit couplé aux MS de traitement

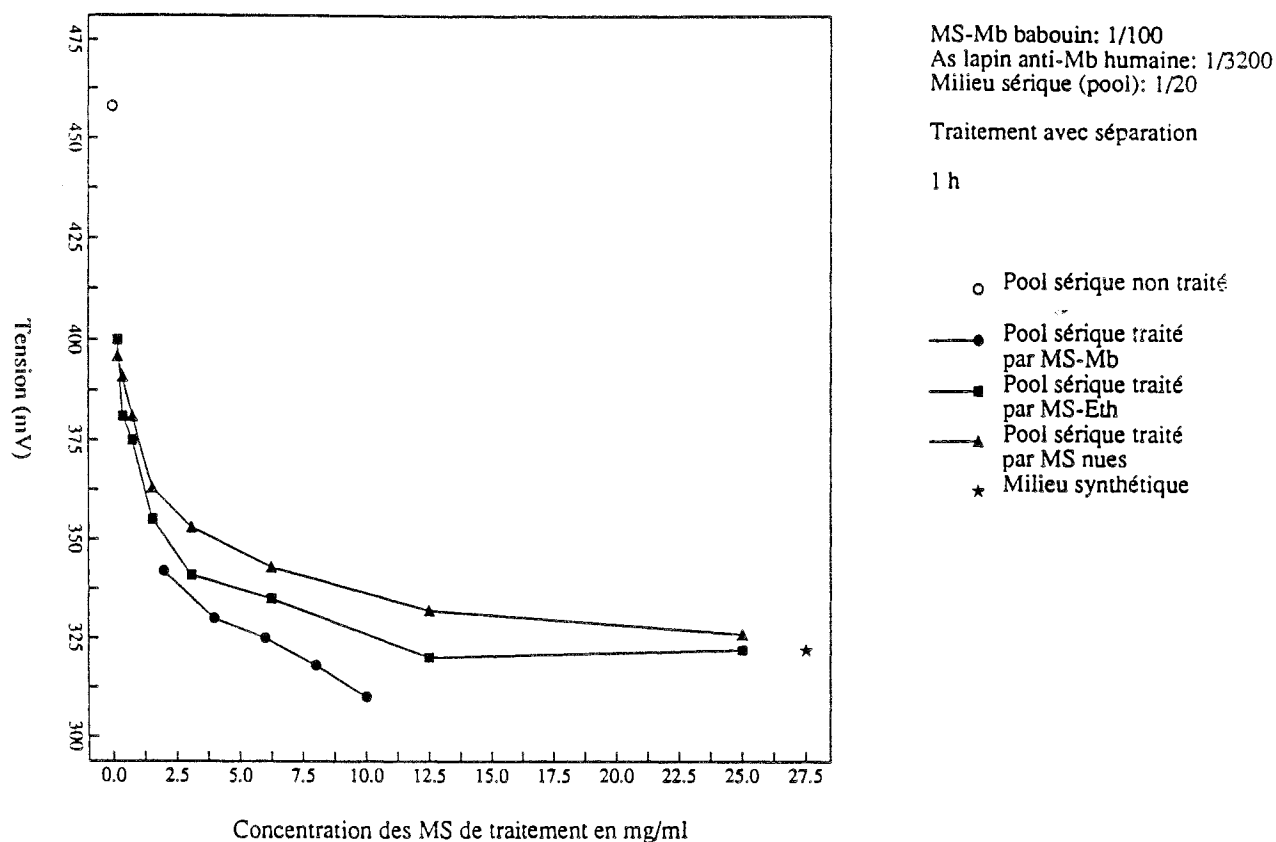
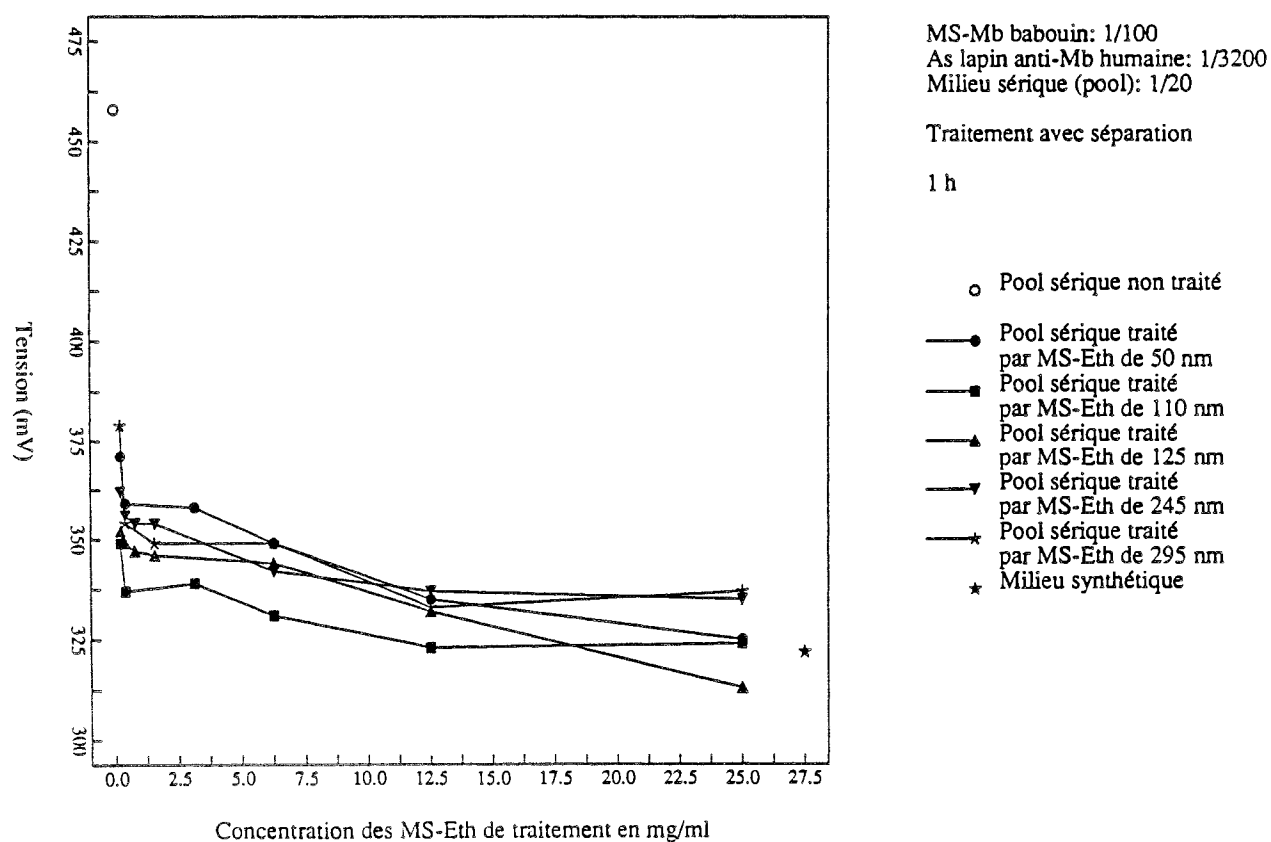


Figure 36 Valeurs des 100 % d'agglutination du système MS-Mb/As lapin anti-Mb humaine en milieu sérique traité - Influence du diamètre des MS-Eth de traitement



L'incidence de ce temps de contact sur l'efficacité du traitement a été étudiée sur le pool incubé pendant des durées variables en présence de MS-Mb à 7 mg/ml. Les surnageants introduits dans le système agglutinant provoquent les signaux suivants:

Influence du temps de contact entre les MS de traitement et le milieu sérique sur les signaux d'agglutination en milieu sérique traité.

Temps contact (min)	Signal pool (mV)	Signal ms (mV)
0	630	438
5	453	438
10	446	438
15	450	438
30	445	438
45	441	438
60	443	438

Dès 5 min de traitement, le signal d'agglutination a chuté considérablement.

Nous constatons de plus qu'entre 5 min et 1 h de traitement, les signaux ne diffèrent que de 10 mV et restent très proches du signal en milieu synthétique. Il semble donc que le traitement soit d'une efficacité presque totale dès les premières minutes de mise en contact entre les MS et le milieu sérique.

1.4.5. Nature des MS de traitement.

Nous avons pratiqué des essais de traitement par des MS de nature chimique différente de celles synthétisées au Laboratoire. Les MS testées sont à base de polystyrène:

- polybead hydroxylate microspheres (2.5% solids latex); diamètre de 2030 nm (Polysciences).
- latex calibré; diamètre de 200 nm (Prolabo).
- latex calibré; diamètre de 800 nm (Prolabo).

Les MS sont concentrées par centrifugation à 12000 t/min pendant 10 min et le culot de MS est repris par du tampon PBS; les concentrations finales sont de 45.5 mg/ml pour les MS hydroxylées, de 10 mg/ml pour celles de 200 nm, et de 33.3 mg/ml pour celles de 800 nm.

8 dilutions de raison 2 sont effectuées à partir des 3 suspensions précédentes; chacune est mise en présence du pool pendant 1 h. Un témoin pool traité par les MS-Eth est inclus dans l'essai. Les surnageants sont introduits dans le système MS-Mb/As de lapin anti-Mb.

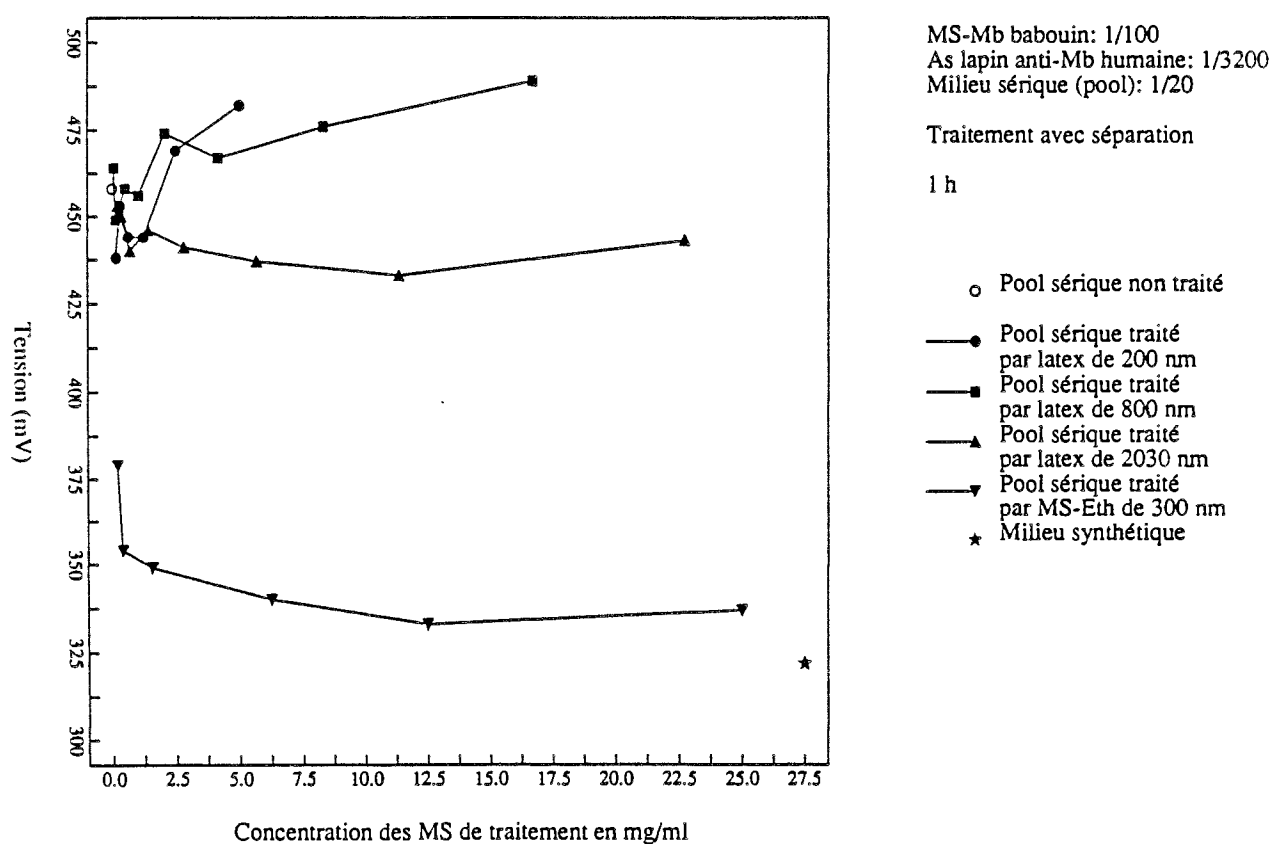
La figure 37 montre les profils obtenus pour chaque lot de MS de traitement.

Le traitement du pool par des concentrations croissantes de MS-Eth permet de stabiliser complètement les signaux dès 12 mg/ml. En revanche, aucune stabilisation n'est observée après traitement par les lots de MS de polystyrène, même pour de fortes concentrations en MS.

Les MS de polystyrène se comportent vis-à-vis du sérum tout à fait différemment des MS-Eth; elles ne permettent pas de stabiliser les signaux d'agglutination. Elles ne semblent pas retenir les constituants qui interfèrent avec les signaux d'agglutination, en supposant que notre hypothèse de travail soit exacte.

En conclusion, le traitement du milieu sérique par une suspension de MS permet d'éliminer rapidement (quelques minutes) l'effet sérique déstabilisant les MS-Mb.

Figure 37 Valeurs des 100% d'agglutination du système MS-Mb/As lapin anti-Mb humaine en milieu sérique traité - Influence de la nature des MS de traitement



L'efficacité du traitement est indépendante du produit couplé sur les MS utilisées et de leur diamètre. Par contre elle est liée à la concentration de ces MS et à leur structure chimique.

1.5. Influence du traitement sur la concentration sérique en myoglobine.

Des quantités connues de myoglobine sont ajoutées aux sérums, que l'on comparera aux quantités dosées après traitement. Cette démarche a pour objectif de vérifier que le traitement n'affecte pas la teneur des sérums en myoglobine.

1.5.1. Conditions expérimentales.

5 surcharges de myoglobine humaine sont réalisées chacune dans 5 sérums humains différents, dont la teneur initiale en myoglobine est inférieure au seuil de détection de la trousses Behring sur lame. Les concentrations finales de Mb dans les sérums non dilués s'étendent de 94 ng/ml à 1500 ng/ml.

Le pool est enrichi également par des surcharges de myoglobine; ce milieu servira pour étalonner la réaction d'inhibition.

Sérums et pool sont traités suivant le protocole décrit précédemment, par une suspension de MS-Mb à raison de 7 mg/ml de milieu sérique. Mais, contrairement aux sérums, le pool est traité avant d'être surchargé en myoglobine. Celle-ci est ajoutée afin d'obtenir une gamme de concentrations finales s'échelonnant de 72 ng/ml à 2920 ng/ml. Les sérums sont incubés une nuit à 4°C en présence des dilutions de myoglobine, afin que cette molécule adopte sa conformation d'équilibre dans le milieu biologique; ils ne sont traités qu'après cette étape.

La myoglobine contenue dans les sérums traités est dosée en référence à l'étalonnage réalisé en pool traité. Les tests néphélométriques sont effectués dans le système MS-Mb / As de lapin anti-Mb au 1/500 en tampon de néphélométrie à 3% de PEG, le milieu sérique est introduit au 1/20 final. Le temps de réaction est de 30 min.

1.5.2. Résultats.

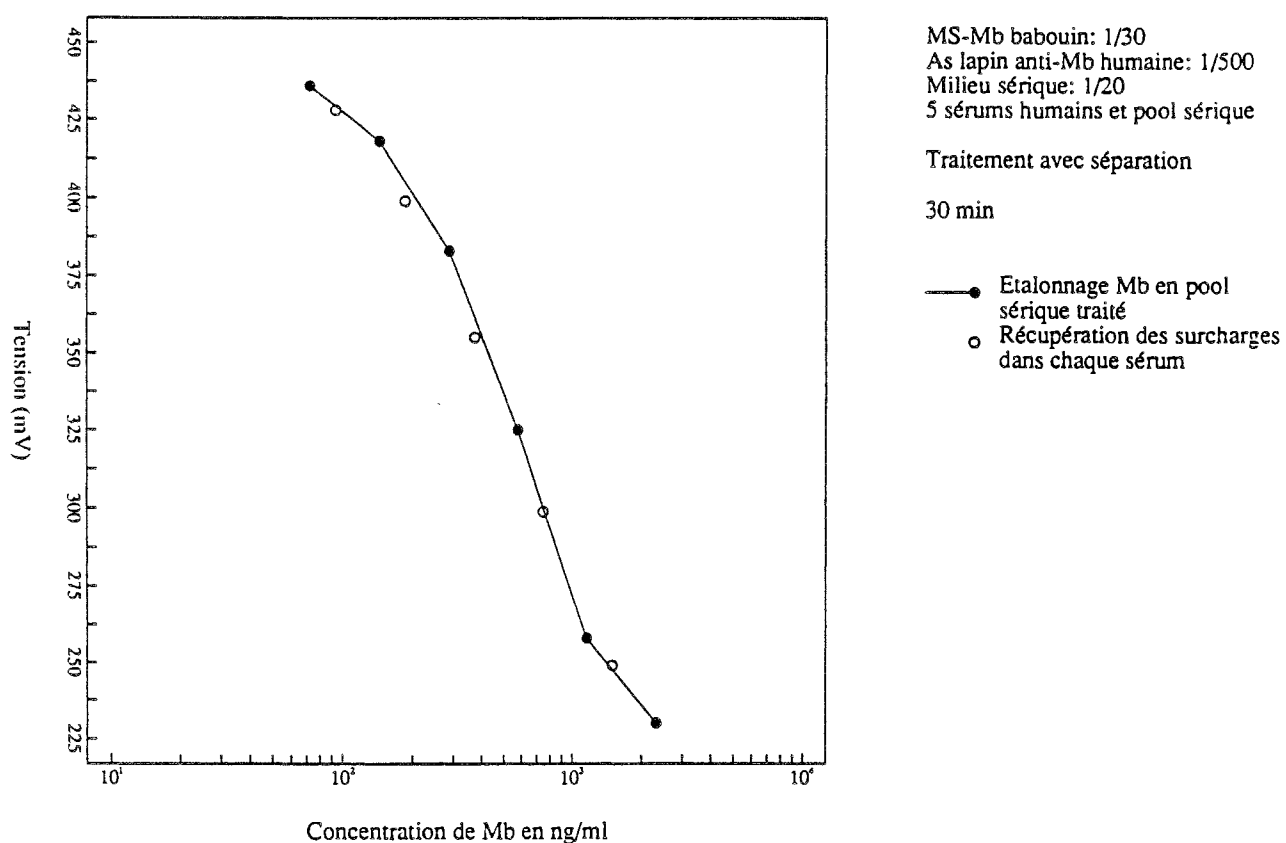
La figure 38 illustre la courbe d'étalonnage de la myoglobine en pool traité. Les résultats des 5 sérums surchargés en myoglobine puis traités sont pratiquement superposés à la courbe d'étalonnage. Les concentrations de myoglobine mesurées pour ces sérums ont été comparées aux concentrations théoriques introduites, ce qui permet de calculer les pourcentages de récupération ci-dessous:

Récupération de la myoglobine dans 5 sérums humains surchargés puis traités.

Concentration théorique (ng/ml)	Concentration mesurée (ng/ml)	récupération %
94	103	110
187	222	119
375	420	112
750	742	99
1500	1335	89

La moyenne des pourcentages de récupération est de 106%, son écart-type de 11.82%. La droite de régression linéaire est caractérisée par un coefficient directeur de 0.86, l'ordonnée à l'origine est de 64 ng/ml. Le coefficient de corrélation r est de 0.99 (p = 0.001).

Figure 38 Etalonnage de la Mb humaine - Récupération des surcharges de Mb de cinq sérums humains traités



Aucune perte de myoglobine ne semble donc intervenir durant l'étape de traitement des sérums. La récupération est quasi linéaire sur une gamme de concentrations importante, de 94 ng/ml à 1500 ng/ml.

En conclusion, le dosage de la myoglobine en milieu sérique au 1/20 est réalisable en 30 min à condition de traiter préalablement les échantillons sériques et le pool de sérums utilisé pour l'établissement de la courbe d'étalonnage. Nous avons tenté de réduire le temps de lecture à 15 min, en concentrant davantage les réactifs, comme cela avait été obtenu dans la deuxième partie.

1.6. Dosage de la myoglobine en 15 min en milieu sérique au 1/10 final.

1.6.1. Traitement du milieu sérique.

Le pool et les sérums individuels ont été traités par des MS-Eth (MS 1006) dont nous avons recherché la concentration requise pour stabiliser le pool lorsqu'il est utilisé au 1/10.

La solution de MS-Eth à 50 mg/ml est introduite pure en présence du pool; des dilutions de raison 2 de la suspension stock de MS-Eth sont effectuées, de 0.195 mg/ml à 25 mg/ml; chacune des concentrations est incubée en présence d'un volume identique de pool selon le protocole décrit précédemment.

Les conditions des tests d'agglutination sont les suivantes:

- Chaque surnageant de centrifugation (pool T, pool NT, ms) est mis en présence de l'As de lapin anti-Mb prédilué au 1/40 en tampon de néphélémétrie contenant 5% de PEG.
- Les MS-Mb sont ajoutées dans chaque cuve. Les volumes sont complétés à 300 µl par addition de tampon de néphélémétrie. Les signaux d'agglutination sont lus après 15 min d'incubation.

Le traitement du pool étant effectué au 1/2 et celui-ci étant mis en réaction au 1/5, il se trouve dilué au 1/10 dans les cuves. Le milieu réactionnel final contient 3% de PEG.

La figure 39 représente les signaux obtenus en fonction de la concentration des MS-Eth de traitement. Les signaux de déstabilisation liés à l'introduction du pool traité chutent de façon importante pour des concentrations de MS-Eth situées entre 0 et 12.5 mg/ml, puis se stabilisent: ils sont alors équivalents au signal d'agglutination en milieu synthétique.

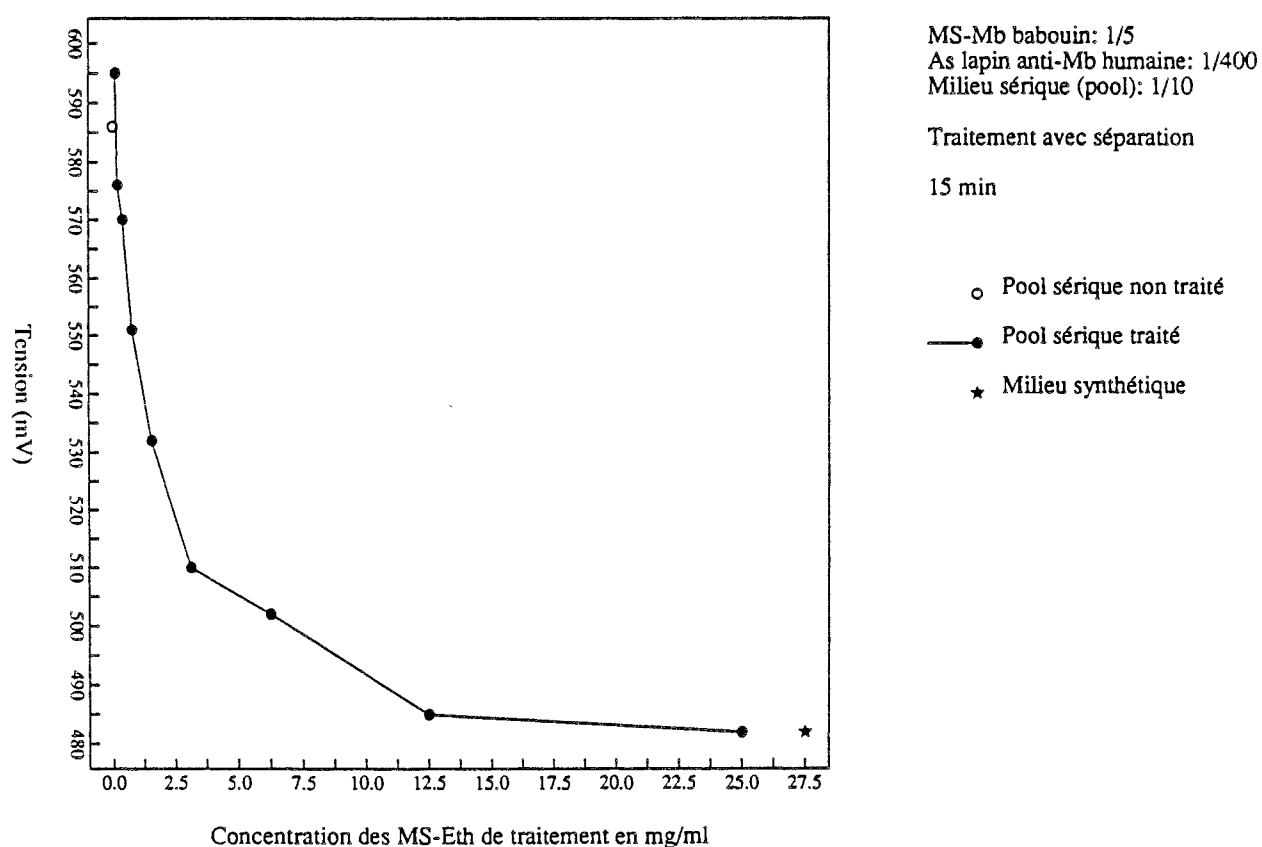
Ces résultats montrent que le pool traité par 12.5 mg/ml d'une suspension de MS-Eth peut être introduit au 1/10 final dans le système agglutinant sans perturber les signaux spécifiques d'agglutination par rapport au milieu synthétique.

Le traitement des 30 sérums individuels par 12.5 mg de MS-Eth permet de retrouver les mêmes effets favorables sur la déstabilisation que ceux précédemment obtenus par 5 mg/ml de MS de traitement; la dispersion globale est cependant ici plus resserrée.

1.6.2. Inhibition de l'agglutination MS-Mb / As anti-Mb par la myoglobine contenue en milieu sérique - Faisabilité du dosage en 15 min sur sérum au 1/10.

Le pool traité par les MS-Eth est additionné de myoglobine pour couvrir un domaine de concentration allant de 45 ng/ml à 1.5 µg/ml de pool non dilué. La même gamme de myoglobine est préparée en milieu synthétique et en pool non traité. Le protocole d'addition de l'As de lapin anti-Mb et des MS-Mb est identique à celui décrit précédemment.

Figure 39 Valeurs des 100 % d'agglutination du système MS-Mb/As lapin anti-Mb humaine en milieu sérique traité - Influence de la concentration des MS-Eth de traitement



Les résultats sont présentés sur la figure 40. Les courbes obtenues en milieu synthétique ou en sérum traité au 1/10 sont très proches; les signaux de la courbe en milieu sérique sont cependant légèrement inférieurs, vraisemblablement en raison de très faibles quantités de myoglobine. En sérum non traité, la courbe est, comme nous l'avons déjà constaté, très décalée par la déstabilisation aspécifique.

La plage de concentrations accessible permet de déceler les concentrations normales et pathologiques de myoglobine.

1.6.3. Validation du dosage de la myoglobine en milieu sérique.

Le dosage de myoglobine en 15 min a été validé par une étude de la précision (répétabilité intra-essai et inter-essai) et de l'exactitude de la méthode (étude de la récupération (surcharges), comparaison avec la méthode sur lame (test Behring)).

1.6.3.1. Précision du dosage.

Deux sérums différents contenant peu ou pas de myoglobine (test de détection sur lame négatif) ont été surchargés de myoglobine à deux concentrations, l'une en limite des valeurs normales (92 ng/ml), l'autre moyennement pathologique (370 ng/ml). Les surcharges ont été introduites sous un faible volume, pour ne pas modifier significativement la concentration des constituants sériques et incubées pendant une nuit. Le traitement s'effectue au 1/2 par la suspension de MS-Eth (12.5 mg/ml) selon le protocole décrit précédemment. Les sérums traités sont introduits dans les cuves et testés vis-à-vis d'un étalonnage en pool traité; à la différence des sérums, le pool est traité avant l'incubation avec les dilutions de myoglobine.

L'étude de la répétabilité intra-essai est réalisée sur les échantillons sériques dosés 20 fois avec le même étalonnage, s'étendant de 45 ng/ml à 11575 ng/ml de sérum pur représenté sur la figure 41. Les résultats suivants sont obtenus:

Répétabilité intra-essai du dosage de la myoglobine sur 20 échantillons.

Mb mesurée (moyenne) (ng/ml)	89	461
Ecart-type (ng/ml)	4.9	13.7
CV (%)	5.5	2.9

Les coefficients de variation sont acceptables, notamment dans la zone de concentration la plus faible, en limite des valeurs pathologiques, où la précision des résultats est d'une importance primordiale. Pour la concentration la plus élevée, le coefficient de variation est également satisfaisant.

La répétabilité inter-essai analyse plusieurs fois de suite le même sérum vis-à-vis d'autant d'étalonnages. Le protocole est identique à celui de la répétabilité intra-essai; un sérum enrichi à 368 ng/ml est testé 5 fois avec 5 étalonnages différents. Les résultats sont les suivants:

Figure 40 Inhibition de l'agglutination MS-Mb/As lapin anti-Mb humaine par la Mb humaine en milieu synthétique ou en milieu sérique concentré traité

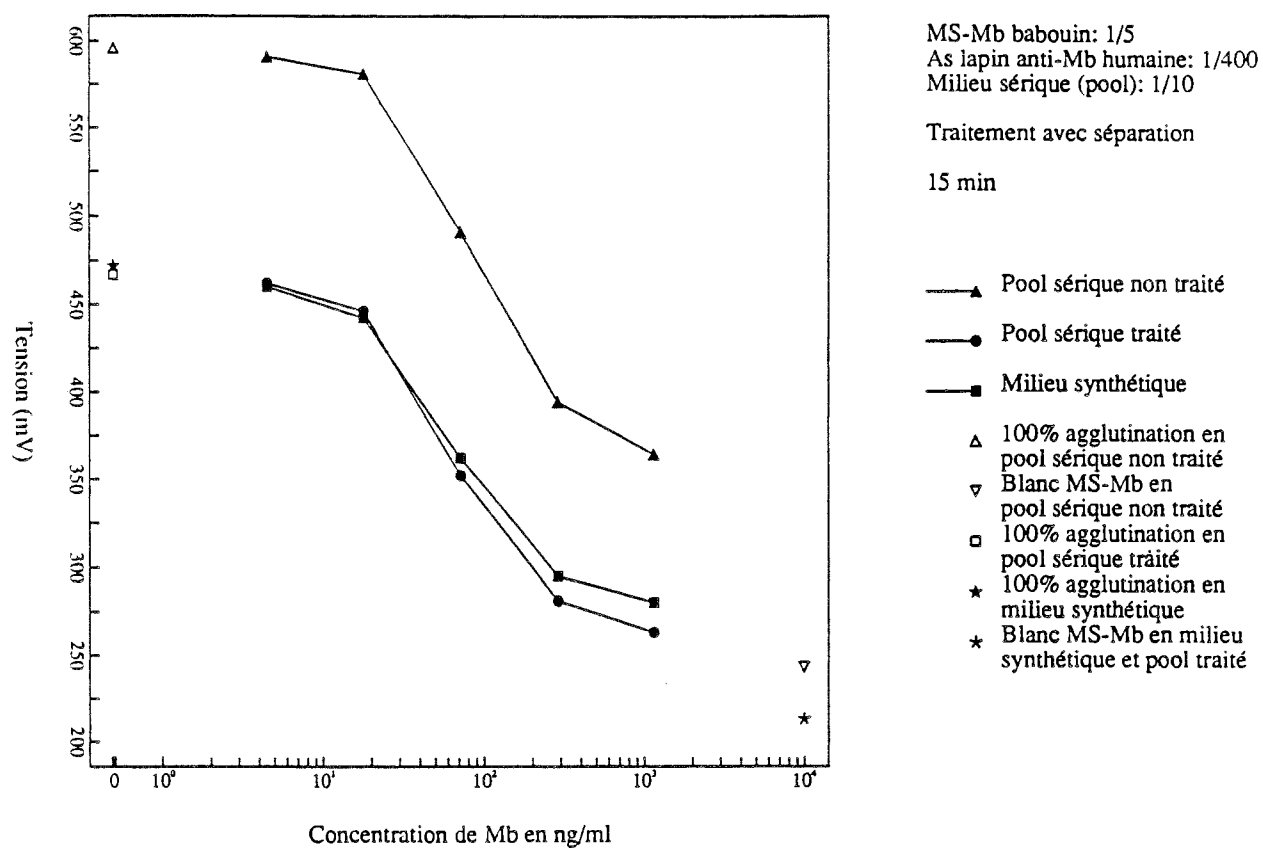
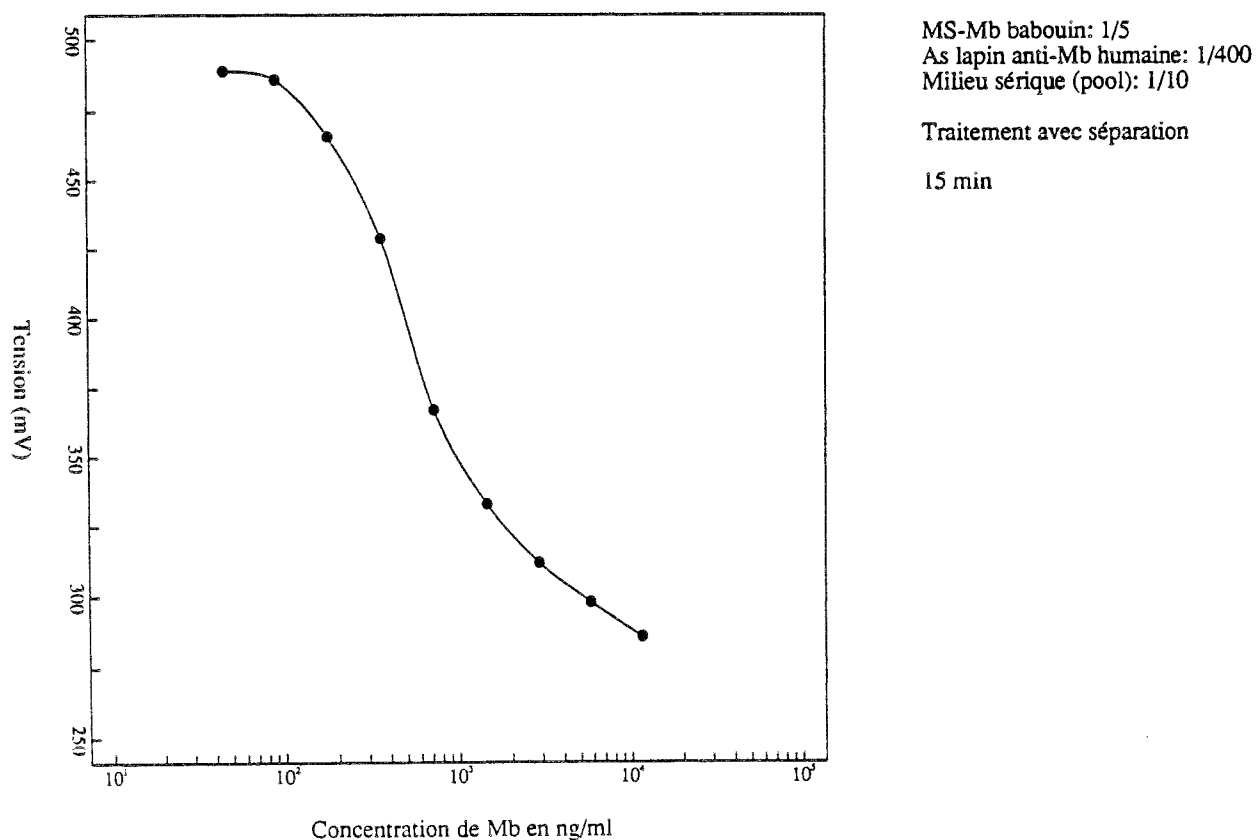


Figure 41 Etalonnage en milieu sérique humain traité



Répétabilité inter-essai du dosage de la myoglobine sur 5 échantillons.

Mb mesurée (moyenne) (ng/ml)	392
Ecart-type (ng/ml)	31.7
CV (%)	8.7

Le coefficient de variation est satisfaisant ici aussi.

1.6.3.2. Exactitude de la méthode.

1.6.3.2.1. Etude de récupération de la myoglobine.

3 sérums sont enrichis de Mb humaine à 4 concentrations différentes, traités puis dosés vis-à-vis de l'étalonnage réalisé en pool traité.

Avant surcharge, l'un des sérums dosés renferme 45 ng/ml de myoglobine qui seront retranchés des valeurs de myoglobine mesurée. Les deux autres sérums contiennent moins de 22 ng/ml de myoglobine. Les résultats obtenus sont portés dans le tableau ci-dessous:

Récupération de la myoglobine en milieu sérique humain traité.

Mb ajoutée (ng/ml)	5750.0	1437.5	718.7	179.7
Mb récupérée ng/ml (moy.)	5556.4	1708.0	739.7	196.6
% récupération	96.6	118.8	102.9	109.3

Le pourcentage moyen de récupération est de 106.9% avec un écart-type de 9.5%. La droite de régression (figure 42) représentant les concentrations récupérées en fonction des concentrations ajoutées est définie par l'équation suivante:

$$y = 126.8 + 0.95 x$$

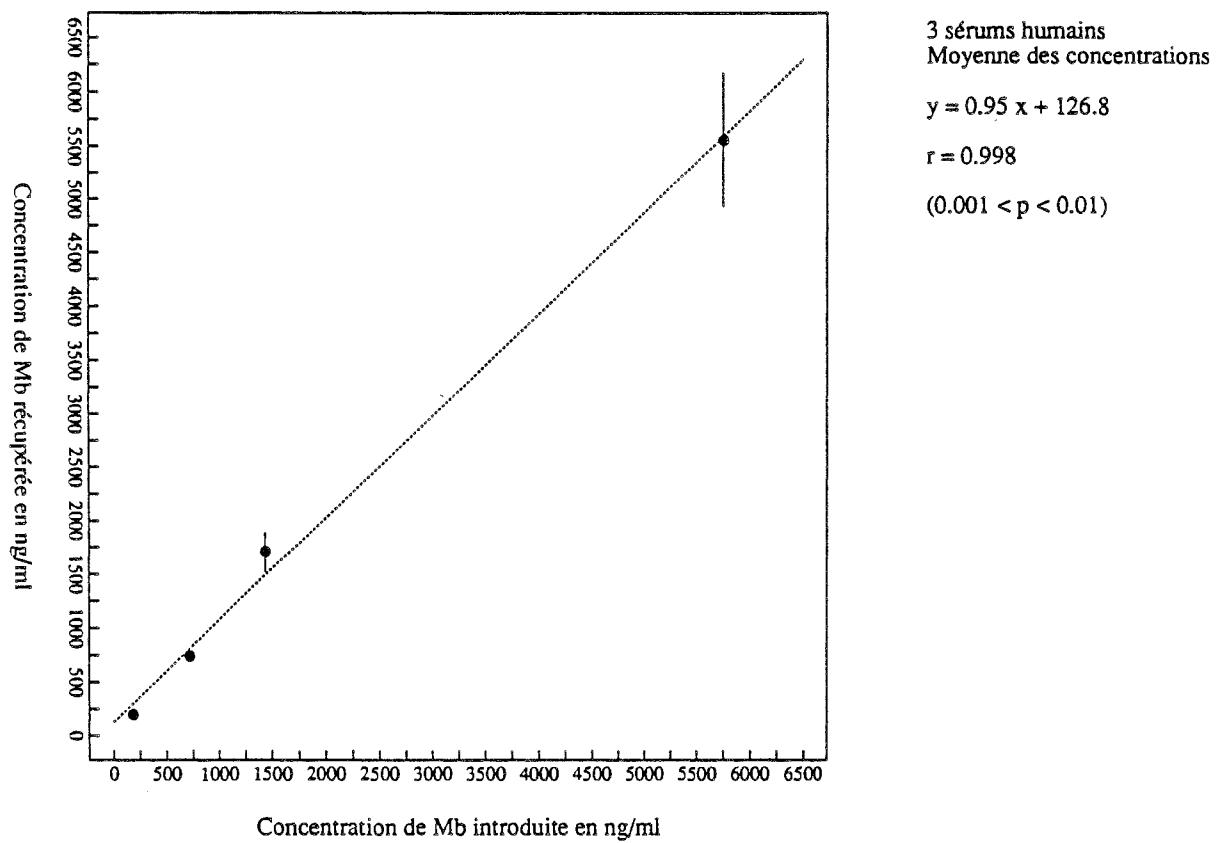
Le coefficient de corrélation s'élève à 0.998 ($0.001 < p < 0.01$).

1.6.3.2.2. Comparaison de la méthode immunonéphélométrique avec le test sur lame Behring.

L'exactitude de la méthode est évaluée en dosant en parallèle la même série de 30 sérums traités, d'une part en néphélométrie par inhibition, d'autre part par le test sur lame. Le système d'inhibition est celui décrit ci-dessus, mais les cuves sont lues après 30 min de réaction, de façon à augmenter la précision dans le domaine des faibles concentrations de myoglobine, le seuil de détection étant plus bas. L'étalonnage est réalisé en pool traité.

Les résultats sont les suivants:

Figure 42 Récupération de la Mb dans le sérum humain



Comparaison de la méthode d'inhibition et du test sur lame pour la détermination de myoglobine de 30 sérums humains traités.

N° Sérum	Inhibition (ng/ml)	Titre Behring
1	< 18	-
2	< 18	-
3	30	-
4	23	-
5	51	-
6	< 18	-
7	27	-
8	< 18	-
9	< 18	-
10	< 18	-
11	< 18	-
12	< 18	-
13	34	-
14	34	-
15	< 18	-
16	< 18	-
17	< 18	-
18	< 18	-
19	< 18	-
20	23	-
21	< 18	-
22	< 18	-
23	< 18	-
24	< 18	-
25	590	+ 1/2
26	< 18	-
27	22	-
28	< 18	-
29	< 18	-
30	< 18	-

- Dans 1 sérum (3% de la population étudiée), le n° 25, la concentration est supérieure au seuil pathologique de la myoglobine (environ 100 ng/ml), aussi bien par le test sur lame que par néphélométrie; la dilution au 1/2 provoque une agglutination sur lame, correspondant environ à 200 ng/ml de myoglobine (111). En néphélométrie, la concentration trouvée est de 590 ng/ml.
- 21 sérums (70%) contiennent moins de 18 ng/ml et sont négatifs sur lame.
- 8 sérums (27%) contiennent entre 18 et 50 ng/ml mais sont négatifs sur lame; le seuil de détection plus élevé de ce test ne permet pas de les doser.

Les résultats néphélométriques concordent avec ceux obtenus sur lame. Après traitement, la perturbation du système MS-Mb / As de lapin anti-Mb induite par la présence des constituants sériques est suffisamment amoindrie pour ne plus fausser les résultats des dosages.

En conclusion, les résultats démontrent la faisabilité du dosage néphélométrique de la myoglobine sérique par inhibition de l'agglutination en 15 min. Le chapitre suivant décrira l'application de ce protocole à la détection de la myoglobine contenue dans des sérums infarctiques.

2. Application du traitement à la détermination de la myoglobine par le système sandwich MS-Acm / Mb / As de lapin anti-Mb / As de chèvre anti-Ig de lapin.

La mise au point de ce système a été détaillée dans la deuxième partie de notre mémoire. Sa sensibilité de détection d'environ 2 ng/ml autorise un dosage de la myoglobine en 1 h 30 min en milieu sérique dilué au 1/50. Elle nécessite cependant un prétraitement des milieux sériques pour éviter la déstabilisation des MS-Acm.

2.1. Conditions expérimentales.

2.1.1. Etapes réactionnelles.

La réaction s'effectue en trois phases, dont nous rappelons succinctement les conditions et le déroulement:

- Mise en réaction des MS-Acm (Acm F193 17A10) avec la myoglobine à doser dans un domaine de concentrations de 1.12 ng/ml à 71.87 ng/ml. Un temps d'incubation entre ces deux réactifs n'est pas nécessaire.
- Addition de l'As de lapin anti-Mb au 1/800 final; une incubation de 1 h est indispensable.
- Ajout de l'As de chèvre anti-Ig de lapin au 1/500 final; la lecture des cuves intervient après 30 min de réaction.

2.1.2. Traitement de l'As de chèvre anti-Ig de lapin.

Nous avons montré dans la deuxième partie (cf. Ch.I.2.2.2.2.2.) que l'As anti-Ig de lapin au 1/500 déstabilisait les MS-Acm.

Ce phénomène pourrait être du au fait qu'une ou plusieurs espèces moléculaires présentes dans l'As se fixent sur les MS et en modifient la stabilité.

Un traitement de l'As par une suspension de MS-Eth a donc été tenté, selon un protocole analogue à celui utilisé pour les sérums humains. La dilution du milieu sérique est cependant modifiée: l'As anti-Ig de lapin est traité au 1/25 par la suspension de MS au 1/2 et le surnageant de traitement est ensuite introduit au 1/20 dans les cuves de réaction.

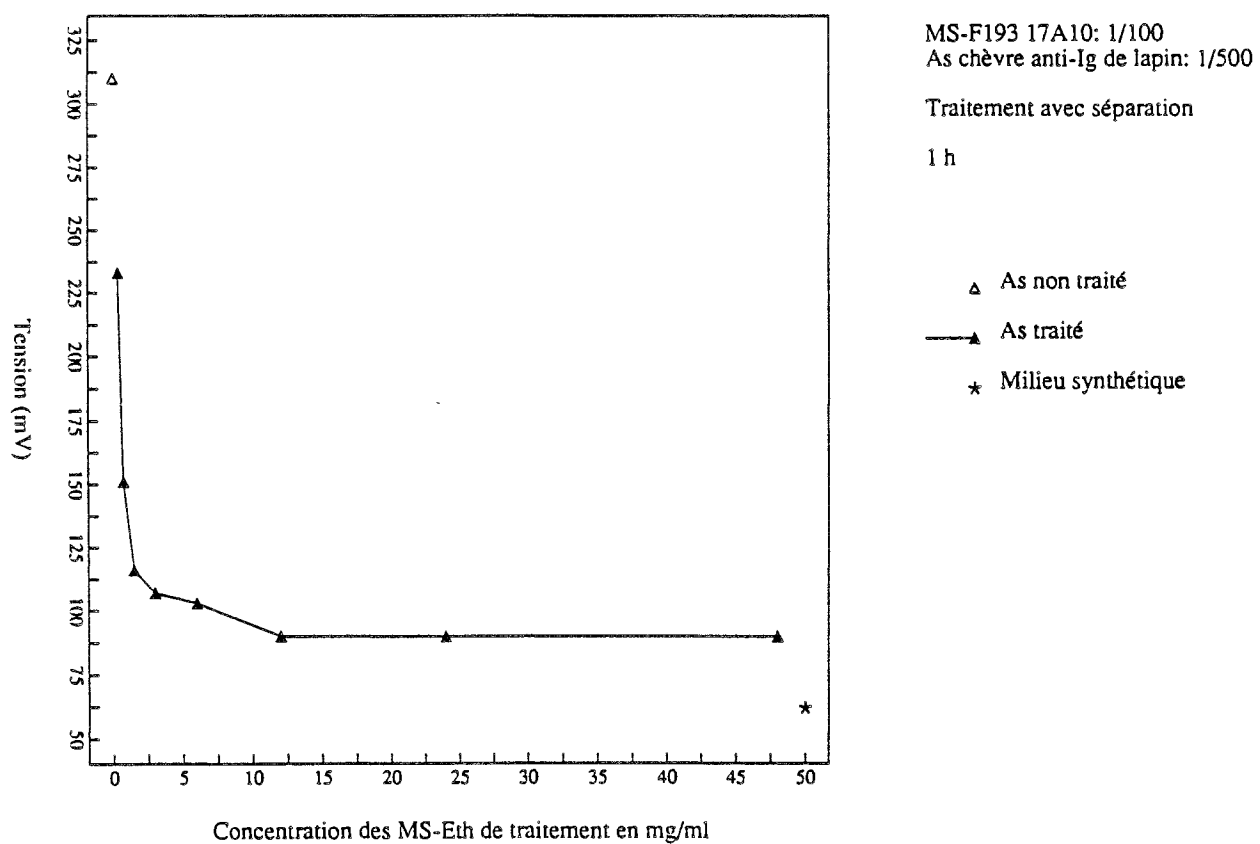
Nous avons recherché la concentration minimale de MS-Eth de traitement nécessaire pour éliminer l'effet déstabilisant de l'As anti-Ig de lapin, en comparant l'évolution des blancs MS-Acm en présence des surnageants traités et non traités introduits au 1/20.

La figure 43 présente les signaux obtenus en 1 h en milieu sérique non traité ou traité par des concentrations croissantes de MS. Les intensités chutent rapidement de 310 mV à 80 mV lorsque la concentration en MS de traitement augmente jusqu'à 12 mg/ml. Un plateau est ensuite constaté pour les deux dernières dilutions des MS-Eth. L'"effet dose" des MS de traitement, précédemment constaté, est à nouveau observé.

Nous notons cependant la persistance d'une faible déstabilisation résiduelle, le signal obtenu après traitement restant légèrement supérieur au blanc MS.

Le traitement prouve une fois de plus son efficacité pour combattre l'effet sérique en présence, ici, de MS-Acm.

Figure 43 Valeurs du blanc MS-Acm en présence de l'As anti-Ig de lapin traité
Influence de la concentration en MS-Eth de traitement de l'As



2.2. Réaction As de lapin anti-Mb / As de chèvre anti-Ig de lapin en milieu sérique.

Le milieu sérique utilisé pour l'étalonnage est un pool de huit sérums humains dépourvus de myoglobine et de facteurs rhumatoïdes. Il est traité au 1/2 par 12 mg/ml de MS-Eth.

La réaction espèce / anti-espèce est testée en présence et en absence du pool de sérums traité afin de déceler d'éventuelles interférences de ce milieu. Le pool traité est introduit au 1/10, l'As de lapin anti-Mb est au 1/800 final et l'As de chèvre anti-Ig de lapin traité au 1/500.

La figure 44 illustre les cinétiques de précipitation lapin / anti-lapin en milieu liquide avec ou sans sérum. En l'absence de pool, la cinétique est plus rapide et les signaux sont plus élevés qu'en présence du pool. A 30 min de réaction, on observe une différence de 45 mV. La réaction est donc modifiée en présence de ce pool; ceci pourrait s'expliquer par une réaction croisée des Ac anti-Ig de lapin vis-à-vis des Ig humaines.

2.3. Faisabilité et validation du dosage de la myoglobine en milieu sérique au 1/50.

2.3.1. Faisabilité du dosage.

Les étapes de mise en réaction sont celles décrites précédemment.

Le pool traité et enrichi de concentrations de myoglobine de 56 ng/ml à 3593.5 ng/ml de sérum pur est introduit au 1/50 final (16 µl). Les volumes de myoglobine et de pool utilisés sont tels que l'addition de myoglobine ne perturbe pas significativement la dilution finale.

La figure 45 montre la courbe d'étalonnage obtenue: le domaine de concentrations de myoglobine dosables est large et permet de détecter les concentrations normales et pathologiques.

2.3.2. Précision du dosage.

2.3.2.1. Répétabilité intra-essai.

Trois sérums surchargés en myoglobine, exempts de myoglobine intrinsèque décelable et de facteurs rhumatoïdes sont dosés après traitement par des MS-Eth 20 fois avec le même étalonnage réalisé en pool traité.

Ces sérums ont été préalablement incubés une nuit à 4°C en présence de concentrations de myoglobine variables (92 ng/ml, surcharge faible; 368 ng/ml, surcharge moyenne; 900 ng/ml, surcharge forte). Ils sont dosés dans les mêmes conditions expérimentales que le pool traité.

Les résultats des dosages sont résumés dans le tableau ci-dessous:

Figure 44 Cinétique de précipitation de la réaction As lapin anti-Mb humaine/
As chèvre anti-Ig de lapin en milieu sérique traité

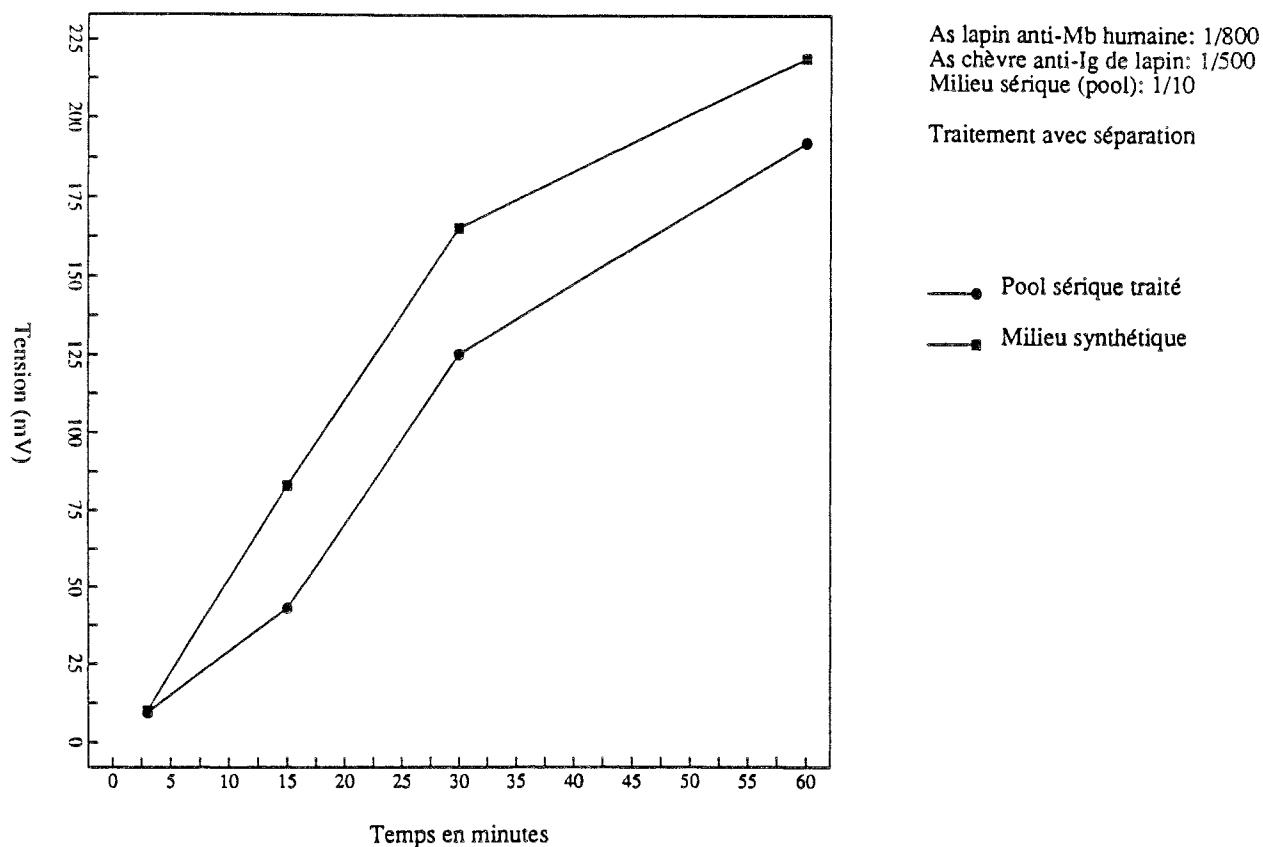
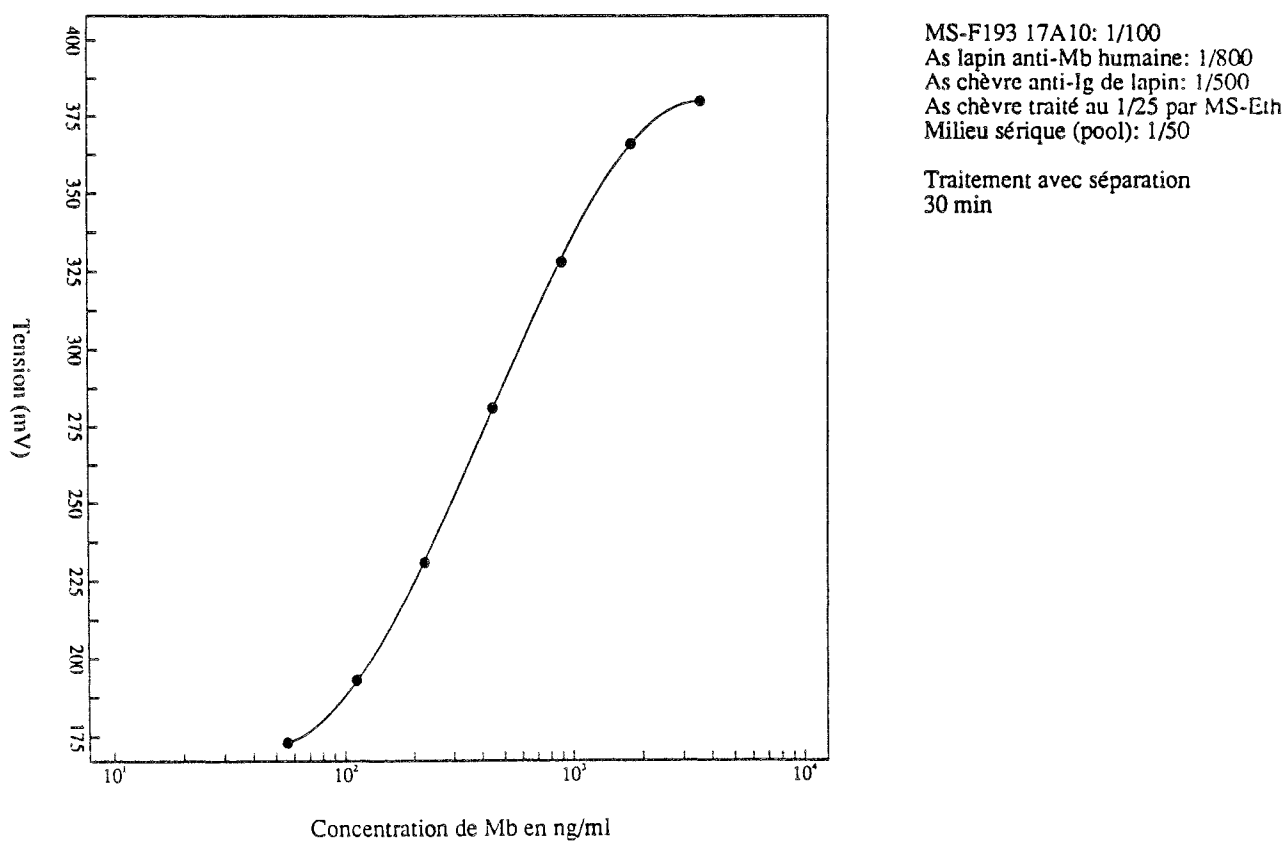


Figure 45 Etalonnage en milieu sérique humain traité



Répétabilité intra-essai du dosage de la myoglobine (les 3 sérums sont dosés 20 fois).

Mb mesurée (moyenne) (ng/ml)	94.3	282.4	869.9
Ecart-type (ng/ml)	5.4	22.7	76.5
CV (%)	5.7	8	8.8

Les coefficients de variation sont satisfaisants; le domaine où les concentrations commencent à devenir pathologiques offre le meilleur cv.

2.3.2.2. Répétabilité inter-essai.

Un sérum renfermant une concentration moyenne de myoglobine (370 ng/ml) est dosé 5 fois à l'aide de 5 étalonnages différents; les résultats sont les suivants:

Répétabilité inter-essai du dosage de la myoglobine sur 5 échantillons.

Mb mesurée (moyenne) (ng/ml)	351
Ecart-type (ng/ml)	20.5
CV (%)	5.8

De même que pour la répétabilité intra-essai, le coefficient de variation est satisfaisant pour une concentration moyenne de myoglobine.

2.3.3. Exactitude de la méthode: étude de la récupération.

Les pourcentages de récupération ont été calculés à partir des résultats de l'étude de répétabilité intra-essai portant sur trois sérums surchargés de myoglobine et dosés chacun 20 fois avec le même étalonnage. Ils sont portés dans le tableau ci-dessous:

Récupération de la myoglobine en milieu sérique humain traité (dosé 20 fois).

Mb ajoutée (ng/ml)	92	370	900
Mb récupérée (ng/ml)	94.3	282.4	869.9
% récupération	102.5	76.3	96.7

Le pourcentage moyen de récupération est de 91.6% (écart-type de 13.5%) pour l'ensemble des 60 dosages. La récupération ne semble pas totale. Une explication partielle possible est l'interférence des réactions croisées que nous avons précédemment observées en présence de sérum. Elles se traduisent par une diminution de la réaction espèce / anti-espèce,

plus ou moins marquée d'un échantillon de sérum à l'autre et par rapport au pool traité servant à l'étalonnage.

Ce problème pourrait être résolu par l'emploi d'As anti-Ig de lapin ne croisant pas avec les protéines sériques humaines.

La droite de régression linéaire de la concentration récupérée en fonction de la concentration ajoutée fournit l'équation suivante:

$$y = -28.36 + 0.98 x$$

$$(r = 0.994)$$

3. Conclusions.

Les éléments sériques déstabilisant les MS-Mb et les MS-Ac peuvent être éliminés de façon efficace en prétraitant les sérums humains par des MS de même composition que celles utilisées pour le dosage. Des MS de diamètre important peuvent être utilisées, que l'on séparera du sérum par centrifugation; des MS de faible diamètre introduites dans le milieu réactionnel ont le même effet favorable sur la déstabilisation, elles présentent l'avantage d'éviter l'étape de centrifugation.

Le traitement mis en oeuvre pour éliminer les agents sériques déstabilisant les MS permet de concevoir deux procédés de dosages de la myoglobine sérique:

- Un dosage par une méthode sandwich, nécessitant des temps de mise en réaction longs. Sa faisabilité est démontrée, sa fidélité est satisfaisante bien que la récupération ne soit pas totale, vraisemblablement en raison de réactions croisées de l'As de chèvre anti-Ig de lapin utilisé.
- Un dosage en 15 min par inhibition de l'agglutination. Sa fidélité et son pourcentage de récupération sont satisfaisants. Ses résultats sont bien corrélés à ceux du test sur lame. Son application au dosage de myoglobine en pathologie humaine fera l'objet du chapitre suivant.

CHAPITRE II: Dosages par inhibition de la myoglobine de sérums de patients atteints d'infarctus du myocarde.

1. Introduction.

Le système d'inhibition précédemment décrit a été appliqué au dosage de la myoglobine contenue dans des sérums humains infarctiques provenant de services hospitaliers de Nancy. Ses résultats ont été comparés à ceux du dosage par radioimmunologie et du test de détection rapide sur lame afin de valider sa fiabilité.

Les dossiers cliniques de chaque patient ont pu être consultés; ils nous ont permis d'effectuer une analyse clinique des résultats.

2. Population étudiée - Dosages effectués.

2.1. Patients explorés.

2.1.1. Répartition.

L'étude comporte 25 patients, numérotés de 16 à 40 (19 hommes soit 76% des cas et 6 femmes soit 24% des malades, moyenne d'âge de 60 ans pour un domaine de variation de 37 à 88 ans), admis pour la plupart au service de réanimation de Cardiologie de l'hôpital Central de Nancy; les patients 16 et 19 ont été hospitalisés dans une clinique privée de Nancy.

Les patients 18 et 23 ont déjà souffert d'un infarctus dans les 10 dernières années; leur diagnostic d'entrée est une angine de poitrine spontanée, nécessitant leur hospitalisation en vue d'un traitement médical. Le malade 20 a été hospitalisé pour une menace d'infarctus myocardique, infarctus qui s'est constitué par la suite.

Tous les autres patients sont atteints d'un infarctus du myocarde, dont le diagnostic est établi à partir de signes cliniques, électriques et biologiques:

- Signes cliniques: La douleur représente le symptôme principal; c'est une douleur thoracique brutale et intense, prolongée au moins 30 min, irradiant vers les bras et la mâchoire. Elle n'est pas calmée par les médicaments trinitrés utilisés dans les douleurs d'angor et impose une hospitalisation immédiate.
- Signes électrocardiographiques: L'électrocardiogramme enregistre les phénomènes électriques accompagnant l'activité du muscle cardiaque; au stade initial de l'infarctus, il montre des anomalies de la repolarisation ventriculaire, traduisant l'existence d'une nécrose ou d'une lésion ischémique.
- Contrôles biologiques: Les enzymes (créatine phosphokinase (CPK), fraction MB de la CPK (CPK-MB), lactico-deshydrogénase (LDH) et transaminase glutamo-oxaloacétique (GOT)) relâchés dans la circulation par les cellules myocardiques lésées sont dosés par des réactions chimiques spécifiques dès l'admission du malade.

2.1.2. Délai d'admission.

Ce délai correspond au temps écoulé entre les premiers épisodes douloureux et l'entrée dans l'unité de réanimation cardiologique.

Il varie de 1 h à 24 h (moyenne de 5 h 30 min). Les patients (18) ayant subi un traitement fibrinolytique souffrent depuis moins de 4 h 30 min (moyenne de 3 h 10 min). Les malades (7) traités de façon conventionnelle sont hospitalisés entre 4 h et 24 h (moyenne de 11 h).

2.1.3. Siège de l'infarctus.

- Infarctus antérieur, résultant de l'occlusion de l'artère coronaire gauche descendante: 48% des malades.
- Infarctus postérieur, résultant de l'occlusion de l'artère coronaire droite descendante: 48%.
- Infarctus latéral, résultant généralement de l'occlusion de l'artère circonflexe gauche: 4%.

11 patients présentent des lésions étendues, réparties pour 8 d'entre eux dans la région antérieure, les 3 autres sont de localisation postérieure. Deux patients, le 32 et le 36, souffrant de lésions étendues, sont décédés respectivement à la 12^{ième} heure et au 3^{ième} jour d'hospitalisation. Seuls ces deux malades se trouvaient au stade ultime de gravité de la maladie (défaillance cardiaque gravissime).

2.1.4. Traitements.

Le traitement fibrinolytique destiné à dissoudre le thrombus, ou à stopper l'extension progressive de la taille de la nécrose est mis en place après le diagnostic. Plusieurs médicaments ont été administrés: la streptokinase, qui fut le premier fibrinolytique utilisé, l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA, Actilyse®), et le plus souvent le complexe streptokinase-plasminogène acylé (APSAC®).

Les patients hospitalisés plus tardivement ont été soignés par un traitement anticoagulant à base d'héparine.

2.2. Dosages effectués.

Pour chaque patient, nous disposons généralement de deux prélèvements au maximum (à l'exception du patient 16 pour lequel 4 prélèvements ont été obtenus), correspondant à des temps d'obtention variable. Le premier date en général de l'arrivée (H0) dans le service de réanimation, soit en moyenne 5 h 30 min après la constitution de la nécrose. Il est décrit par le numéro du patient suivi de la lettre A. Le second échantillon a été prélevé entre 1 et 6 jours après le premier, il est noté B.

Des dosages de myoglobine, de myosine (chaînes lourdes) et d'enzymes ont été effectués sur chacun de ces prélèvements.

La détection de la myosine a été réalisée par le test radioimmunologique (Myosine Irma Pasteur, réf. 79860, Eria Diagnostics Pasteur) au centre de Recherche Sanofi.

Les enzymes (CPK, CPK-MB, GOT, LDH) sont dosés à l'hôpital sur ces mêmes prélèvements, mais également sur d'autres obtenus à la 6^{ième} h (H6), la 12^{ième} h (H12), puis toutes les 24 h pendant 6 jours (H144).

La myoglobine est dosée par trois méthodes:

- La technique radioimmunologique: le dosage réalisé chez Diagnostics Pasteur utilise le coffret CEA Sorin.
- La technique de dépistage rapide par immunolatex (Behring): l'ensemble des prélèvements a été titré en dilution par cette méthode.
- L'inhibition de l'agglutination (Néphélia): le système et les conditions opératoires décrits dans le chapitre précédent ont été appliqués. La manipulation a pu être réalisée en une fois, étalonnée par rapport à un standard en milieu pool traité. Les sérums infarctiques dilués au 1/2 ont été prétraités dans les mêmes conditions par 12.5 mg/ml de MS-Eth, ils sont introduits dans les cuves au 1/10 final.

Valeurs physiologiques des protéines dosées.

	Concentration	
	U.I./l	ng/ml
GOT	5 - 25	
CPK	15 - 130	
CPK-MB	0 - 15	
Mb		< 85
Myosine		< 75

3. Résultats des dosages.

Le tableau 1 rassemble les résultats obtenus pour l'ensemble des protéines dosées. Les horaires des différents prélèvements sont indiqués. Les valeurs hors gamme sont définies par "inf" ou "sup":

- Inhibition (Néphélia): inf: < 45 ng/ml.
- RIA: inf: < 30 ng/ml, sup: > 1000 ng/ml.
- Myosine: sup: > 6000 ng/ml.

Les analyses statistiques de comparaison de moyennes de 2 échantillons ont été réalisées par le test de Student-Fisher (139), avec un risque d'erreur maximum compris entre 5% et 10%. Les comparaisons des résultats d'un même patient utilisent le test de Wilcoxon.

3.1. Résultats de chaque technique de dosage.

3.1.1. Myoglobine.

3.1.1.1. Néphélia.

Les prélèvements A renferment tous des concentrations pathologiques de myoglobine, à l'exception cependant du patient 20 qui se trouve en limite de positivité. Les prélèvements B présentent de façon significative ($p = 0.02$) des concentrations inférieures à celles des échantillons A.

Les patients 16 et 19 ont des taux faibles, respectivement de 200 ng/ml et 123 ng/ml, ceci peut s'expliquer par l'heure tardive de ces prélèvements.

Tableau 1 Résultats des dosages de la Mb, des enzymes cardiaques et de la myosine pour l'ensemble des prélèvements

Patient	Heure h	Néphélia ng/ml	RIA ng/ml	Test Behring	GOT U.I./l	CPK U.I./l	CPKMB U.I./l	Myosine ng/ml	Taille nécrose
16A	72	200	102	-		664		171	E
16B	96		71	-		245		464	E
16C	120	149	89	-		153		2417	E
16D	144	385	75	-				sup	E
17A	0	915	sup	+	63	200	14	124	E
17B	96	167	53	-	84	104		3687	E
18A	0	180	231	+/-	26	23		112	L
19A	96	123	55	-				298	L
20A	0	101	165	-	51	24		0	L
20B	120	226	207	-	39	33		141	L
21A	0	221	206	-	50	371	19	2621	L
21B	144	251	164	-	43	33		519	L
22A	0	1628	sup	+	274	2200	213		E
22B		215	238	-	274			127	E
23A	0	167	sup	-	22	61		0	L
23B	48	inf	69	-	31	73		1964	L
24A	0	5469	254	+	45	242	89		L
24B	144	210	78	-	44	91		sup	L
25A	96	180	801	-	39	66		1194	L
26A	0	371	327	+	25	119	119	0	E
26B	96	221	48	-	46	78		2865	E
27A	24	445	816	+	105	768	62	0	E
27B	120	186	81	-	23	49		1395	E
28A	24	532	143	+	120	741	32	330	E
29A	12	1192	162	+	182	1308		0	E
29B	96	221	inf	-	37	59		2944	E
30A	0	276	sup	+	17	93		0	L
31A		633	73	+	20	48		0	L
31B	96	158	inf	-	53	44		348	L
32A	0	371	671	+	30	60		0	E
33A	12	484	708	+	209	2202	112	0	E
33B	144	inf	73	+/-	31	62		3649	E
34A	0	176	329	+	46	79		196	L
34B	120	226	inf	-	27	45		2247	L

Tableau 1 (suite) Résultats des dosages de la Mb, des enzymes cardiaques et de la myosine pour l'ensemble des prélèvements

Patient	Heure h	Néphélia ng/ml	RIA ng/ml	Test Behring	GOT U.I./l	CPK U.I./l	CPKMB U.I./l	Myosine ng/ml	Taille nécrose
35A 35B	0 120	426 inf	454 59	+ -	49 49	130 131	12	158 0	L L
36A	0	149	276	+		53		0	E
37A	24	612	801	+	117	749	93	374	L
38A 38B	24 120	195 76	307 48	+ -	54 17	375 56	29	144 sup	L L
39A 39B	0 72	343 195	423 129	+ +/-	22 30	44 73		284 3247	L L
40A	72	186	462	+	45	244	32	115	E

Les numéros de patients sont suivis d'une lettre indiquant la chronologie des prélèvements. L'horaire H0 correspond à l'arrivée dans le service de soins.

Points hors gamme: notés "inf" ou "sup":

Mb:

Néphélia: inf: < 45 ng/ml

RIA: inf: < 30 ng/ml, sup: > 1000 ng/ml

Myosine: sup: > 6000 ng/ml

Test Behring:

+: positif en Mb

-: négatif en Mb

+ / -: interprétation douteuse

Taille de la nécrose:

E: étendue

L: limitée

Les patients 18 et 23 montrent des taux respectifs de 180 ng/ml et 167 ng/ml, ces malades souffrent d'une angine de poitrine.

Les taux de myoglobine des échantillons A des patients 20, 34 et 36 sont également peu élevés (respectivement 101 ng/ml, 176 ng/ml et 149 ng/ml); les prélèvements datent respectivement de 1 h, 2 h 30 min et 9 h 30 min, ils seraient soit trop précoces soit trop tardif.

En raison du nombre faible de prélèvements, les résultats ne permettent pas de conclure quant à l'heure précise d'apparition d'une concentration pathologique en myoglobine. Ils indiquent cependant que la myoglobine est libérée très tôt dans la circulation.

Les valeurs des prélèvements au delà de 72 h sont en moyennes significativement équivalentes (181.5 ng/ml (SD de 25 ng/ml) pour 72 h; 178.3 ng/ml (SD de 38 ng/ml) pour 96 h; 173 ng/ml (SD de 62 ng/ml) pour 120 h). Il semble que la myoglobine soit encore présente dans les échantillons à ces dates tardives.

La sensibilité diagnostique calculée sur l'ensemble des prélèvements obtenus à H0, soit environ à la 5^{ème} heure est de 93% (le malade 20 en limite de positivité étant douteux, il a été considéré comme étant négatif).

3.1.1.2. RIA.

Comme pour le test par inhibition, les valeurs des prélèvements A sont toutes significativement ($p < 0.001$) supérieures à celles des tubes B. Seul le patient 20 se démarque, mais le prélèvement correspond à 1 h. Les moyennes des prélèvements tardifs sont significativement ($p < 0.001$) plus faibles que pour le dosage par inhibition (97 ng/ml (SD de 64 ng/ml) pour 120 h; 104 ng/ml (SD de 52 ng/ml) pour 144 h). A ces horaires, la myoglobine a retrouvé son taux presque normal.

La sensibilité diagnostique calculée à partir des prélèvements obtenus à H0 est de 100% (le patient 31 présentant des taux négatifs aux deux prélèvements n'est pas pris en compte car nous ignorons la date du 1^{er} échantillon).

3.1.1.3. Test sur lame.

Les résultats reportés pour ce test sont exprimés sous forme qualitative +, - ou +/- selon que le test a montré une agglutination, une absence d'agglutination ou une interprétation douteuse. Les tests ont été effectués à l'aveugle. Nous avons rencontré des problèmes techniques avec cette méthode, les résultats ne sont pas superposables selon le lot de réactif utilisé. D'autre part, l'appréciation des résultats n'est pas aisée en raison du caractère qualitatif du test, elle est susceptible de variations selon le manipulateur.

A H0, le test détecte de la myoglobine dans la plupart des prélèvements. Trois patients font cependant exception (les 20, 21 et 23). Ces 3 patients ont des myoglobulinémies basses par le dosage Néphélia. Ils sont vraisemblablement en limite du seuil de positivité du test (100 ± 20 ng/ml). Les prélèvements tardifs sont en revanche tous négatifs sauf pour deux malades, les 33 et 39, dont les résultats sont douteux.

La sensibilité diagnostique de ce test calculée de la même façon que précédemment s'élève à 79%.

3.1.2. Myosine.

La myosine constitue un marqueur tardif de l'infarctus. A l'exception des patients 21 et 35, le taux de myosine est toujours plus élevé pour les prélèvements tardifs par rapport à H0. Le patient 16, pour lequel nous disposons de 4 échantillons montre nettement l'évolution

croissante de sa concentration en myosine, qui devient supérieure à 6000 ng/ml au 6^{ème} jour. Les différences entre les valeurs sont généralement importantes en raison de l'espacement dans le temps des 2 échantillons dosés. De plus de grandes variabilités inter-individuelles sont observées.

En moyenne, la myosine apparaît de façon significative ($0.02 < p < 0.05$) dans la circulation à partir de 72 h.

Le patient 20 présente des taux faibles de myosine (141 ng/ml). La myoglobulinémie de ce malade était également basse et ce, quelque soit la méthode de détection utilisée.

La sensibilité de la détection calculée sur les prélèvements tardifs sans tenir compte de leur date d'obtention est de 96%, seul le patient 35 montre un taux nul.

3.1.3. Enzymes.

Nous n'avons reporté dans le tableau que les taux correspondant aux prélèvements A et B. Mais ces enzymes ont été dosés régulièrement jusqu'au 6^{ème} jour, ce qui nous permet de suivre leurs cinétiques. Les figures 46 et 47 illustrent les profils pour deux malades représentatifs ; le 17 est atteint d'une nécrose étendue, le 35 d'une nécrose plus limitée.

Ces figures mettent en évidence la positivité de la myoglobulinémie dès H0 alors que les taux enzymatiques présentent encore des valeurs physiologiques normales (en limite pour le patient 17 qui souffre à H0 depuis 3 h 45 min). Nous sommes en accord avec la littérature (137).

Nous avons calculé ($p = 0.05$) la date d'apparition des taux pathologiques des CPK et CPK-MB; les résultats sont portés dans le tableau ci-dessous:

Evolution en heures des taux pathologiques de CPK et CPK-MB.

	Apparition	Pic	Disparition
CPK	5.05±2 (7.12±3.3)	11.4±31 (18.03±5.19)	69.75±13.91 (55.44±13.44)
CPK-MB	4.4±1.6 (4.31±1.35)	10.2±2.9 (16.17±4.37)	62.8±11 (51.23±14.46)

Les valeurs entre parenthèses sont celles apportées par la littérature (22). L'analyse par patient nous permet d'affirmer que la persistance d'un taux normal exclut le diagnostic d'infarctus (les patients 18 et 23 souffrant d'une angine de poitrine ont des taux normaux). Les sensibilités et valeurs prédictives négatives établies sur le pic de concentration sont de 100%.

Les 4 patients pour lesquels des taux pathologiques de CPK ont été constatés à H0 ont été hospitalisés plus de 4 h après les premières douleurs. Tous les autres sont négatifs, car les échantillons sont plus précoces.

En conclusion, nous confirmons par ces dosages les données apportées par la littérature:

- La myoglobine semble constituer le marqueur le plus précoce de l'infarctus. La sensibilité maximale est obtenue avec la méthode radioimmunologique mais les résultats du dosage par inhibition sont satisfaisants.
- La myosine est relâchée plus tardivement.

Figure 46 Exemple de cinétique de libération des enzymes de la cytolysé cardiaque

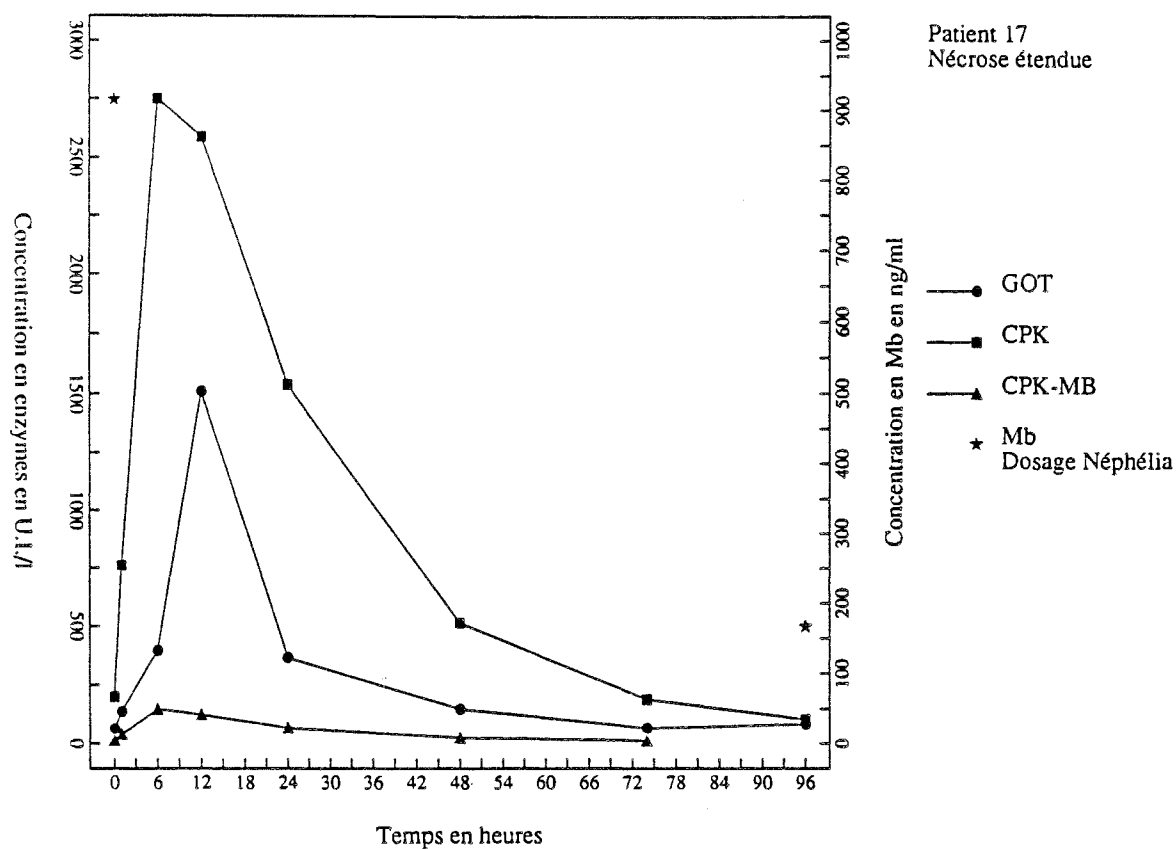
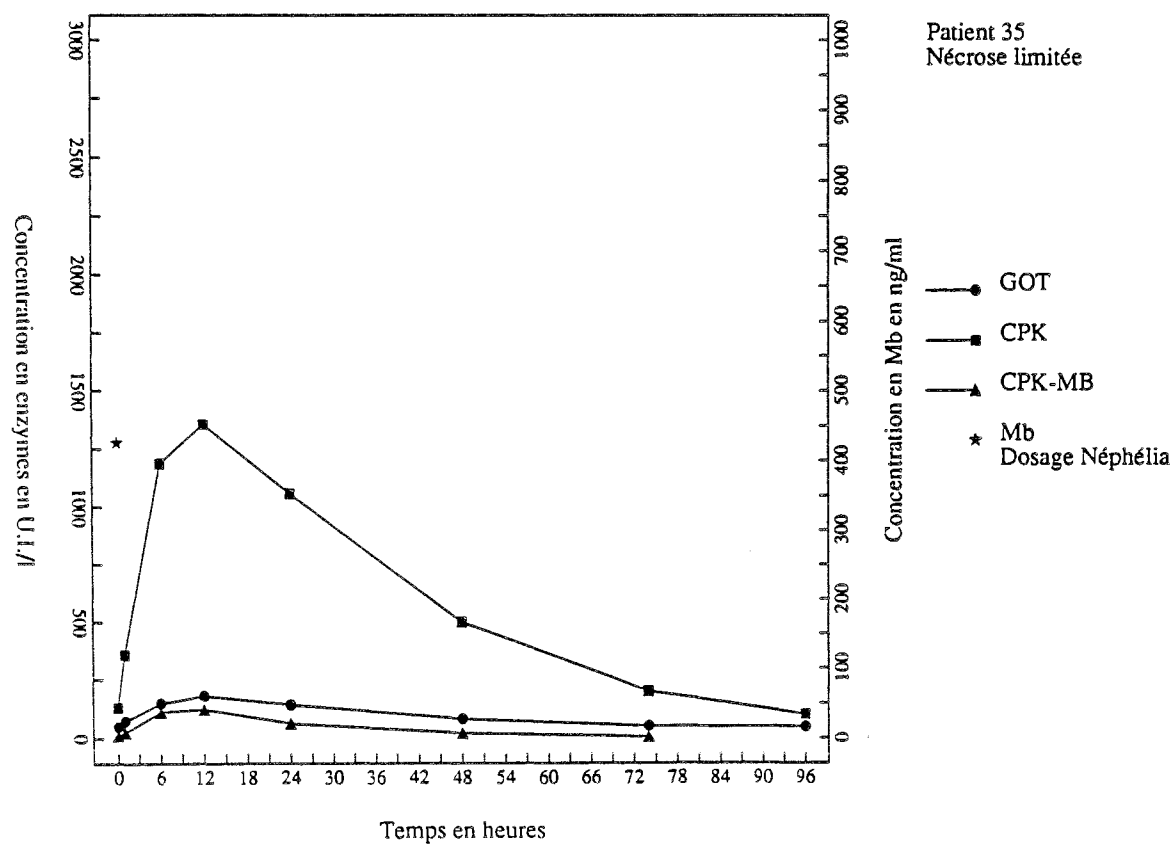


Figure 47 Exemple de cinétique de libération des enzymes de la cytolysé cardiaque



- Les enzymes myocardiques apparaissent peu après la myoglobine, les CPK-MB semblant devancer les CPK. A H0, heure d'arrivée dans le service, soit en moyenne 5 h 30 min après constitution de la nécrose, 10 patients sur 14 (71%) montrent des taux normaux. Les enzymes contribuent à l'affirmation du diagnostic mais leur réponse vient trop tardivement pour argumenter la décision d'entamer la procédure de thrombolyse.

3.2. Comparaisons entre les différents dosages et méthodes.

3.2.1. Ensemble des dosages Mb, CPK, CPK-MB et GOT.

Afin de tenter de rechercher une concordance d'une part entre les différentes méthodes, et d'autre part entre les dosages des différents marqueurs, nous avons fait porter le calcul des coefficients de corrélation sur les taux notés au pic de concentrations de chaque marqueur. Pour les enzymes, les nombreux prélèvements nous permettent d'établir les maxima sur chaque patient. Par contre les valeurs maximales de la myoglobine ne sont pas connues. Toutefois le temps H0 correspond en moyenne à un temps où la myoglobine est libérée en forte concentration dans la circulation. Les calculs ont donc été effectués uniquement sur les prélèvements H0, soit sur 14 patients.

Le tableau ci-dessous récapitule les différents coefficients de corrélation entre les différentes protéines:

Coefficient de corrélation calculé entre les différents dosages.

	CPK max.	CPK-MB max.	GOT max.
Néphélia	$r = 0.31$ NS	$r = 0.67$ $0.01 < p < 0.05$	$r = 0.5$ $0.05 < p < 0.1$
RIA	$r = 0.61$ $0.05 < p < 0.1$	$r = -0.02$ NS	$r = 0.74$ $0.01 < p < 0.05$

Les valeurs de myoglobine dosées par les deux techniques corréleront significativement avec les dosages enzymatiques de la GOT. La Néphélia et la RIA ne corréleront pas avec respectivement les dosages de CPK et de CPK-MB. Pour ces dernières, le nombre de valeurs est plus faible que pour les deux autres protéines; de plus de nombreux prélèvements H0 se trouvent hors gamme en RIA; le calcul n'est effectué que sur un ensemble de 7 couples de valeurs, ce qui peut expliquer une mauvaise corrélation. La RIA semble cependant concorder davantage avec les dosages enzymatiques. Des corrélations satisfaisantes entre les pics de concentration de myoglobine détectée par RIA et de CPK ont été décrites (150).

Les deux méthodes quantitatives de détection de la myoglobine ne corréleront pas significativement entre elles ($r = 0.23$, $p > 0.1$), si l'on considère l'ensemble des prélèvements dosés situés dans la gamme de lecture ($n = 32$). Nous avons précédemment constaté que les prélèvements tardifs présentent, en Néphélia, des concentrations anormalement élevées, par rapport à celles observées en RIA sur les mêmes patients. Un calcul de corrélation réalisé en ne prenant en compte que les prélèvements H0 donne un coefficient plus satisfaisant ($n = 9$, $r = 0.75$, $0.01 < p < 0.05$).

Des corrélations ont été recherchées entre les deux méthodes quantitatives et la technique sur lame, pour laquelle nous avons pris en compte le titre, c'est à dire la dernière dilution sérique pour laquelle une agglutination est encore observée. Le titre minimal correspond environ à la dernière dilution (une dilution au 1/2 fournit une concentration minimale de myoglobine de 200 ng/ml). Les résultats sont les suivants:

- Les résultats obtenus en RIA ne concordent pas significativement avec ceux obtenus sur lame. Ceci est en désaccord avec la littérature (44, 134).
- Les résultats obtenus par inhibition corrélient significativement avec ceux donnés par le test sur lame ($n = 15$, $r = 0.89$, $p < 0.001$).

3.2.2. Discordances entre Néphélia et RIA.

Pour certains sérums H0, les concentrations de myoglobine dosées par immunonéphélémétrie et par radioimmunologie diffèrent de façon importante: ces points discordants sont reportés dans le tableau ci-dessous, où ils sont comparés aux résultats du test sur lame exprimés en termes de dernière dilution agglutinante des sérums (une dilution de 1/4 correspond environ à 400 ng/ml).

Sérums discordants entre Néphélia et RIA.

Sérums	Néphélia (ng/ml)	RIA (ng/ml)	Behring (dilution)
23A	167	> 1000	-
25A	180	801	-
30A	276	> 1000	1/4
24A	5469	254	1/16
28A	532	143	1/2
29A	1192	162	1/8
31A	633	73	1/4

23A, 25A, 30A: sérums faiblement positifs Néphélia, fortement positifs RIA.

24A, 28A, 29A, 31A: sérums fortement positifs Néphélia, faiblement positifs RIA.

La méthode Néphélia et le test sur lame concordent pour les points positifs par les deux méthodes ($n = 5$, $r = 0.96$, $0.001 < p < 0.01$).

Le patient 23 souffre d'une angine de poitrine, cet état est susceptible d'élèver la myoglobininémie (158). Cependant, la valeur observée en RIA semble anormalement élevée. Dans ce prélèvement 23A comme dans les deux autres sérums 25A et 30A les taux d'enzymes marqueurs ne sont pas encore ou ne sont plus pathologiques.

- L'échantillon 25A date de plus de 4 jours, un taux de 800 ng/ml de myoglobine paraît élevé car à cette date, le taux enzymatique de CPK est revenu à des concentrations normales.
- L'échantillon 30A est en revanche plus précoce (4 h 30 min), les taux enzymatiques montrent encore des valeurs normales; il semble que la valeur apportée par le dosage RIA, qui concorde avec le test sur lame, soit plus en rapport avec la situation pathologique.

Les patients 24A, 28A et 29A fortement positifs en Néphélia présentent des taux de CPK et CPK-MB tous pathologiques. Deux de ces patients, les 28 et 29, sont par ailleurs atteints d'une nécrose étendue, leurs pics enzymatiques sont élevés. La valeur de la myoglobininémie dosée par Néphélia chez le patient 24 semble très élevée par rapport aux chiffres notés chez les autres patients. L'heure de prélèvement du sérum 31 n'est pas connu, il est donc impossible de conclure à propos de ce patient; néanmoins test sur lame et Néphélia concordent alors que le dosage RIA est négatif, bien que le patient soit réellement atteint d'un infarctus.

Il semble donc que, pour les prélèvements 23A, 25A, 28A, 29A et 31A, la clinique permette de trancher en faveur du dosage par néphélométrie. Cependant les méthodes RIA et Néphélia ne diffèrent que par l'importance de l'augmentation des concentrations décelées; pour tous les patients souffrant d'infarctus, l'un au moins des prélèvements atteint des taux pathologiques (excepté chez le patient 31 dont le dosage est négatif en RIA).

3.2.3. Classement selon l'étendue de la nécrose.

Les dossiers cliniques fournissent une estimation de l'étendue de la zone nécrosée, correspondant à une surface lésée plus ou moins importante du ventricule gauche.

Le volume de la masse nécrosée constitue un indicateur pronostique (146); il est généralement estimé en intégrant la courbe de la concentration de CPK en fonction du temps (calcul de l'aire sous la courbe ou des quantités cumulées de CPK dans un litre de sang) (146).

Les patients ont été répartis en deux groupes selon ce critère:

- 11 patients (48%) sont atteints de lésions étendues.
- 12 patients souffrent d'une nécrose plus limitée. Les patients 18 et 23 souffrant d'une angine de poitrine ont été exclus.

Le tableau 1 précise l'étendue de la zone nécrosée de chaque patient.

Le prélèvement 24A dosé à 5469 ng/ml par néphélométrie, fortement positif en RIA mais également pour les enzymes a été ôté pour effectuer les calculs car il présente une discordance importante par rapport aux autres échantillons.

Les figures 48, 49, 50, 51 et 52 représentent les distributions respectives de la myoglobulinémie (prélèvements A) en fonction des deux méthodes de détection et des enzymes (prélèvements fournissant la concentration maximale) selon l'étendue de la zone nécrosée.

Les dispersions des valeurs de la myoglobulinémie dosée chez les patients atteints de nécrose étendue sont sensiblement équivalentes dans les deux techniques utilisées. Par contre, lorsque la nécrose est limitée, les points obtenus par Néphélia montrent une dispersion inférieure (62%) à celle constatée par RIA (73%). En outre, les taux de myoglobine détectés par Néphélia sont en moyenne significativement plus élevés chez les patients atteints de nécrose étendue ($0.05 < p < 0.1$) alors qu'ils ne le sont pas en RIA.

La distribution des enzymes, en particulier des CPK-MB, diffère nettement entre les deux populations de malades: les taux de GOT, de CPK et de CPK-MB obtenus pour les patients atteints d'une nécrose étendue sont significativement plus élevés que ceux obtenus sur l'autre groupe de patients (respectivement $p < 0.001$, $0.05 < p < 0.1$ et $0.01 < p < 0.02$).

Les seules corrélations significatives obtenues l'ont été avec la méthode de dosage par inhibition et sur le groupe de patients atteints d'une nécrose modérée:

Corrélation Néphélia - Dosage des enzymes cardiaques sur les patients atteints de nécrose modérée (n = 11).

	CPK max	CPK-MB max	GOT max
Néphélia	$r = 0.73$ $0.01 < p < 0.05$	$r = 0.92$ $p < 0.001$	$r = 0.5$ $0.05 < p < 0.1$

Figure 48 Concentrations maximales d'élimination de Mb par patient selon l'étendue de la zone nécrosée

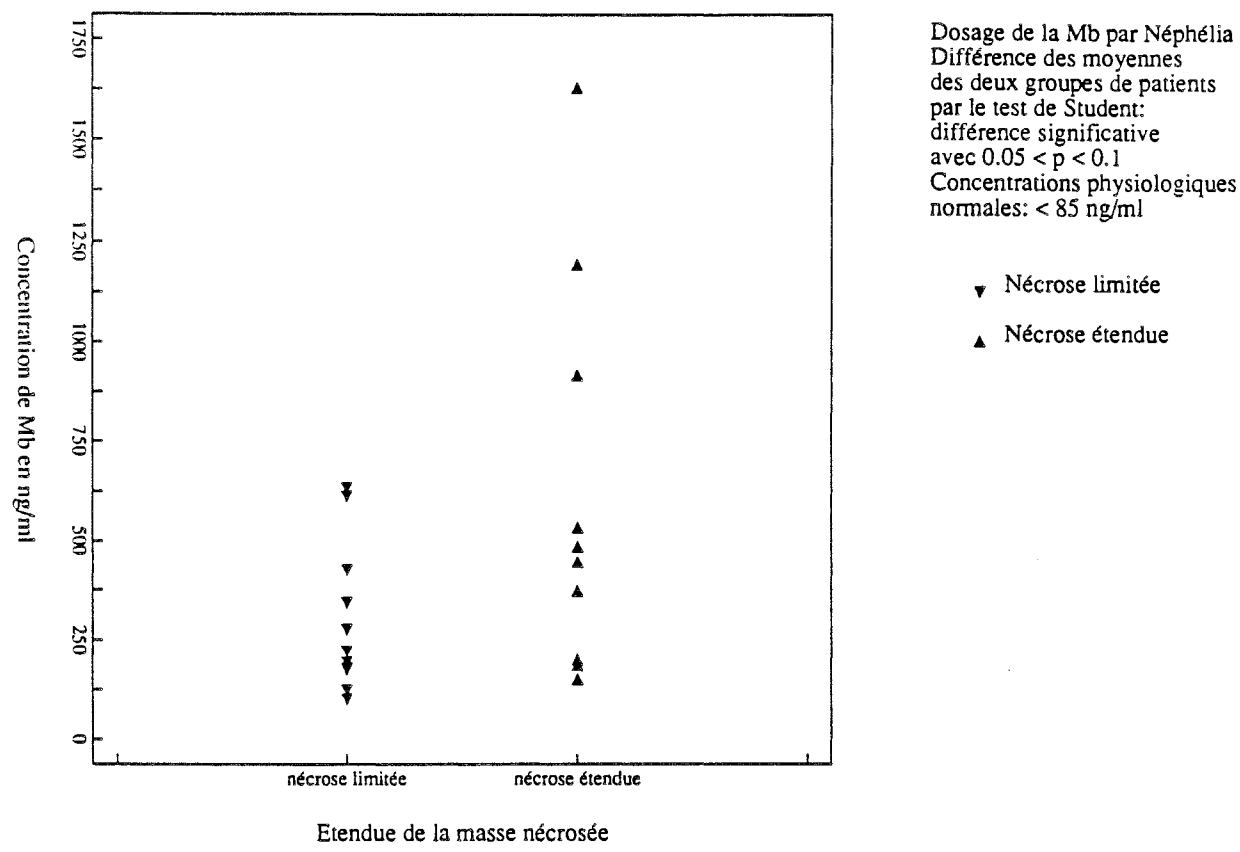


Figure 49 Concentrations maximales d'élimination de Mb par patient selon l'étendue de la zone nécrosée

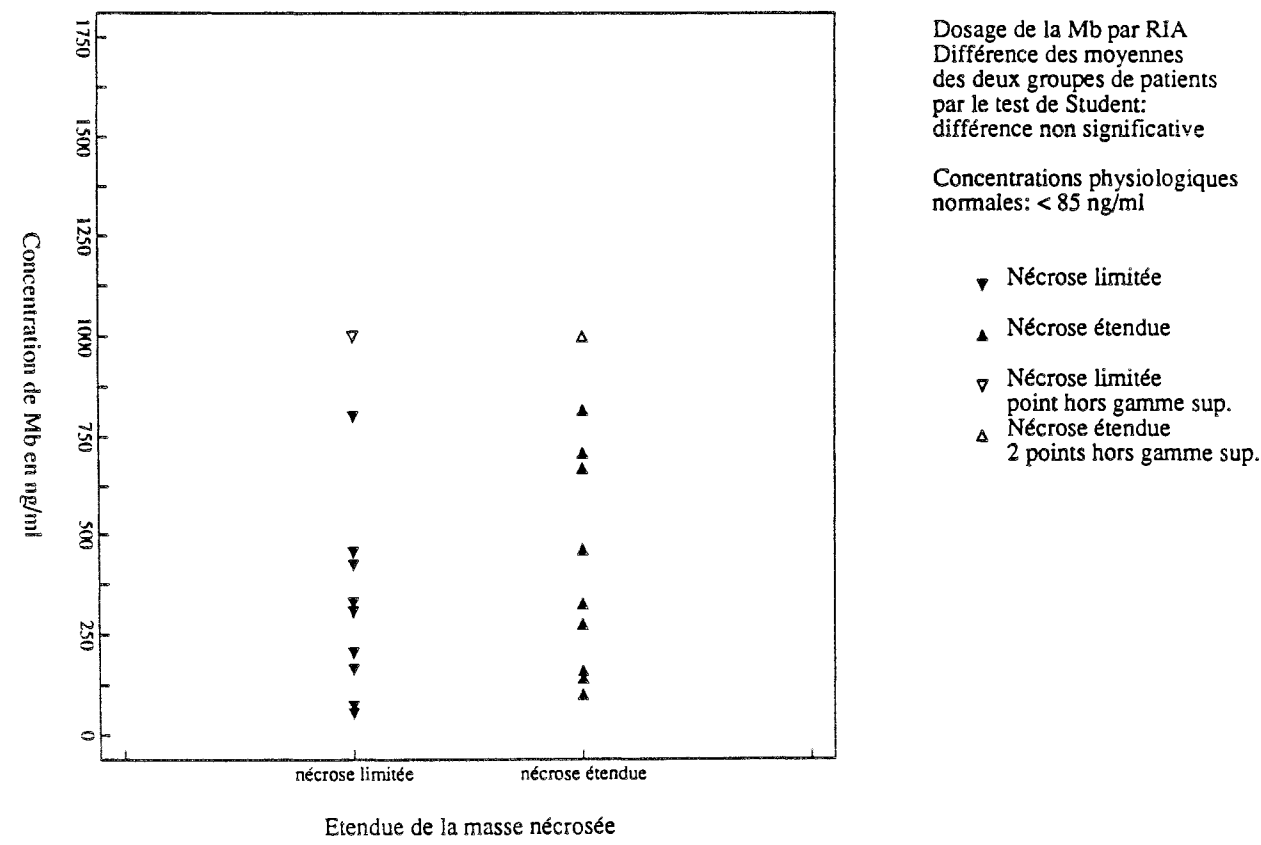


Figure 50 Concentrations maximales d'élimination de CPK par patient selon l'étendue de la zone nécrosée

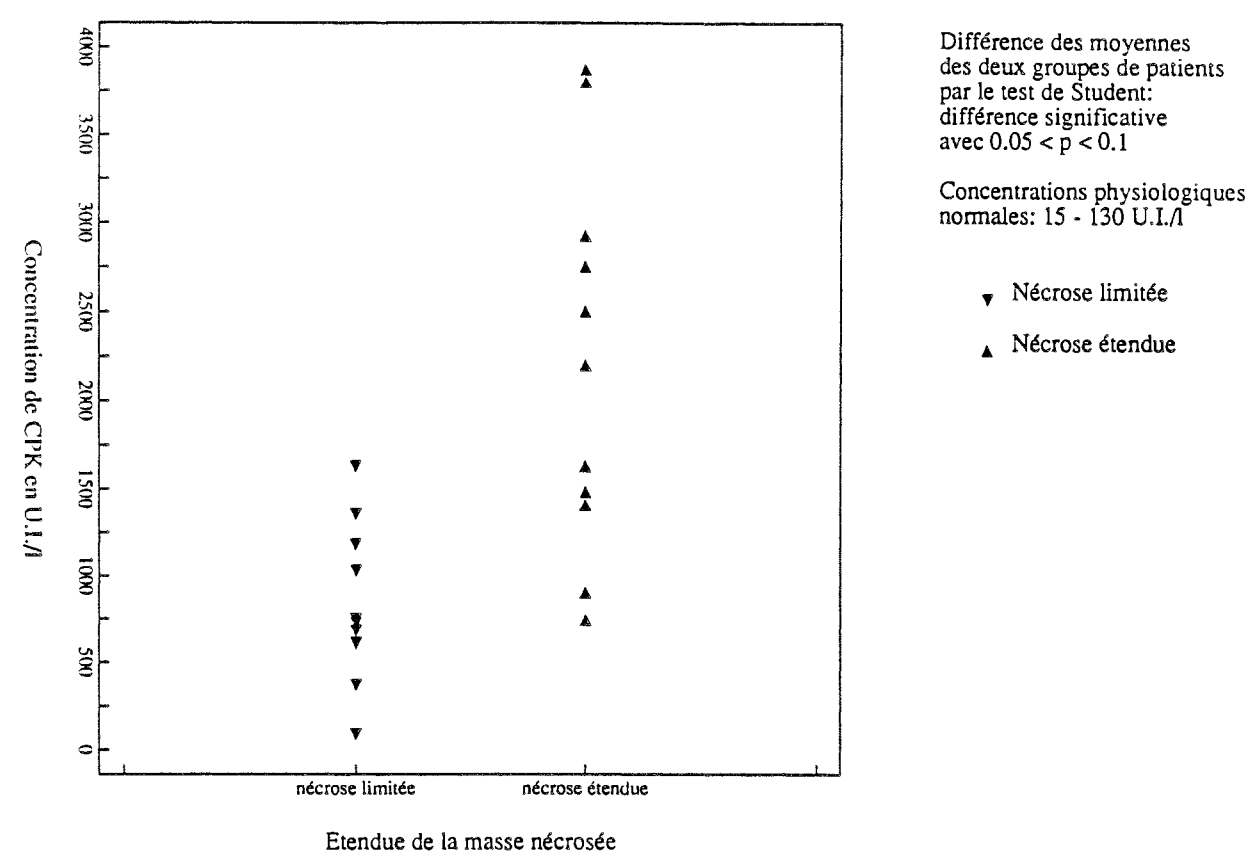


Figure 51 Concentrations maximales d'élimination de CPK-MB par patient selon l'étendue de la zone nécrosée

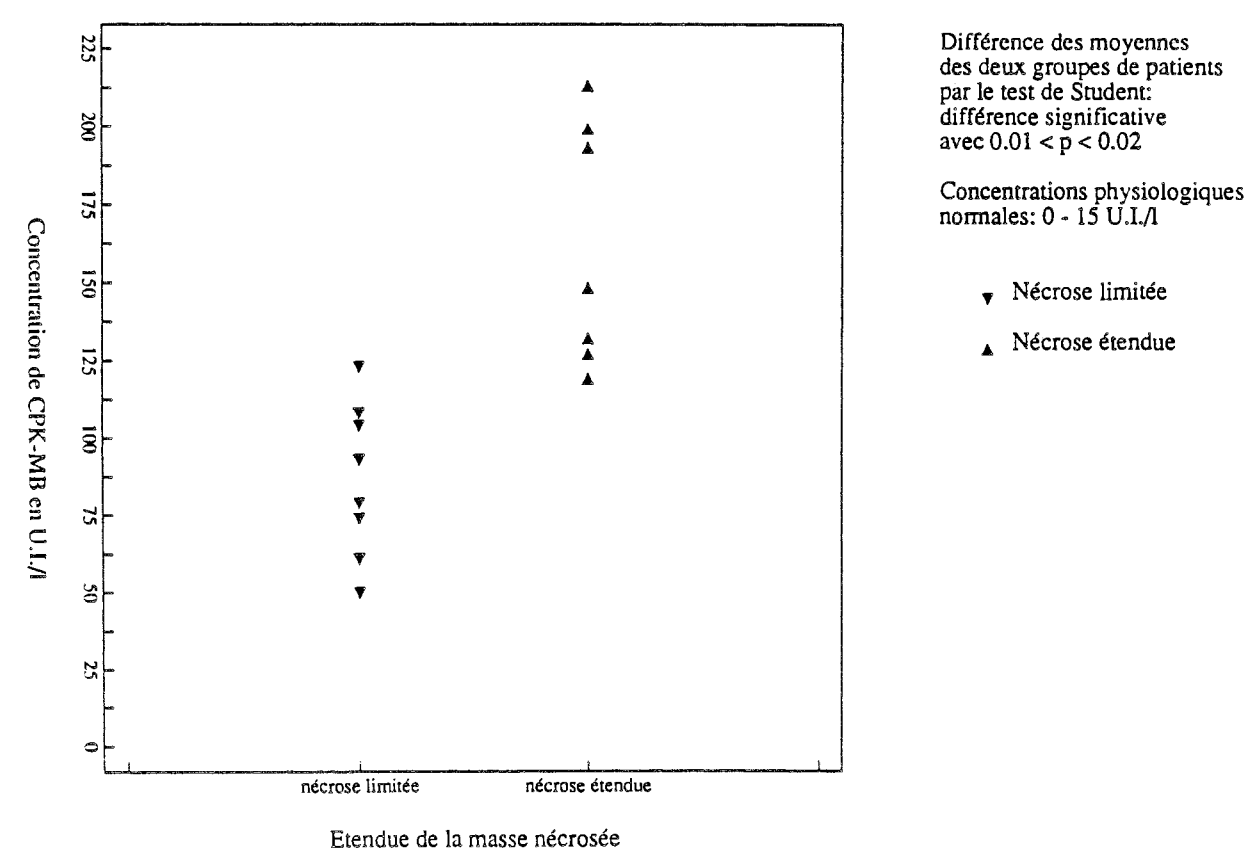
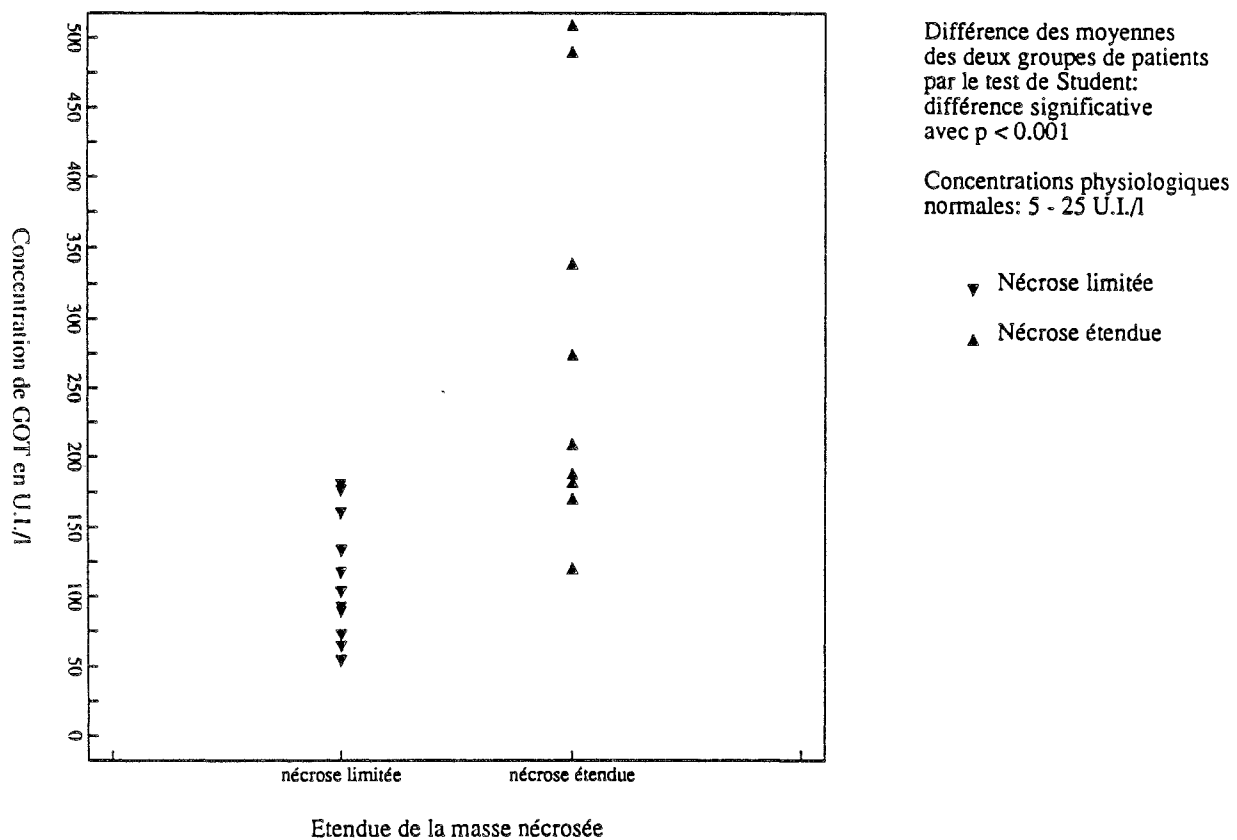


Figure 52 Concentrations maximales d'élimination de GOT par patient selon l'étendue de la zone nécrosée



Les corrélations entre les taux de myoglobine et les taux de CPK et CPK-MB sont satisfaisantes.

Des études (133, 158) ont montré des corrélations significatives entre la hauteur du pic sérique de myoglobine et l'importance de la masse nécrosée. Maddison et al. (97) ont obtenu des corrélations significatives entre les quantités cumulées de myoglobine et de CPK-MB en ce qui concerne les infarctus de taille réduite. Nos résultats concordent avec la littérature; il est surprenant que nous n'ayons pu établir de concordance entre les taux enzymatiques et la myoglobine détectée par RIA.

4. Conclusion.

Le dosage de la myoglobine sérique par une méthode d'inhibition de l'agglutination semble réalisable sur des sérums infarctiques:

- La sensibilité diagnostique du dosage à 5 h 30 min s'élève à 93%. Nous sommes en accord avec Mac Comb et al. (96), rapportant une sensibilité de 93% à la sixième heure après l'apparition des symptômes douloureux. Une sensibilité de 100% est certes obtenue avec les enzymes myocardiques, mais à un stade plus tardif.
- Les résultats obtenus en inhibition corrélaient davantage que ceux obtenus par RIA, d'une part avec la clinique (enzymes, étendue de la nécrose), d'autre part avec la méthode de détection rapide sur lame.

La précocité d'élévation de la myoglobine est telle qu'elle est compatible avec les délais imposés pour la mise en place de la procédure de fibrinolyse, à la condition que son dosage soit suffisamment rapide à mettre en oeuvre, ce qui exclut la RIA.

Le dosage par immunonéphélométrie est rapide dans son exécution mais il nécessite de prétraiter les sérums par des MS qui doivent être ensuite éliminées par centrifugation. Ce traitement peut être raccourci par une procédure plus rapide en utilisant par exemple des MS de faible diamètre, comme cela a été montré précédemment (cf. Ch.I.1.3.), qui éviteraient l'étape de centrifugation. Cela implique de bien comprendre le mode d'action de ce prétraitement, étude que nous aborderons dans la partie suivante.

PARTIE IV

PARTIE IV: Etude des interférences sériques.

INTRODUCTION: Principe général de l'étude des interférences sériques.

Nous avons constaté dans la troisième partie de ce travail que le traitement du sérum par des MS-Eth se traduisait par une stabilisation des MS-Ac et MS-Ag. Le sérum traité se comporterait différemment vis-à-vis des MS.

L'une des hypothèses pouvant rendre compte de ce phénomène est que des constituants sériques se fixent de façon non spécifique sur les MS-Ac, sur les MS-Ag et sur les MS-Eth de traitement. Si elle est exacte, il devrait être possible de mettre en évidence des pertes de concentration d'une ou de plusieurs espèces moléculaires interférentes à la suite du traitement. Nous avons donc entrepris de comparer la composition et le pouvoir déstabilisant d'un sérum avant et après traitement. L'efficacité du traitement pourrait ainsi être mise en parallèle avec l'élimination de protéines interférentes, adsorbées sur les MS-Eth.

L'efficacité stabilisante du traitement est plus ou moins importante selon les sérums, cela s'explique par la variabilité individuelle de la composition protéique. L'ensemble du travail projeté nécessitant de comparer les résultats d'un grand nombre de manipulations, nous devons disposer d'un volume important du même sérum pour rester dans des conditions homogènes. Nous ne pouvions donc envisager d'expérimenter, dans un premier temps, sur des sérums individuels. C'est pourquoi nous avons constitué un pool rassemblant un grand nombre de sérums, représentatif de la moyenne des comportements des échantillons constitutifs. Nous le dénommerons "sérum entier" dans la suite de cette étude.

Le sérum humain est un milieu complexe renfermant de nombreuses espèces moléculaires (plus de 100 protéines connues (129)), certaines à des concentrations très faibles. Pour approcher, même grossièrement, la nature des constituants déstabilisants, nous avons soumis le sérum entier à deux fractionnements successifs. Le premier, basé sur un critère de masses moléculaires repose sur une gel filtration dont les conditions, et notamment la limite d'exclusion du gel, ont été déterminées après étude préliminaire du sérum entier par ultrafiltration. Les contenus des pics issus de la gel filtration sont refractionnés sur une colonne échangeuse d'ions. C'est sur ces fractions que les tests de déstabilisation et de traitement seront menés.

Les fractions recueillies pour chacune des deux opérations seront caractérisées de la façon suivante:

- Etude de leur potentiel agglutinant vis-à-vis de chacun des lots de MS synthétisées (MS-Ag, MS-Ac), dans un milieu permettant de visualiser des signaux de déstabilisation des MS; cela implique que les blancs MS et les blancs fractions soient stables dans ce milieu; les élévations des signaux observés dans ces conditions seront donc bien liées au contenu de chaque fraction. Ces tests permettront d'identifier les fractions déstabilisantes et d'y caractériser et quantifier cette propriété.
- Effet du traitement des fractions déstabilisantes par des MS-Ethanolamine: son efficacité, se traduisant par une stabilisation des signaux, prouvera que les fractions identifiées entrent bien dans le cadre de notre hypothèse de travail.
- Détermination de leur concentration: nous comparerons systématiquement les teneurs en protéines des fractions avant et après traitement afin de détecter une éventuelle baisse de concentration dans les échantillons traités. Afin de restreindre

le nombre de fractions à analyser, nous avons constitué des mélanges de fractions sur la base des résultats de déstabilisation: les fractions rapprochées formant un pic de déstabilisation sensible au traitement sont rassemblées en un même pool.

- Etude analytique des pools de fractions traités et non traités: le recours à des méthodes immunochimiques discriminantes (électrophorèse, immunodiffusion, immunoélectrophorèse, immunotransfert, isoélectrofocalisation), permettra de comparer qualitativement les contenus des pools de fractions traités et non traités.
- Dosage comparatif en immunonéphélémétrie classique des constituants des fractions traitées et non traitées.

La succession des principales étapes de notre démarche expérimentale est schématisée ci-dessous:

Constitution d'un pool de sérums humains: sérum entier.



Filtration sur gel du sérum entier



Tests des fractions sur les MS et étude du traitement



Constitution de pools de fractions



Passage de chaque pool sur colonne échangeuse d'ions

Tests des fractions sur les MS et étude du traitement



Constitution de sous-pools de fractions



Analyses qualitatives de l'ensemble des pools traités et non traités.



Dosages quantitatifs de ces pools en immunonéphélémétrie classique.

Le premier chapitre est consacré à la description des fractionnements du sérum entier et à l'étude des pouvoirs de déstabilisation des fractions, incluant également les essais de traitement. A la suite de ces résultats, des pools possédant des propriétés communes seront constitués.

Le deuxième chapitre décrira l'ensemble des études analytiques qualitatives et quantitatives effectuées sur les pools traités et non traités pour tenter d'identifier les éléments retenus par les MS de traitement. Les résultats obtenus sur les pools seront vérifiés sur le sérum entier et sur 35 sérums individuels.

Dans un troisième chapitre, nous tenterons de comprendre les mécanismes susceptibles d'expliquer l'effet déstabilisateur de certaines protéines.

Réactifs et matériel.

Les réactifs et matériel suivants ont été utilisés dans cette partie.

1. Réactifs.

1.1. Préparation des MS sensibilisées.

- MS 16 (diamètre > 300 nm ; concentration de 38.9 mg/ml).
- Myoglobine de muscle squelettique humain sous forme réduite de cyanmetmyoglobine: Dako X555 lot 010; 1 mg dans 150 µl de PBS.
- 8 Acm de souris (Sanofi):
 - . IgG1:
 - + (lot 8957) à 1.5 mg/ml.
 - + (lot 8709) à 2 mg/ml.
 - + (lot 8576) à 2.2 mg/ml.
 - . IgG2a:
 - + (lot 8855) à 2 mg/ml.
 - + (lot 8604) à 1 mg/ml.
 - . IgG2b:
 - + (lot J.M.) à 1 mg/ml.
 - + (lot J.M.) à 1.7 mg/ml.
 - . IgG3: (lot 8907) à 3.2 mg/ml.
- IgG de lapin (Diagnostics Pasteur) à 38 mg/ml.

1.2. Produits chimiques.

- Polyéthylène glycol (PEG) de MM 6000 Da (Merck).
- PEG de MM 20 M Da (Touzart et Matignon).
- Acrylamide (Merck); N,N'-méthylènebisacrylamide (Merck).
- Gel de polyacrylamide pour isoélectrofocalisation renfermant des ampholines pH 5.5 - 8.5 (Pharmacia).
- Films d'agarose pour immunoélectrophorèse (Kallestad).
- Agarose (Touzart et Matignon).
- N,N,N',N'-tétraméthylène diamine (Temed) (Merck); persulfate d'ammonium (Merck).
- Bleu de bromophénol (RAL); Bleu de Coomassie brillant R250 (RAL); Rouge Ponceau (Sigma).
- Tris (hydroxyméthyl)-aminométhane (Merck).
- Dodécylsulfate de sodium (SDS) (Merck); Glycine (Merck); Saccharose (Merck).
- Bleu dextran 2000 (Pharmacia).
- Marqueurs de masse moléculaire:
 - . High molecular weight (HMW) (Pharmacia).

- Low molecular weight (LMW) (Pharmacia).
- Marqueur de pHi de 5.65 à 8.3 (BDH).
- Acide acétique (Prolabo); Acide trichloroacétique (TCA) (Prolabo); Acide DL aspartique (Touzart et Matignon); Acide sulfo-5 salicylique (Prolabo); Acide chlorhydrique fumant à 37% (Merck).
- Alcool méthylique dénaturé; Propanol-2 (Prolabo); Alcool éthylique 95°.
- Glycérol (Prolabo).
- Diéthylmalonylurée sodée (Prolabo).
- Sérum albumine bovine (IBF).
- 4-chloro-1-naphtol (Serva).
- Peroxyde d'hydrogène à 30% (Prolabo).

1.3. Réactifs immunologiques.

- LN standard serum proteins SAU 07 (Behring).
- Protein standard plasma OTFI (Behring).
- Ac de chèvre anti-IgG (H + L) de lapin marqué à la peroxydase (Diagnostics Pasteur).

2. Matériel et appareillage.

- Mesures néphélométriques:
 - Néphélémètre prototype industriel du Laboratoire.
 - Néphélémètre LN Behring.
- Préparation et mise en réaction automatiques des échantillons: module III du LN Behring.
- Chromatographies:
 - Colonne LKB.
 - Colonnes IBF 11 et IBF 25.
 - Collecteur de fractions (ISCO modèle 328).
 - Absorptiomètre U.V. (ISCO UA5).
 - Spectrophotomètre (PYE UNICAM 8600 Philips).
 - Pompe péristaltique P-3 (Pharmacia).
- Electrophorèses, isoélectrofocalisations et immunotransferts:
 - Système d'électrophorèse en plaque verticale (Hoefer scientific instrument SE 600).
 - Cryo-thermostat (mgw Lauda).
 - Sécheur de gel (Hoefer scientific instrument SE 540).
 - Générateur de courant (Sebia, micro GD 3000).
 - Cuve d'isoélectrofocalisation (Isodine).
 - Cuve pour transfert électrique des gels sur membrane (Transphor Power-Lid, modèle LITE 50).
 - Membrane de nitrocellulose de 0.2 μ m (Schleicher et Schuell).
- Fractionnements du pool:
 - Unités d'ultrafiltrations Millipore à usage unique, membrane en polysulfone de point de coupure 100000 Da.
 - Ultrafiltres Centrisart de points de coupures 10000 Da et 20000 Da (Sartorius).
 - Ultrogel ACA 22 (IBF); gamme de fractionnement: 100000 à 1200000 Da.
 - Echangeur d'anions DE 52 (Whatman), cellulose microgranulaire prégonflée.

CHAPITRE I: Fractionnement du sérum entier; caractérisation des pools.

1. Préparation des réactifs - protocoles expérimentaux.

1.1. Synthèse des MS-Ag, des MS-Ac, des MS-Ethanolamine, des MS-dextran et des MS-Eth de traitement.

Plusieurs populations de MS (MS-Ag, MS-Ac) sont utilisées pour tester les potentiels agglutinants des fractions sériques.

1.1.1. MS-Ag.

Les problèmes posés par les interférences déstabilisantes des sérums ayant été rencontrés à l'occasion de l'utilisation des MS-Mb, nous avons adopté cette variété de MS-Ag comme modèle d'étude, tout en sachant que le phénomène de déstabilisation des MS par des sérums concentrés peut concerner d'autres systèmes de MS-Ag. Les modalités de couplage de la myoglobine humaine ont été décrites en détail dans la deuxième partie (cf. Ch.I.1.2.1.).

1.1.2. MS-Ac.

Deux sortes de MS-Ac sont étudiées: les unes sont recouvertes d'Ac de souris, les autres d'Ac de lapin. Dans les deux cas une fraction IgG est couplée aux MS. Ce choix est en rapport avec les sources des Ac utilisés au Laboratoire (Acm de souris et As polyclonaux de lapin); le couplage d'Ac de ces deux espèces nous permet de faire porter notre étude sur les deux types principaux de MS-Ac.

1.1.2.1. Synthèse des MS-Ac souris.

Nous disposons de 8 Acm en provenance du Centre de Recherche Sanofi, dont les spécificités respectives excluent leur réaction avec des constituants sériques; tous sont des IgG de sous classes 1, 2 et 3. Un mélange de ces Acm est préalablement réalisé sous des concentrations identiques pour chacun d'entre eux, permettant de se rapprocher de la composition en IgG d'un sérum polyclonal de souris. Ils sont couplés à raison de 400 µg/ml de milieu de couplage.

10 ml de milieu de couplage nécessitent 4 mg du mélange d'Acm, soit 0.5 mg de chaque Acm. Le protocole de couplage est celui exposé dans la deuxième partie à propos des Acm anti-myoglobine humaine (cf. Ch.I.2.1.).

1.1.2.2. Synthèse des MS-Ac lapin.

La fraction immunoglobulinique de l'As polyclonal est couplée selon un protocole identique à celui utilisé pour les MS-Ac souris.

1.1.3. MS témoins.

Nous avons enfin inclus dans notre travail des MS non couplées comme témoins des MS-Ag et des MS-Ac; des MS-Ethanolamine ont donc été synthétisées parallèlement à la

préparation des MS-Mb, n'en différant que par l'absence de l'étape d'adjonction de la myoglobine. De même des MS-dextran, non sensibilisées par des Ac, seront étudiées.

Pour chaque lot de MS, 10 ml de milieu de couplage sont réalisés.

Des MS-Ethanolamine à 100 mg/ml, destinées au traitement des fractions de pool, sont synthétisées sous un volume important.

Les suivis néphélométriques des signaux des différents lots de MS au cours des étapes de couplage se sont tous révélés satisfaisants.

1.2. Constitution du pool de sérums humains (sérum entier) et détermination de sa concentration protéique totale.

Les sérums humains entrant dans la composition du sérum entier sont issus de prélèvements disponibles au Laboratoire, en provenance de divers services hospitaliers.

193 sérums frais pris au hasard sont ainsi mélangés sous un volume final de 285 ml. La solution est homogénéisée par agitation douce, de l'azide de sodium est additionné à raison de 2 pour mille. Le sérum entier est divisé en aliquots de 2 ml conservés congelés à -20°C.

La concentration protéique du pool est déterminée par mesure de la DO à 280 nm, correspondant à l'absorption des radicaux phényl (Tyr et Phe) et indole (Trp). La droite d'étalonnage est tracée en référence à un sérum standard (Behring) titré à 67.8 g/l. La concentration protéique du sérum entier s'élève à 63 g/l.

1.3. Protocole des tests néphélométriques et du traitement.

1.3.1. Tests néphélométriques.

Le pouvoir déstabilisant des échantillons issus des différentes étapes de séparation est évalué vis-à-vis des lots de MS-Mb, MS-Ac souris, MS-Ac lapin, MS-Eth et des MS-dextran. Les blancs MS sont tous fixés à 50 mV.

Le tampon de préparation et de mise en réaction des produits est le PBS. Par ailleurs, une solution de PBS contenant 37.5% de PEG 6000 est préparée: elle permettra, par son addition contrôlée dans le tampon PBS, de conduire les tests avec des pourcentages finaux de PEG variant de 0% à 15%, selon les fractions considérées. Le PEG est un révélateur de la réaction d'agglutination aspécifique, il amplifie les signaux de déstabilisation des MS lorsque celle-ci se produit.

Le pourcentage de PEG choisi dans le test ne doit pas modifier les blancs (blancs MS et blancs fractions).

En raison de la dilution due à la succession des opérations de fractionnement, les fractions sont introduites dans les cuves sous le volume le plus élevé possible (150 µl), permettant ainsi leur faible dilution dans les cuves de réaction.

La mise en réaction des produits se décompose de la façon suivante:

- 1^{ière} étape: 150 µl de fraction + 30 µl de MS prédiluées en PBS. Les cuves sont incubées 30 min à T.A. Pour le sérum entier exclusivement: 10 µl de sérum + 30 µl de MS + 140 µl de PBS.

- 2^{ème} étape: addition de la solution de PBS à 37.5% de PEG (de 0 à 120 µl selon les fractions et MS considérées). Le volume final est complété à 300 µl par du PBS.

Le milieu de réaction final contient donc la fraction étudiée diluée au 1/2, les MS, et un pourcentage de PEG variant de 0% à 15% destiné à révéler l'éventuel pouvoir agglutinant de la fraction.

La lecture des cuves au néphélémètre intervient 15 min après la deuxième étape.

1.3.2. Traitement.

Le principe du traitement des fractions par des MS-Eth a été décrit en détail dans la troisième partie (cf. Ch.I.1.2.2.1.).

Les fractions, indépendamment de leurs concentrations, sont traitées au 1/2 par 25 mg/ml de MS-Eth. Après une heure d'incubation à T.A. le mélange est centrifugé et le surnageant est testé vis-à-vis des MS.

Pour les témoins fractions non traitées, les MS-Eth sont remplacées par du PBS.

1.3.3. Teneurs en protéines (DO à 280 nm).

L'ensemble des fractions issues des chromatographies ainsi que les pools formés sont caractérisés par leur concentration en protéines, déterminée par spectrophotométrie à 280 nm. Les DO des surnageants des pools traités et non traités sont systématiquement comparées.

2. Fractionnements du sérum entier et étude du potentiel agglutinant des fractions.

La première étape du fractionnement du sérum entier est une séparation par gel filtration sur colonne. Mais nous ignorons dans quelle plage de MM se situent les substances interférentes, ce qui ne nous permet pas de choisir le degré de porosité du support chromatographique. Nous allons d'abord tenter de rechercher approximativement la zone de MM provoquant des déstabilisations en ultrafiltrant le sérum entier sur une membrane de seuil de coupure connu et en testant le rétentat et le filtrat vis-à-vis des MS.

2.1. Ultrafiltration du sérum entier.

2.1.1. Mode opératoire.

Nous avons utilisé des unités de filtration composées d'un ensemble réservoir / filtre fermé par un bouchon à vis, dont la membrane a un seuil de coupure annoncé de 100000 Da, et d'une cuve de récupération du filtrat. La pressurisation est assurée avec une seringue de 20 ml et est maintenue grâce à un clapet anti-retour. Le temps de passage des molécules à travers la membrane est long (une nuit à 4°C), le système n'étant pas agité. Plusieurs aliquots du sérum entier ont été décongelés et déposés en fractions de 2 ml dans 8 unités. En fin de filtration, les 16 ml de sérum entier fourniront 6.2 ml de rétentat et 7.8 ml de filtrat.

Le rétentat est additionné d'un volume de PBS (9.8 ml) tel que l'on retrouve le volume du sérum entier de départ.

2.1.2. Concentration des échantillons.

Le sérum entier renferme 63 g/l de protéines. Le rétentat contient 44 g/l de protéines et le filtrat 6 g/l. La teneur en protéines de ce dernier est faible; or l'albumine, protéine majoritaire du sérum (44 g/l) de masse moléculaire 67000 Da, est normalement contenue dans cette fraction. Seuls 13% de l'albumine auraient traversé la membrane, le reste se retrouvant dans le rétentat. Les constructeurs de ces ultrafiltres soulignent que pour des mélanges complexes non agités, les grosses molécules ont tendance à se tasser à la surface de la membrane, excluant ainsi l'accès à la membrane des petites substances; dans ce cas, l'albumine ne traverse la membrane que dans une proportion de 10% à 30%.

2.1.3. Tests néphélométriques.

Les conditions de manipulations ont été détaillées précédemment (cf. Ch.I.1.3.1.).

2.1.3.1. Blancs MS et blancs fractions.

Le filtrat est analysé au 1/2 final; son blanc, réalisé en remplaçant la suspension de MS par du PBS, est stable (15 mV), quelque soit la concentration de PEG.

Le sérum entier et le rétentat sont introduits au 1/30; le blanc de 35 mV du sérum entier commence à s'élever à partir de 4% de PEG; à notre grand étonnement, le blanc de 35 mV du rétentat n'évolue pas lorsque le pourcentage de PEG augmente.

Les blancs MS sont obtenus en remplaçant la fraction sérique par du PBS. Les figures 53, 54, 55, 56 et 57 illustrent les profils de ces blancs pour chaque lot de MS, en présence de concentrations de PEG variant de 0% à 15%. Toutes les préparations de MS sont stables à l'exception des MS-dextran pour lesquelles une agglutination brutale apparaît dès 7.5% de PEG. Ces mêmes MS, couplées à des Ac de souris ou de lapin, se comportent tout à fait différemment puisqu'elles sont stables jusque 12.5% de PEG. L'enrobage d'Ac semble donc favoriser la stabilité de ces MS en présence de fortes concentrations de PEG.

2.1.3.2. Tests de déstabilisation.

Les figures 53, 54, 55, 56 et 57 résument les comportements néphélométriques de chaque lot de MS vis-à-vis du sérum entier, du rétentat et du filtrat.

2.1.3.2.1. Comportements des MS-Ac, des MS-Mb et des MS-Eth.

Le sérum entier et le rétentat provoquent l'agglutination des lots avec ou sans PEG; de plus leurs signaux de déstabilisation, pour un même lot de MS, sont identiques. Les substances interférentes n'ont probablement pas filtré, ce qui témoignerait de MM supérieures à 100000 Da; le mauvais rendement de l'ultrafiltration peut également atténuer les différences entre sérum entier et rétentat et rendre les résultats peu discriminants. On constate par contre des différences de comportement entre lots: les MS-Eth, qui sont les moins déstabilisées, se rapprochent des MS-Mb. De même les deux lots de MS-Ac, fortement agglutinés, présentent des profils comparables, les MS-Ac souris génèrent cependant des signaux plus élevés que les MS-Ac lapin.

Le filtrat, renfermant certes 7 fois moins de protéines que le rétentat, mais testé 15 fois plus concentré, ne provoque aucune agglutination des MS (au delà de 12% de PEG, les blancs MS-Ac sont cependant légèrement augmentés). Les protéines contenues dans cette fraction n'interfèrent pas avec les MS, leur MM est théoriquement inférieure à 100000 Da.

Figure 53 Comportement des MS-Ac souris en présence du sérum entier, du rétentat et du filtrat issus du sérum entier fractionné sur ultrafiltre

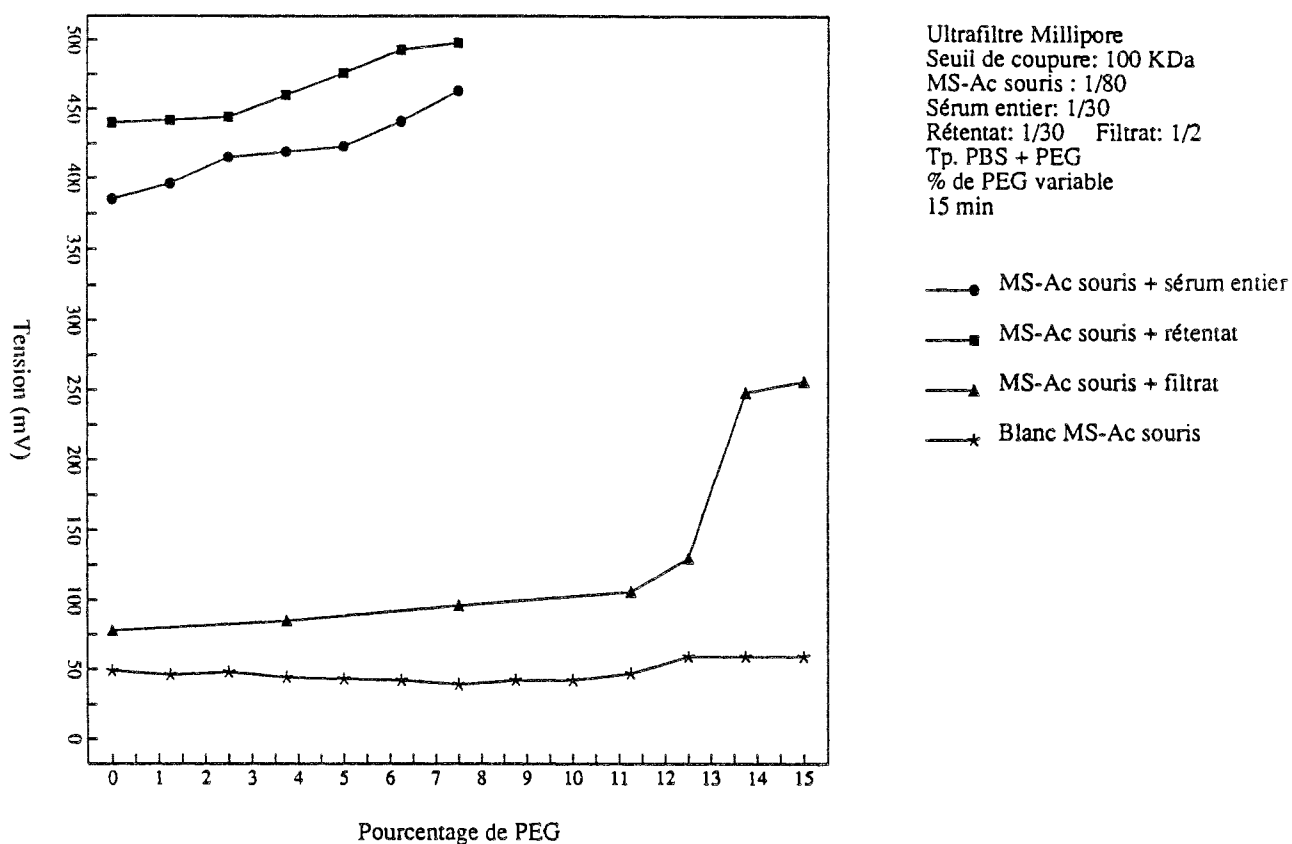


Figure 54 Comportement des MS-Ac lapin en présence du sérum entier, du rétentat et du filtrat issus du sérum entier fractionné sur ultrafiltre

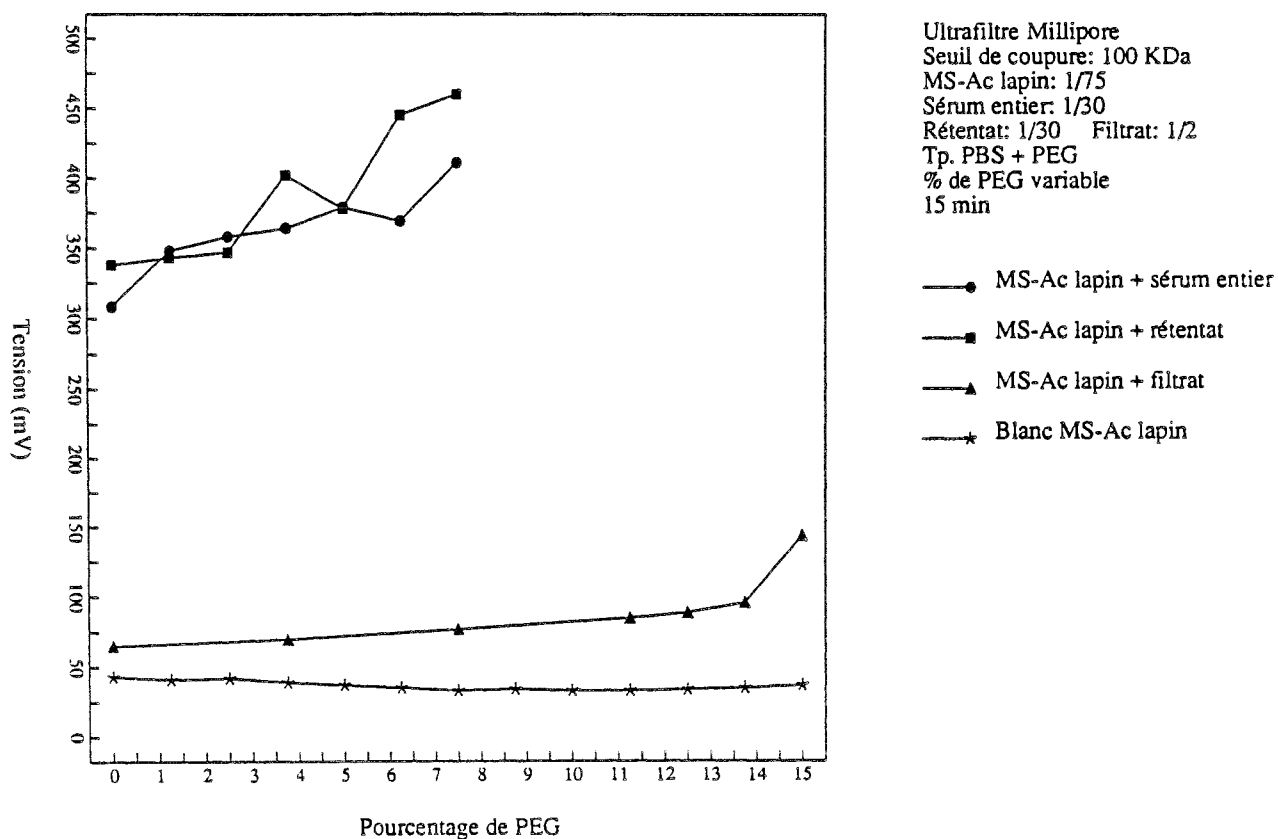


Figure 55 Comportement des MS-Mb en présence du sérum entier, du rétentat et du filtrat issus du sérum entier fractionné sur ultrafiltre

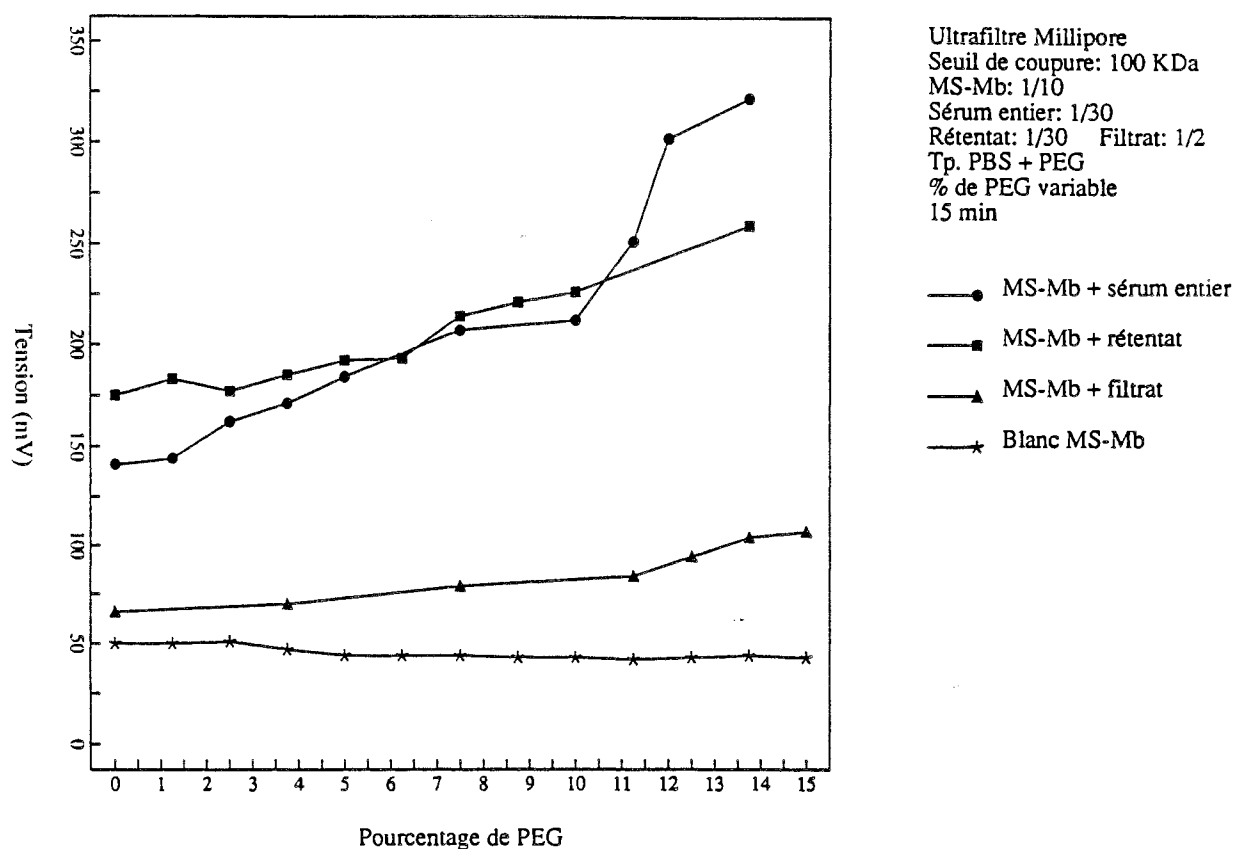
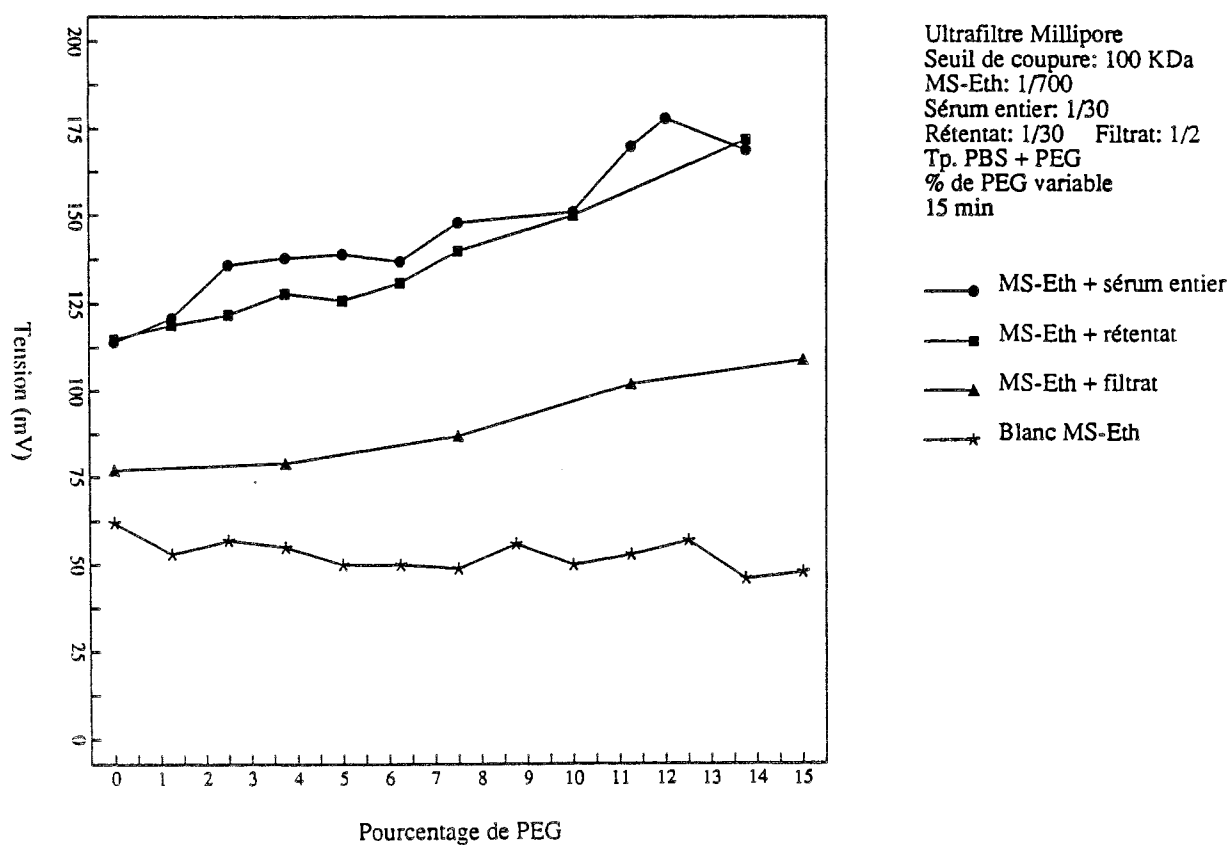


Figure 56 Comportement des MS-Eth en présence du sérum entier, du rétentat et du filtrat issus du sérum entier fractionné sur ultrafiltre



Les agents interférants sont situés dans le rétentat, renfermant principalement des molécules de MM > 100000 Da. Des substances de MM < 100000 Da sont certes présentes dans le rétentat mais, compte tenu du caractère non agglutinant des protéines du filtrat, nous sommes en droit de supposer que les molécules agglutinantes ont bien une MM > 100000 Da.

2.1.3.2.2. Comportement des MS-dextran.

Ces MS se singularisent par rapport aux 4 autres lots: les trois extraits sériques donnent des profils qui se superposent (figure 57) et ne montrent aucune agglutination des MS, quelque soit la concentration de PEG. A partir de 7.5% de PEG le blanc MS est déstabilisé, mais l'apport des fractions sériques restaure une complète stabilité. Il est suprenant de constater qu'à partir de 7.5%, le sérum entier ne déstabilise pas les MS (à partir de ce taux de PEG, le blanc sérum entier n'est plus stable).

Contrairement à ce qui est observé avec les autres lots de MS, le sérum entier, le rétentat, ainsi que le filtrat exercent un pouvoir stabilisant sur les MS-dextran. Le comportement complexe de ces MS-dextran, qui ont du subir une oxydation pour que l'on puisse y coupler les Ac, suscite plusieurs remarques: certains constituants (protéines?) présents dans les trois extraits semblent masquer ou éviter la déstabilisation des MS en milieu synthétique. Divers effets complexes, voire opposés, gouverneraient le comportement de ces MS.

Nous ne poursuivrons pas l'étude des MS-dextran, dont l'intérêt est moindre que celui des MS-Ac et MS-Ag en fonction de l'objectif que nous nous sommes fixé, et nous n'envisageons que les problèmes liés à la déstabilisation des MS sensibilisées. Les MS-dextran auront cependant permis de démontrer que l'influence du sérum varie selon la nature des MS, qui peuvent être aussi bien stabilisées que déstabilisées. Parmi les paramètres déterminant le comportement des MS en suspension, la surface de la MS, en plus de sa structure interne et de la composition du milieu environnant, semble donc jouer un rôle important.

2.2. Filtration sur gel du sérum entier.

2.2.1. Mode opératoire.

Le fractionnement du sérum entier est réalisé sur une colonne d'Ultrogel AcA 22 dont le choix a été dicté par les résultats de l'ultrafiltration; son domaine de fractionnement s'étend de 100000 à 1200000 Da. La limite d'exclusion est de 3000000 Da. Les supports Ultrogel sont formés d'un réseau mixte de polyacrylamide et d'agarose.

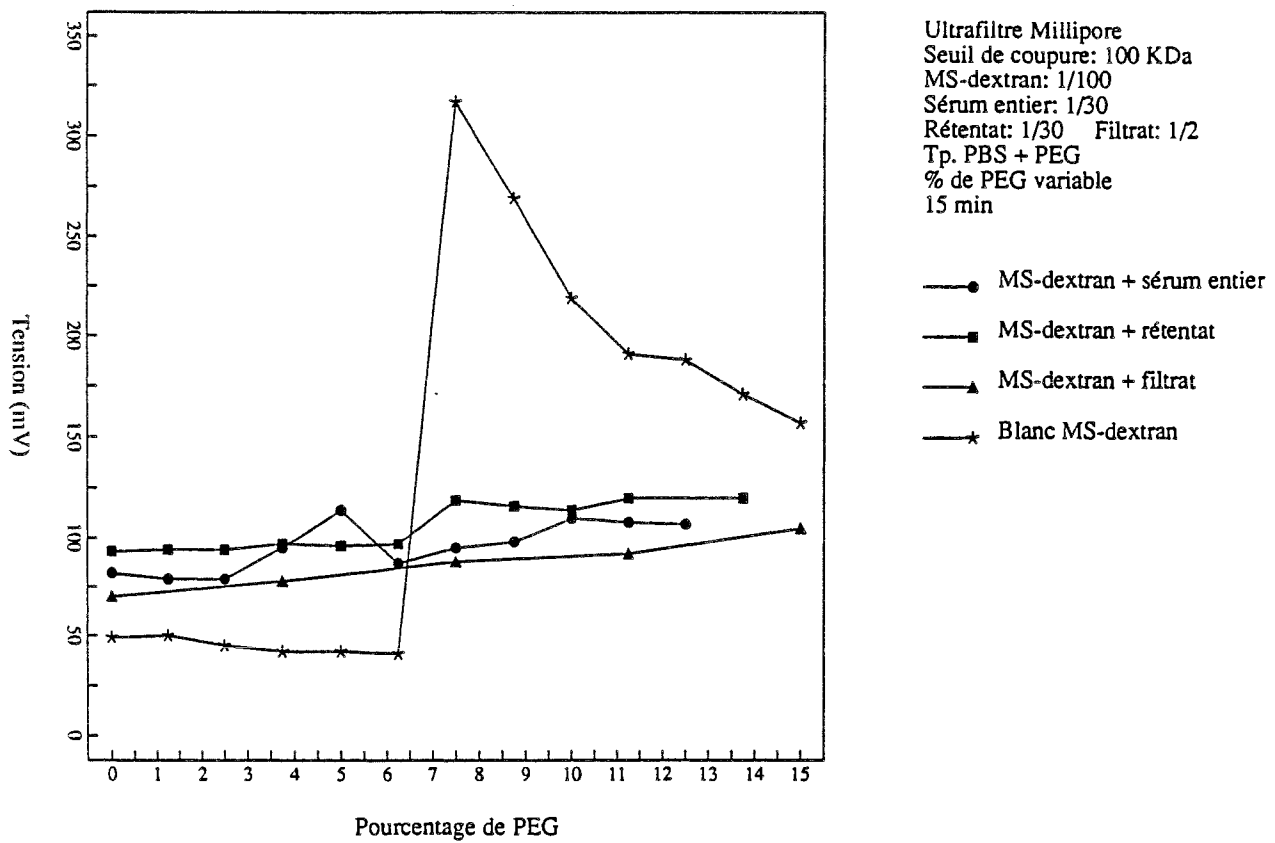
Les paramètres d'utilisation de cette technique sont les suivants:

- Dimensions de la colonne: longueur de 1 m; diamètre de 2.5 cm.
- Hauteur de gel: 84 cm.
- Eluant: tampon PBS.
- Volume de sérum entier déposé: 9 ml soit 567 mg de protéines.
- Volume de bleu dextran 2000 déposé: 5 ml soit 10 mg.
- Débit: 15 ml/heure.
- Volume des fractions collectées: 5 ml.

Le volume mort de la colonne, défini par le volume d'élution du bleu dextran de MM 2000000 Da, totalement exclu du gel, est de 150 ml. L'élution des fractions sériques s'étale sur 65 fractions, soit sous un volume de 325 ml. 9 ml de sérum entier ayant été déposé, celui-ci se retrouve globalement dilué d'un facteur 36 en fin de colonne.

Trois fractionnements du sérum entier ont été effectués dans des conditions identiques, afin de disposer de volumes suffisants pour les analyses ultérieures.

Figure 57 Comportement des MS-dextran en présence du sérum entier, du rétentat et du filtrat issus du sérum entier fractionné sur ultrafiltre



2.2.2. Teneur en protéines (DO à 280 nm).

La figure 58 illustre le profil d'absorption spectrophotométrique des fractions obtenues lors du premier fractionnement du sérum entier, mesuré à 280 nm. Les profils de DO des trois fractionnements successifs du sérum entier sont superposables, ce qui souligne la reproductibilité de la méthode. 4 pics sont individualisés, dont l'un atteint des DO très élevées et s'étale sur plus de 100 ml.

2.2.3. Tests de déstabilisation.

L'ensemble des fractions issues des trois filtrations sur gel est analysé en présence de MS-Ac (lapin et souris), de MS-Mb et de MS-Ethanolamine, d'une part en PBS sans PEG, et d'autre part en PBS renfermant 3% de PEG. Les blancs (fractions et MS) sont stables.

Les figures 59, 60, 61, et 62 présentent les tracés sans PEG et en PEG 3% pour chacun des lots de MS. Seules les courbes de déstabilisation données par les fractions de la 1^{ière} filtration sont présentées, les courbes étant identiques pour les deux fractionnements suivants. Les DO des fractions ont également été reportées afin de les comparer aux tracés de déstabilisation.

Pour chacun des lots de MS les signaux d'agglutination se regroupent en formant des pics. Ceux-ci ne se superposent pas à ceux de DO, ce qui laisse penser que le phénomène non spécifique est lié à une ou plusieurs espèces moléculaires précises et non pas à la teneur globale en protéines. Seules les concentrations respectives de certains constituants semblent intervenir au sein des fractions. Ceci est particulièrement net pour les MS-Ac, qui ne sont que très peu agglutinées par les fractions de plus forte DO (3^{ième} pic). D'autre part les fractions formant le dernier pic de DO ne donnent lieu à aucune déstabilisation, quelque soit le lot de MS.

2.2.3.1. Comportements des MS-Ac.

Les tracés de déstabilisation des deux lots de MS-Ac (figures 59, 60 et 63) se superposent presque totalement, en particulier lorsque le PEG est absent; cela suggère que les éléments déstabilisants sont les mêmes et que l'espèce ayant fourni les Ac couplés aux MS n'influe pas sur le comportement du réactif.

Deux pics très nettement individualisés sont distingués, séparés par un retour des signaux au blanc MS; le plus important forme un plateau sur une dizaine de tubes. Les courbes réalisées en PEG 3% confirment l'existence des pics en accentuant les signaux et mettent en évidence deux autres pics situés l'un dans les premiers tubes, particulièrement marqué pour les MS-Ac souris, l'autre au niveau du tube 70.

La chute des signaux après la formation d'un pic ne signifie pas nécessairement une disparition de la substance interférente:

- Celle-ci peut encore être présente dans les fractions suivantes mais à une concentration telle qu'elle ne provoque plus d'agglutination des MS détectable au néphélémètre dans nos conditions de travail.
- L'apparition d'une molécule stabilisante peut masquer la déstabilisation.

Les MS-Ac semblent donc pouvoir être agglutinées par quatre populations moléculaires distinctes issues du sérum entier. Un pic majoritaire est observé, donnant lieu aux signaux les plus élevés.

Figure 58 Chromatographie du sérum entier sur colonne d'Ultrogel ACA 22

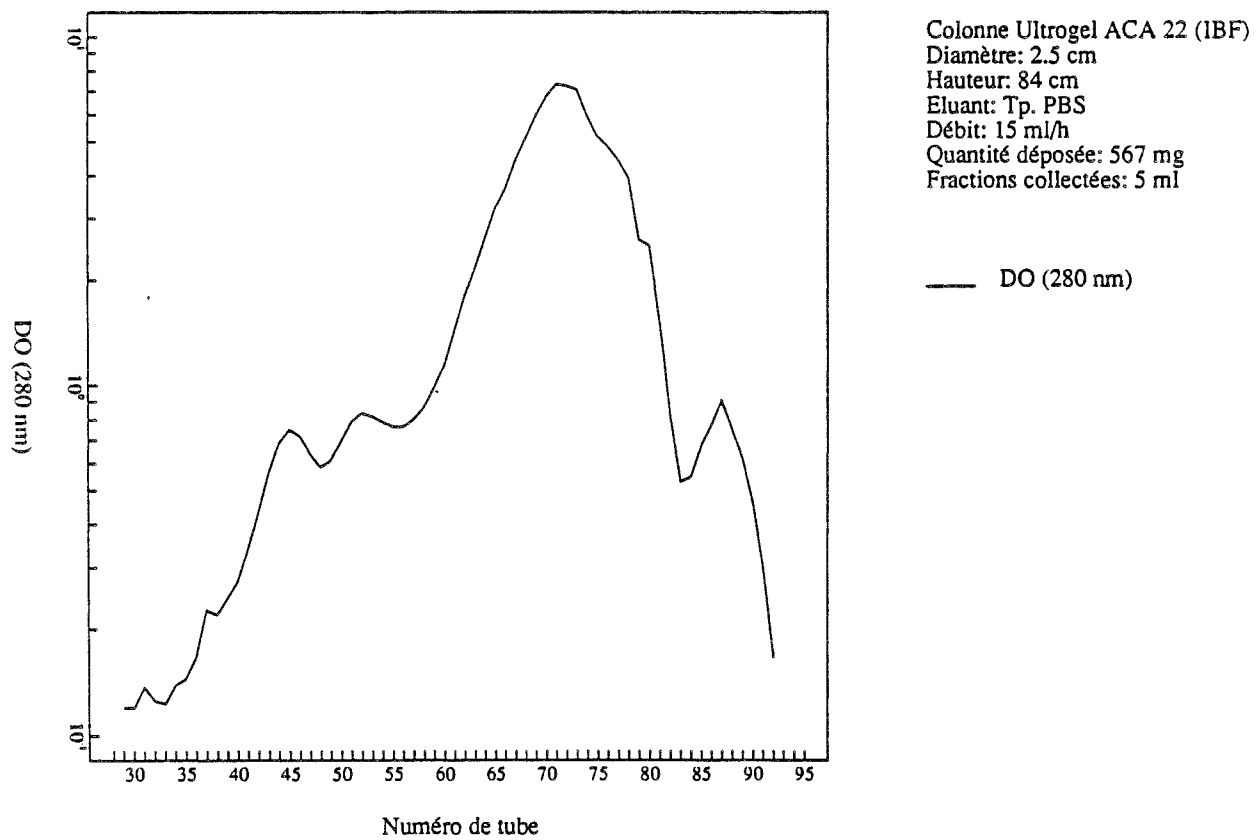


Figure 59 Comportement des MS-Ac souris en présence des fractions sériques issues de l'Ultrogel ACA 22

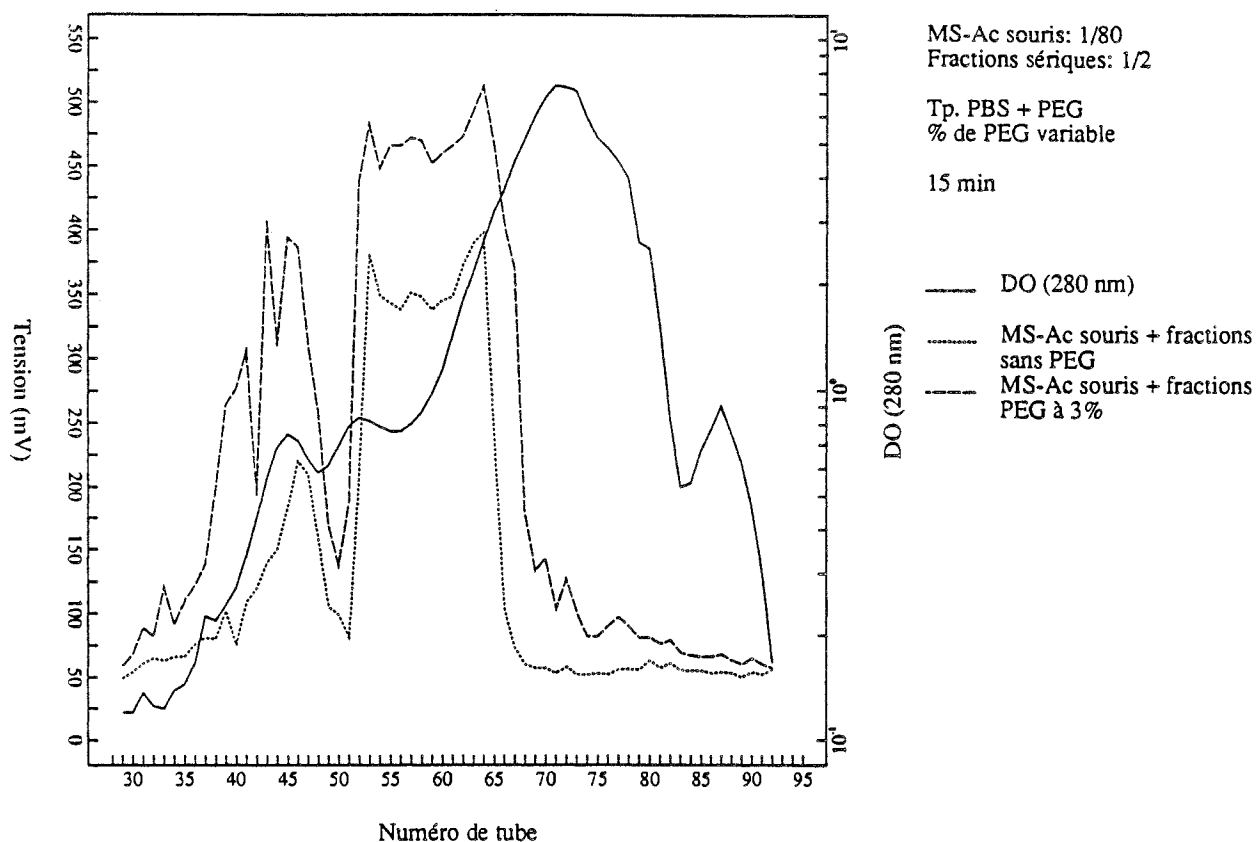
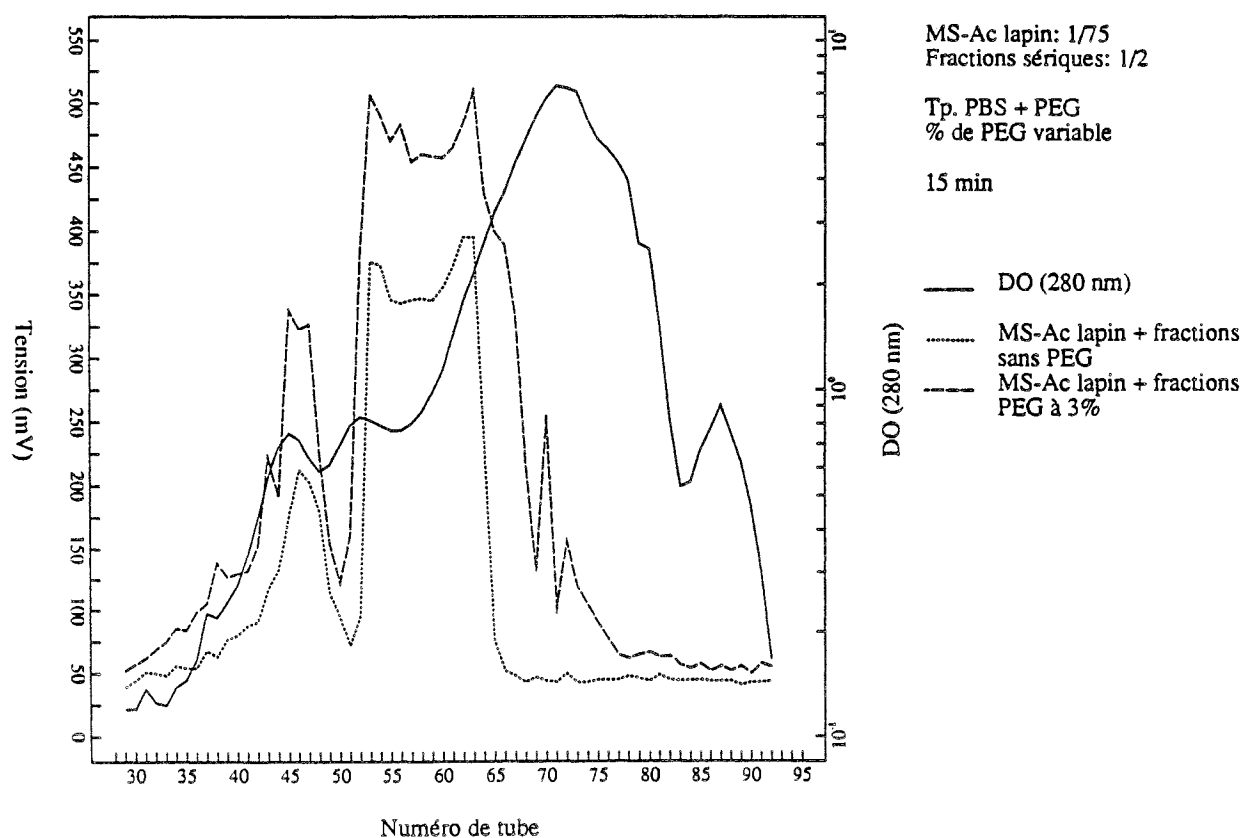


Figure 60 Comportement des MS-Ac lapin en présence des fractions sériques issues de l'Ultrogel ACA 22



2.2.3.2. Comportements des MS-Mb et des MS-Eth.

Les MS-Ethanolamine et les MS-Mb se comportent de façon similaire en présence des fractions (figures 61, 62 et 63); les pics obtenus avec les MS-Mb sont cependant moins bien séparés, ces MS semblent donc être les plus facilement déstabilisées. Les courbes sans PEG indiquent la présence de quatre pics dont l'un est réparti sur plus de 10 tubes. Le PEG 3% renforce les signaux des MS-Eth sans révéler d'autres pics. Pour les MS-Mb, les signaux plafonnent tous à de forts voltages.

La figure 63 permet de comparer les profils fournis par les différents lots de MS en absence de PEG. Les 4 pics détectés pour chaque lot sont tous situés sous les mêmes fractions. Quelque soit le lot de MS considéré, les agents interférents semblent donc identiques, identité qui se traduit par des profils d'agglutination équivalents.

Le dernier pic, bien isolé pour les MS-Eth sans PEG, nécessite 3% de PEG pour être détecté en présence des MS-Ac.

Certains tubes provoquent des signaux uniformes dessinant un plateau, et ceci pour tous les lots de MS, comme si la déstabilisation atteignait le maximum possible compte tenu de la quantité de MS présentes et des capacités de détection du néphélémètre; ces fractions ont été analysées en dilutions sur chaque lot de MS afin de s'assurer que ces plateaux ne cachaient pas plusieurs pics. Les signaux chutent rapidement lorsque la dilution augmente, il s'agit donc bien d'une "saturation" par une espèce moléculaire fortement agglutinante et présente sur plus de 10 tubes, ou par plusieurs espèces produisant des déstabilisations identiques.

En conclusion, le fractionnement du sérum entier en fonction de la MM de ses constituants fournit 65 échantillons dont tous ne sont pas agglutinants. Les profils néphélémétriques de chaque lot de MS individualisent quatre pics de déstabilisation. Les MS-Mb semblent les plus facilement déstabilisées, suivies des MS-Eth puis des deux lots de MS-Ac.

2.2.4. Constitution de pools.

Les fractions correspondant aux sommets des pics et aux flancs des pics, renfermant probablement les mêmes espèces moléculaires interférentes mais à des concentrations différentes, sont mélangées de façon à former des pools.

Sur la base des résultats présentés figure 63, les pools sont constitués de la façon suivante:

- 1^{ière} filtration:

Caractéristiques des pools issus de la filtration sur gel.

Pool	Fractions	Volume total (ml)	Concentration (g/l)
1	37 à 40	20	0.25
2	46 à 49	20	0.66
3	53 à 64	60	1.18
4	70 à 74	25	7.13

- 2^{ième} filtration:

Figure 61 Comportement des MS-Mb en présence des fractions sériques issues de l'Ultrogel ACA 22

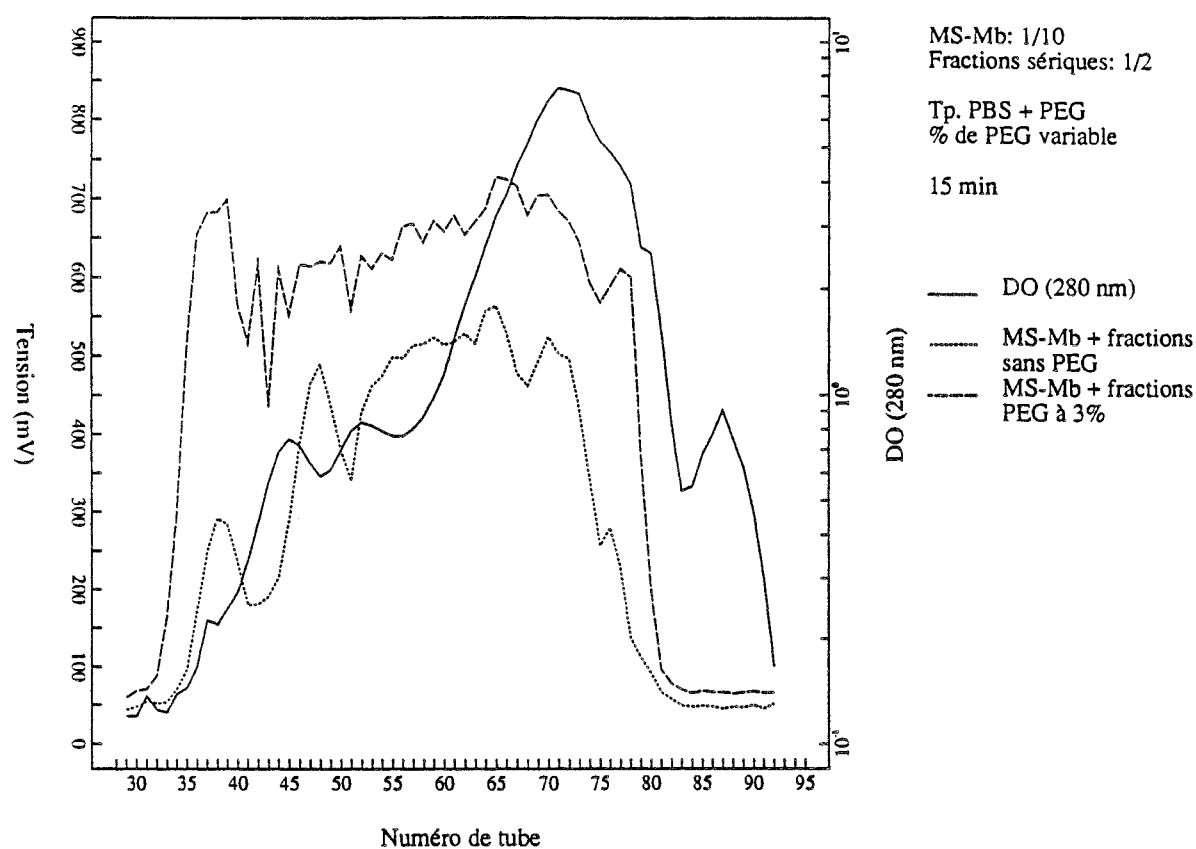


Figure 62 Comportement des MS-Eth en présence des fractions sériques issues de l'Ultrogel ACA 22

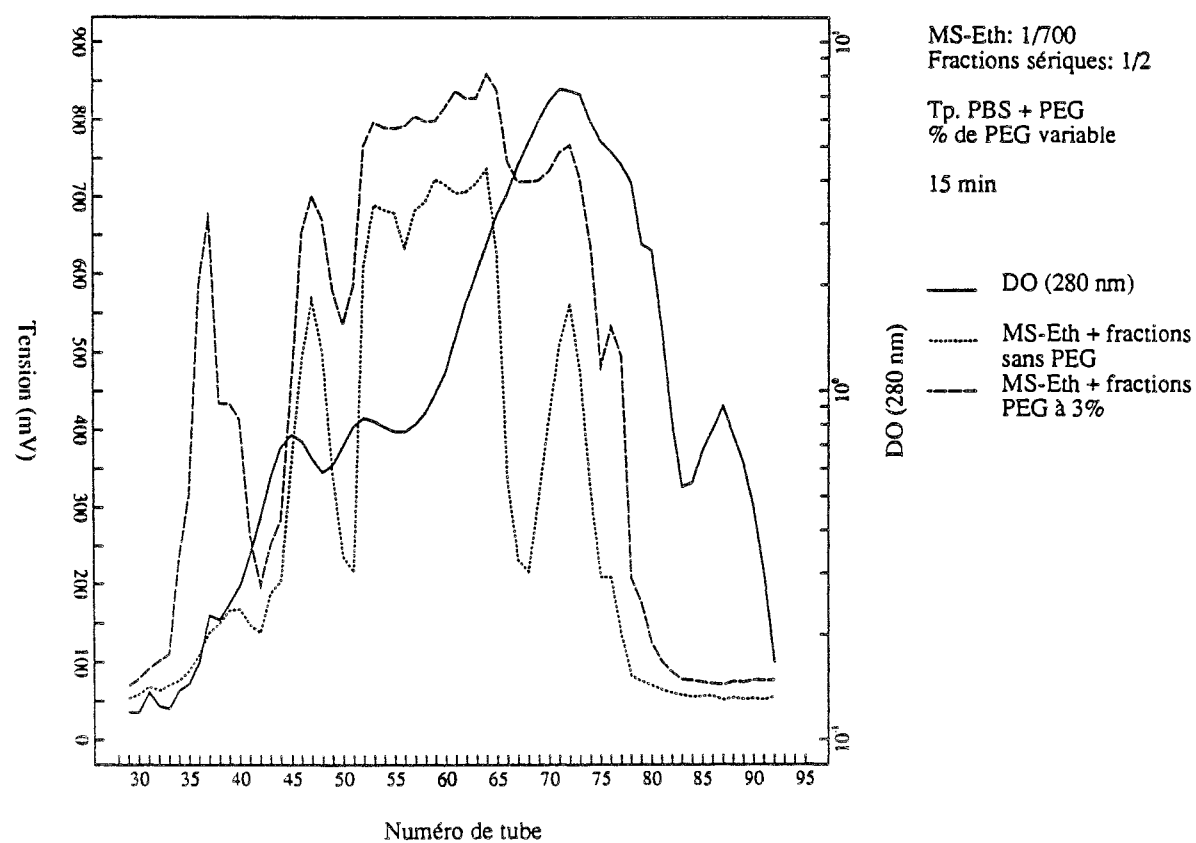
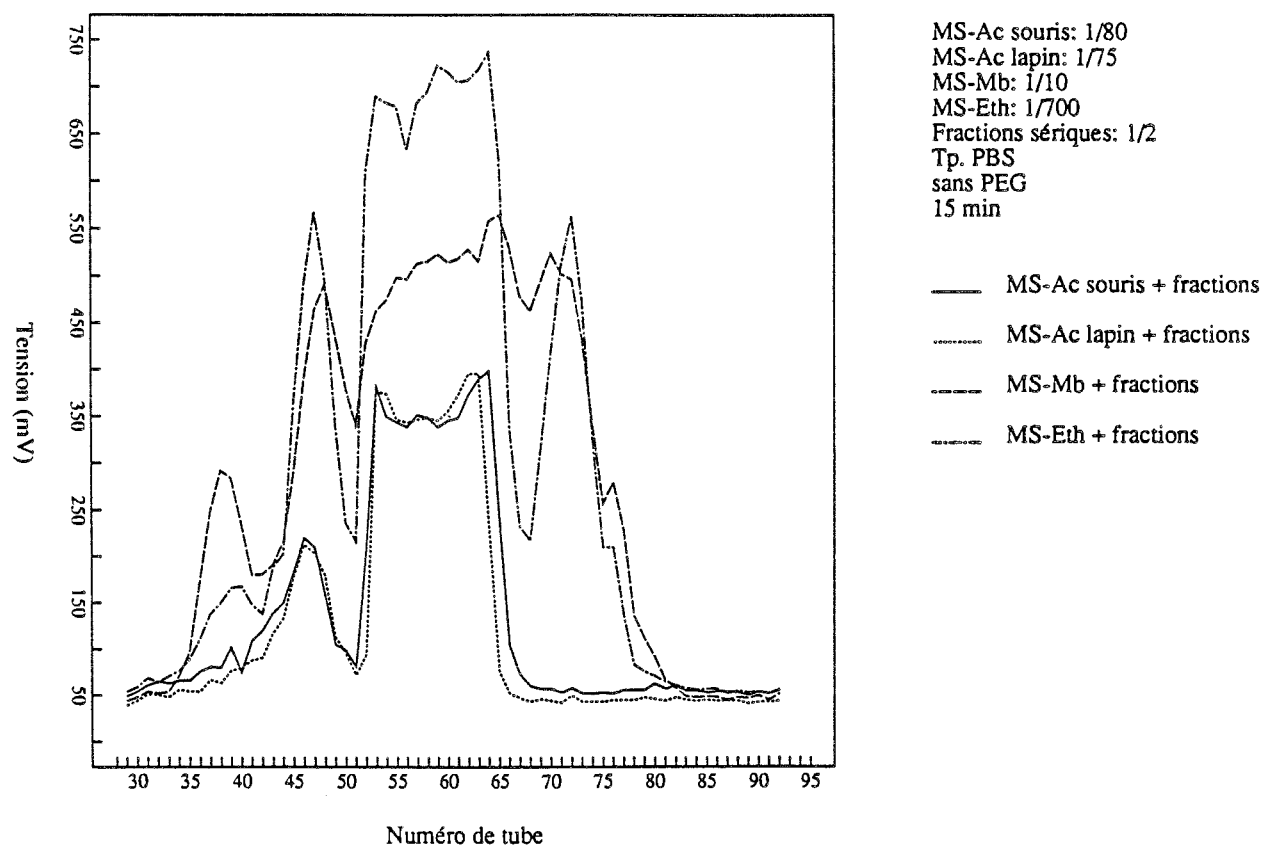


Figure 63 Comportement des 4 lots de MS en présence des fractions sériques issues de l'Ultrogel ACA 22



Caractéristiques des pools issus de la filtration sur gel.

Pool	Fractions	Volume total (ml)	Concentration (g/l)
1	38 à 41	20	0.17
2	46 à 50	25	0.83
3	56 à 65	50	1.11
4	77 à 83	35	6.90

- 3^{ème} filtration:

Caractéristiques des pools issus de la filtration sur gel.

Pool	Fractions	Volume total (ml)	Concentration (g/l)
1	38 à 41	20	0.23
2	47 à 50	20	0.70
3	54 à 62	45	1.04
4	72 à 77	30	7.50

Pour 567 mg de protéines déposées sur le gel, l'ensemble des pools contient en moyenne 294.93 mg de protéines (écart-type sur les 3 filtrations de 24 mg), soit seulement 52% de la totalité du pool.

Les pools sont homogénéisés, aliquotés puis congelés à -20°C.

Ce premier fractionnement a permis de sélectionner après gel filtration les fractions déstabilisantes du sérum entier; les quatre pools agglutinent tous les lots de MS en PBS, sans que l'addition de PEG soit nécessaire. Les pools 1 et 4, représentant les 2 concentrations extrêmes, requièrent cependant 3% de PEG pour agglutiner les MS-Ac.

2.2.5. Caractérisation des pools après traitement.

La sélection des quatre pools est fondée initialement sur le critère de déstabilisation des MS. Néanmoins, ces pools ne présentent d'intérêt que si leur traitement par des MS-Eth élimine leur caractère déstabilisant. L'efficacité de ce traitement prouvera qu'il s'est produit une modification au niveau des constituants déstabilisants. C'est ce que nous avons vérifié.

Les 4 pools sont traités au 1/2 pendant 1 h par 25 mg de MS-Eth. Chacun des pools traités est accompagné de son témoin non traité dans lequel les MS-Eth sont remplacées par du PBS. Les surnageants des pools traités et non traités sont recueillis par centrifugation. Leur concentration et leur pouvoir agglutinant sont déterminés.

2.2.5.1. Teneur en protéines (DO à 280 nm) des surnageants de traitement.

Les DO des surnageants traités et non traités sont déterminées pour les 4 pools; aucune variation de concentration n'est observée à la suite du traitement pour les lots 1, 2 et 4. Si l'on suppose que des constituants sériques se lient aux MS-Eth, leur absence dans le surnageant traité n'est pas détectée au spectrophotomètre. En revanche la concentration du lot 3, pour lequel les plus forts signaux d'agglutination avaient été constatés, diminue nettement après traitement: elle s'abaisse de 1.18 g/l avant traitement à 0.87 g/l après le traitement, 27% de

protéines ne sont pas retrouvées dans le surnageant traité. Les MS-Eth semblent donc avoir retenu de façon importante un ou plusieurs constituants sériques au cours du traitement.

2.2.5.2. Tests de déstabilisation des MS.

Les traitements s'effectuant sur le sérum au 1/2, les tests de déstabilisation des surnageants font nécessairement intervenir une dilution supérieure aux dilutions précédentes. Dans la première étape de mise en réaction, 200 µl des surnageants dilués au 1/2 sont incubés 30 min en présence de 30 µl de MS. La deuxième étape comporte uniquement l'addition de 70 µl de PBS, l'ensemble des tests étant réalisé sans addition de PEG. La dilution finale des pools traités et non traités est de 1/3.

Le pouvoir déstabilisant des surnageants des pools 1 et 4, qui agglutinent peu les MS-Ac sans PEG, est testé uniquement sur les MS-Mb et sur les MS-Eth. Les surnageants des pools 3 et 4 sont par contre étudiés vis-à-vis des 4 lots de MS.

Les chiffres d'agglutination (en mV) constatés sont regroupés dans le tableau ci-dessous; les lettres NT décrivent le surnageant d'un pool non traité, la lettre T désigne le surnageant de ce même pool traité.

Valeurs des signaux (mV) des MS en présence des pools non traités (NT) et traités (T).

Lot de MS	Pool 1		Pool 2		Pool 3		Pool 4	
	NT	T	NT	T	NT	T	NT	T
MS-Mb	237	48	381	64	503	52	107	47
MS-Eth	178	61	111	59	566	60	70	56
MS-lapin			100	53	382	44		
MS-souris			83	61	353	53		

Ces valeurs montrent que tous les signaux chutent après le traitement des pools, à des chiffres très proches des blancs MS. L'efficacité du traitement est particulièrement nette pour le pool 3, qui agglutinait le plus fortement les 4 lots de MS.

Nous constatons par ailleurs que les signaux de déstabilisation induits par les pools non traités sont plus faibles que ceux précédemment observés avec les fractions séparées. Le rassemblement des fractions a eu pour conséquence de diluer les éléments aspécifiques, ce qui se traduit par une légère diminution des déstabilisations. De plus, ces fractions étaient testées au 1/2 final, les surnageants des pools dilués à la suite du traitement sont introduits dans les cuves au 1/3 final. Or, nous avons constaté que les signaux d'agglutination s'abaissent rapidement lorsque la dilution augmente. Le phénomène interférant est donc étroitement lié à la concentration des substances responsables de la déstabilisation.

2.2.6. Conclusion.

La technique de filtration sur gel a permis de fractionner les constituants sériques sur la base de leurs MM. Nous avons pu constater que:

- Toutes les fractions n'agglutinent pas les MS sensibilisées. Seuls 4 groupes de fractions, rassemblées en 4 pools, présentent ce caractère déstabilisant. Cette propriété est liée à la concentration en agent déstabilisant de chaque fraction.
- Les 4 pools sont tous stabilisés après leur traitement par les MS-Eth.

- Les concentrations protéiques des surnageants des pools traités 1, 2 et 4 ne varient pas, alors que le pool 3 perd 27% de ses protéines durant le traitement.

Les pools issus de ce premier fractionnement répondent aux deux critères retenus: d'une part ils agglutinent les 4 lots de MS, d'autre part le traitement leur fait perdre totalement leur caractère déstabilisant. Pour affiner la caractérisation des éléments interférents, nous nous proposons de refractionner par chromatographie d'échange d'ions les contenus dans chaque pool. Cela nous permettra de mieux analyser et comparer ces différents pools traités et non traités.

3. Fractionnement sur DEAE cellulose des pools 1, 2, 3 et 4.

Chacun des 4 pools isolés à partir du sérum entier est refractionné sur une colonne de DEAE cellulose. Les conditions expérimentales sont identiques pour les 4 pools.

3.1. Mode opératoire.

- Equilibrage de la cellulose: 15 g de cellulose sont mis en suspension dans 500 ml de tampon phosphate de sodium 0.1M pH 8. L'échangeur est lavé deux fois dans ce tampon puis 4 fois dans un tampon phosphate de sodium 0.01M pH 8 (tampon A), avec contrôle du pH et de la force ionique du surnageant. En fin d'équilibrage, l'échangeur se trouve aux mêmes force ionique et pH que le tampon A. L'échangeur et le tampon sont dégazés.
- Colonne et gradient: un double gradient linéaire de pH et de la force ionique est réalisé.
 - Colonnes:
 - + Hauteur de l'échangeur: 6 cm; diamètre: 1.1 cm (pools 1 et 2).
 - + Hauteur de l'échangeur: 20 cm; diamètre: 2.5 cm (pools 3 et 4).
 - Tampons dégazés:
 - + A: phosphate de sodium 0.01M pH 8.
 - + B: phosphate de sodium 0.01M NaCl 0.5M pH 4.8.
 - Débit: 60 ml/h (2 circuits pompe).
 - Dépôts des échantillons après dialyse d'une nuit à 4°C contre le tampon A:
 - + Pool 1: 3.2 mg; gradient: 20 ml de A + 20 ml de B; fractions: 1 ml.
 - + Pool 2: 6.5 mg; gradient: 40 ml de A + 40 ml de B; fractions: 2 ml.
 - + Pool 3: 56 mg; gradient: 80 ml de A + 80 ml de B; fractions: 4 ml.
 - + Pool 4: 65 mg; gradient: 80 ml de A + 80 ml de B; fractions: 4 ml.

Les pools 1 et 2 ont été préconcentrés par dialyse contre du PEG 20 M Da. La faiblesse de leurs concentrations a rendu nécessaire de rassembler des aliquots décongelés des deux premières gel filtrations.

3.2. Résultats des tests de déstabilisation et du traitement des fractions.

Les profils des DO à 280 nm des fractions éluées sont propres à chaque pool, ainsi que les valeurs des signaux de déstabilisation des MS. Les résultats globaux obtenus sont donc exposés pool par pool; ils comprennent:

- Les tracés de DO.
- Les tests de déstabilisation en présence des MS.

- L'incidence du traitement.
- La constitution de sous-pools.

Nous commencerons par l'étude du pool 4, renfermant les constituants de plus faibles MM pour terminer avec le pool 1.

3.2.1. Pool 4.

3.2.1.1. Teneur en protéines (DO à 280 nm) des fractions.

La figure 64 illustre le tracé de DO obtenu pour l'ensemble des fractions, les profils des gradients de pH et de force ionique.

Le premier pic de DO correspond à l'élution des protéines non retenues sur l'échangeur, sortant de la colonne sur une dizaine de fractions avant le démarrage des gradients de pH et de force ionique. Il est bien connu que ces fractions sériques renferment principalement des IgG. La quantité totale des protéines non retenues s'élève à 12.3 mg soit 19% de celle déposée sur la colonne. Sous l'effet du gradient de force ionique, les protéines adsorbées sur l'échangeur sont éluées; deux pics sont observés. Le premier se décroche rapidement dès que la force ionique s'élève; le second pic atteint une DO maximale très élevée. Entre ces deux maximums semble s'amorcer un autre pic, provoquant un épaulement de la courbe de DO en regard du tube 33. La totalité des protéines est éluee à environ 50% du gradient de pH et de force ionique.

Le pool 4 passé sur DEAE cellulose s'est scindé en 3 populations principales dont l'une, non retenue sur la colonne, est vraisemblablement composée d'IgG.

3.2.1.2. Tests de déstabilisation.

L'ensemble des fractions non retenues et éluées est testé en présence des MS. Disposant de fractions de faibles volumes, seules les MS-Eth ont été utilisées dans les tests de déstabilisation. Par contre, l'incidence du traitement sur ces fractions sera étudiée vis-à-vis de tous les lots de MS.

La recherche de la concentration minimale de PEG nécessaire pour visualiser des signaux d'agglutination aboutit à des valeurs différentes pour les fractions exclues et les fractions éluées: il faut atteindre 4% de PEG pour les fractions non retenues et aller jusqu'à 8.75% pour les fractions éluées. Ces pourcentages sont nettement plus élevés que ceux mis en oeuvre précédemment (les fractions provenant de la filtration sur gel agglutinaient les MS-Eth sans PEG). Ceci s'explique probablement par la plus grande dilution des échantillons.

La figure 65 représente les signaux d'agglutination des fractions non retenues et éluées, obtenus en présence respectivement de 4% et 8.75% de PEG; nous constatons que:

- Les fractions non retenues forment un pic de déstabilisation superposé à celui de la DO. Mais l'agglutination n'est décelable que sur un seul tube (le 6) alors que le profil de DO s'étend sur plus de 10 fractions. Ici l'influence de la concentration en agent déstabilisant est particulièrement nette: seul le tube de plus forte DO agglutine les MS.
- Les fractions éluées donnent lieu à deux pics de déstabilisation très proches, se chevauchant. Le premier est calqué sur le faible pic de DO. Le second pic d'agglutination, situé dans la montée du pic de forte DO, correspond tout à fait à l'épaulement précédemment décrit comme témoin d'un éventuel pic supplémentaire. Les fractions présentant les plus fortes DO ne provoquent aucune déstabilisation des MS. Nous notons que les deux pics de déstabilisation

Figure 64 Chromatographie du pool 4 sur colonne de DEAE cellulose

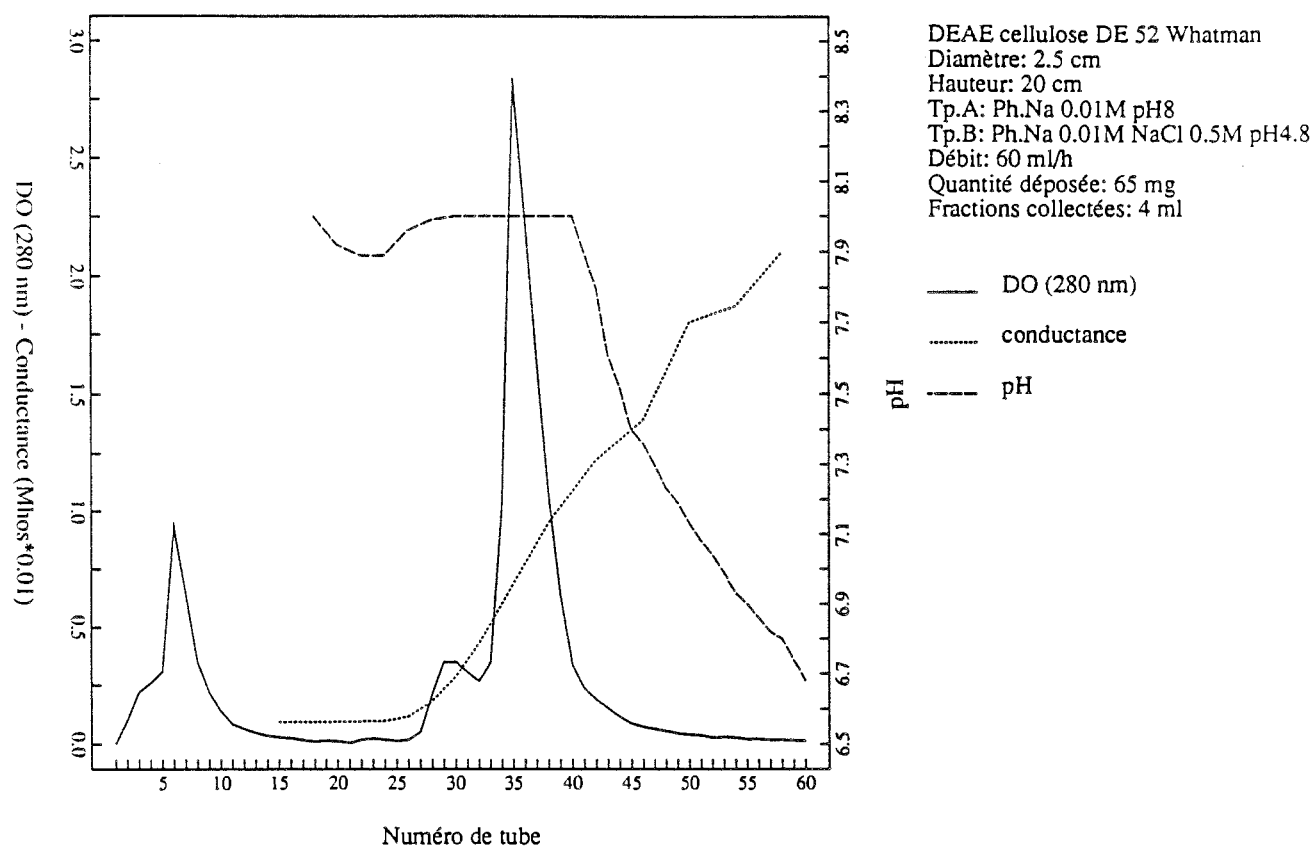
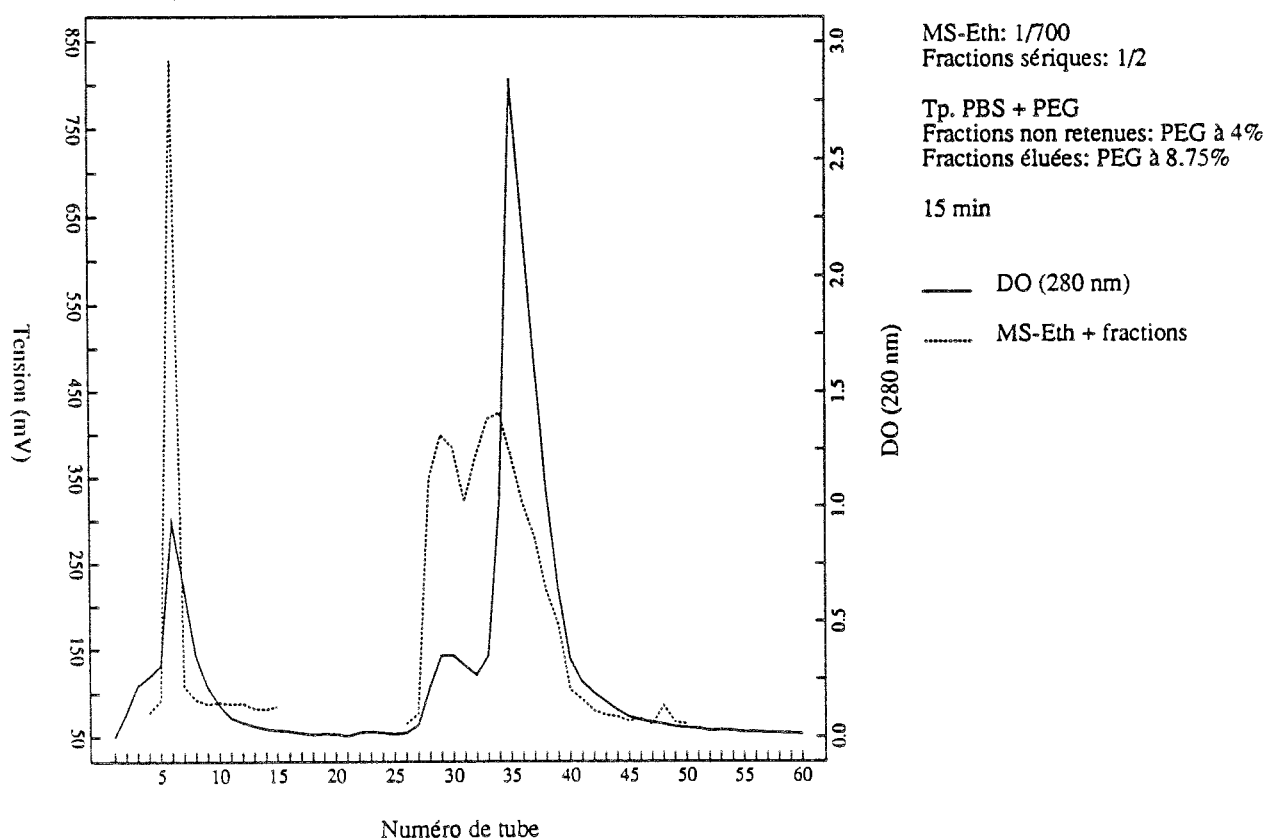


Figure 65 Comportement des MS-Eth en présence des fractions sériques issues du pool 4 déposé sur colonne de DEAE cellulose



atteignent des signaux identiques alors que leurs DO respectives sont très différentes.

En conclusion, le fractionnement du pool 4 sur DEAE cellulose permet d'isoler 3 pics déstabilisant les MS-Eth. L'efficacité du traitement sera évaluée sur ces fractions.

3.2.1.3. Traitement.

3.2.1.3.1. Modification du protocole de traitement.

Le protocole de traitement du milieu sérique suivi jusqu'à présent mettait en présence les MS-Eth et le milieu sérique au 1/2; les tests de déstabilisation étaient menés sur les fractions au 1/2. Les contrôles de stabilisation des surnageants de traitement ne pouvant s'effectuer à cette dilution, ils ont été effectués au 1/3.

Les fractions obtenues sur DEAE cellulose subissent une dilution supplémentaire par rapport au pool initial. Si les surnageants sont testés au 1/3, le témoin non traité risque, de par sa faible concentration, ne plus être déstabilisant, si bien que nous ne pourrions conclure quant à l'efficacité du traitement. Ce problème est contourné en apportant deux modifications:

- Les traitements sont effectués sur les fractions centrales de chaque pic, pour lesquelles les signaux d'agglutination les plus élevés sont observés, et non sur les pools de fractions. Les fractions 6, 29 et 34 seront donc testées. Si le traitement s'avère efficace, nous rassemblerons les fractions formant le pic pour constituer des pools.
- Les fractions sont traitées pures et non plus au 1/2, par un culot essoré de MS-Eth. La suspension de MS à 25 mg/ml est préalablement centrifugée, le surnageant éliminé et le culot de MS-Eth est remis en suspension dans la fraction non diluée. Le mélange est incubé pendant 1 h avant séparation par centrifugation. Le témoin non traité est constitué de la fraction incubée sans MS et centrifugée dans les mêmes conditions.

3.2.1.3.2. Teneur en protéines (DO à 280 nm) des surnageants de traitement.

Le surnageant traité de la fraction 6 renferme 0.57 g/l de protéines; le témoin non traité contient 0.93 g/l de protéines. Près de 40% du contenu protéique de cette fraction a été perdu lors du traitement. Les MS-Eth ont vraisemblablement fixé des constituants fortement concentrés dans cette fraction.

Les concentrations protéiques des surnageants traités et non traités des fractions 29 et 34 restent inchangées.

3.2.1.3.3. Tests de déstabilisation des MS.

Les tests d'agglutination des surnageants des fractions 6, 29 et 34 traitées et non traitées sont exécutés au 1/2 en présence des MS-Eth, des MS-Mb et des MS-Ac (souris et lapin).

Le tableau ci-dessous récapitule les signaux (mV) obtenus en présence de chaque lot de MS:

Valeurs des signaux des MS (mV) en présence des fractions (pics) non traitées (NT) et traitées (T).

Lot de MS	Tube 6		Tube 29		Tube 34	
	NT	T	NT	T	NT	T
MS-Mb	995	77	353	69	372	65
MS-Eth	197	93	420	82	451	70
MS-lapin	82	66	60	44	101	45
MS-souris	125	87	61	66	145	60

Nous constatons que les 3 fractions sélectionnées avec les MS-Eth déstabilisent les autres lots de MS. Les signaux des MS-Ac sont cependant plus faibles, ce que nous avons déjà observé en gel filtration pour le pool non fractionné. Ces MS-Ac étant plus stables, leur déstabilisation requiert des concentrations de PEG supérieures à celles utilisées ici.

Les signaux chutent considérablement après le traitement et ce pour tous les lots de MS. L'efficacité du traitement est totale. Les fractions déstabilisantes constitutives de chaque pic peuvent donc être rassemblées.

3.2.1.4. Constitution de sous-pools.

Les sous-pools sont identifiés par des lettres associées au numéro de la fraction dont ils sont issus. Le pool 4 de la gel filtration a donné naissance à trois pics en DEAE cellulose, que nous nommerons 4A, 4B et 4C. La lettre A correspond aux fractions poolées non retenues sur la colonne, les lettres suivantes aux fractions éluées.

Les pools renferment au total 36 mg de protéines soit 54% de la quantité déposée sur la colonne de DEAE cellulose. Ils sont constitués de la façon suivante:

Caractéristiques des pools issus de la DEAE cellulose.

Pool	Fractions	Volume total (ml)	Concentration (g/l)
4A	6	4	0.93
4B	28 à 31	16	0.31
4C	32 à 36	20	1.35

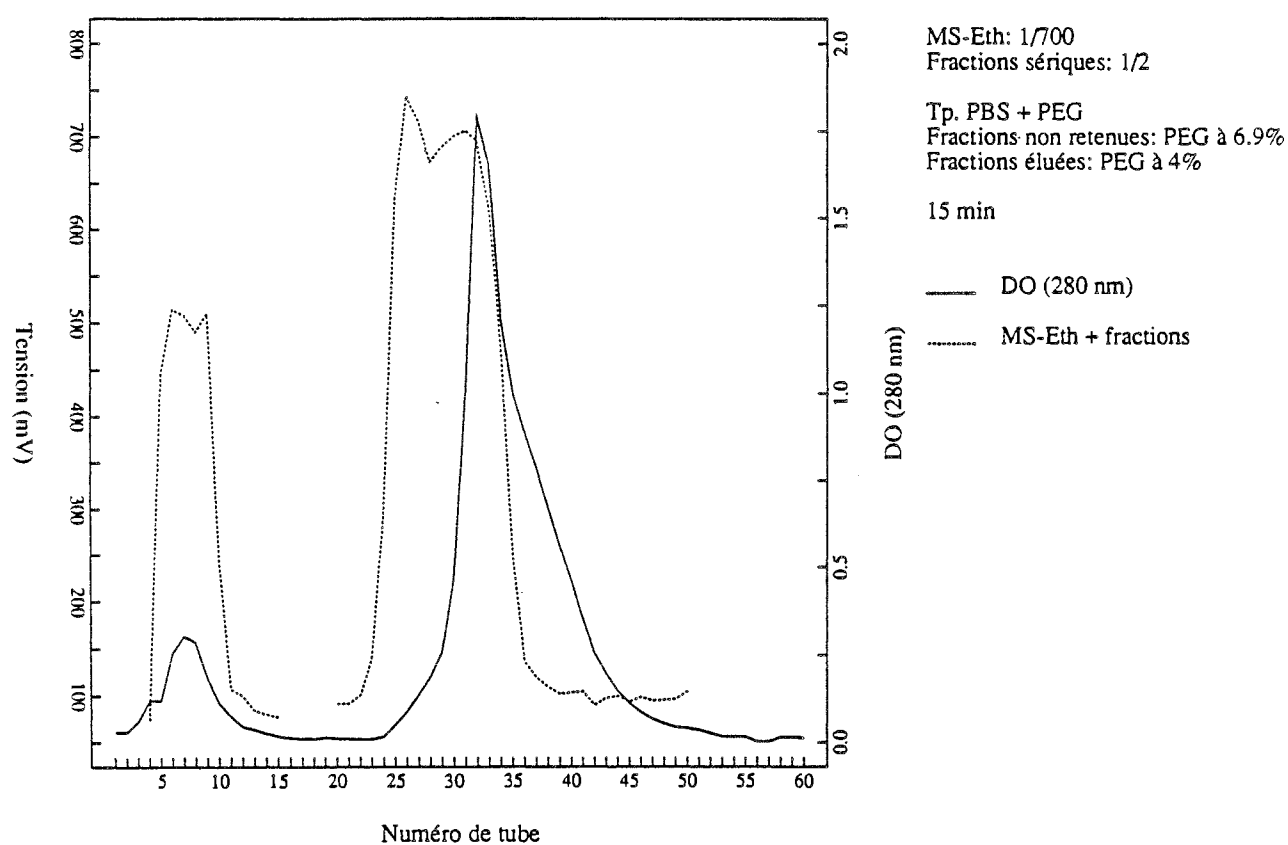
Les études analytiques comparatives concernant chaque pool traité et non traité seront développées dans le chapitre suivant (cf. Ch.II.1.2.4.).

3.2.2. Pool 3.

3.2.2.1. Teneur en protéines (DO à 280 nm) des fractions et tests de déstabilisation.

Sur la figure 66 sont reportés les valeurs de DO des fractions et les signaux de déstabilisation des MS-Eth provoqués par ces fractions. Les fractions non retenues sur la colonne forment un petit pic contenant 5.9 mg de protéines soit 10.5% de la quantité totale déposée.

Figure 66 Comportement des MS-Eth en présence des fractions sériques issues du pool 3 déposé sur colonne de DEAE cellulose



Le reste des protéines est élué progressivement en fonction de l'augmentation de la force ionique. Un pic majoritaire est observé au niveau du tube 32, mais des épaulements sur les flancs ascendant et descendant de ce pic semblent suggérer l'existence de 2 autres groupes de constituants, en concentrations plus faibles.

Les essais d'agglutination des fractions requièrent l'emploi de PBS à 6.9% de PEG et permettent de révéler une importante déstabilisation par les fractions non retenues. Les fractions éluées nécessitent 4% de PEG.

Les premières fractions exclues de la colonne provoquent un large pic de déstabilisation calqué sur celui de la DO. Les fractions éluées agglutinent également les MS de façon importante. Deux pics d'amplitudes équivalentes sont observés; le premier correspond aux fractions situées dans l'amorce du pic important de DO, le second est nettement calqué sur ce dernier. Or les teneurs en protéines de ces deux pics, évaluées par leurs DO à 280 nm, diffèrent fortement.

Nous avons calculé pour ces deux pics les rapports I max / DO de la fraction correspondante. Ce rapport reflète la plus ou moins grande capacité agglutinante des fractions à teneur égale en protéines.

Ce rapport est de 8350 pour le premier pic, situé vers le tube 26, et de 1000 pour le 2^{ème} pic (tube 31). Les fractions 25 à 28 renferment donc des éléments très peu concentrés capables de déstabiliser fortement les MS-Eth.

3.2.2.2. Traitement.

Les fractions 6, 26 et 31 pour lesquelles les signaux de déstabilisation sont les plus importants au sein de chaque pic sont traitées par 25 mg/ml de MS-Eth.

3.2.2.2.1. Teneur en protéines (DO à 280 nm) des surnageants de traitement.

La comparaison des concentrations protéiques des surnageants traités et non traités de chaque fraction, mesurées par leur DO à 280 nm, ne fait apparaître aucune variation à la suite du traitement alors que le pool 3 entier traité présente une chute de DO après son traitement.

3.2.2.2.2. Tests de déstabilisation des MS.

Les signaux d'agglutination (en mV) des MS en présence des fractions traitées et non traitées sont recensés dans le tableau ci-dessous:

Valeurs des signaux des MS (mV) en présence des fractions (pics) non traitées (NT) et traitées (T).

Lot de MS	Tube 6		Tube 26		Tube 31	
	NT	T	NT	T	NT	T
MS-Mb	439	79	614	89	640	80
MS-Eth	469	79	623	84	683	89
MS-lapin	207	45	75	44	389	58
MS-souris	211	54	92	79	401	75

Tous les lots de MS sont déstabilisés par les fractions non traitées mais retournent à des signaux proches de leurs blancs MS après traitement. Les MS-Ac ne sont que très peu

agglutinées par la fraction 26 non traitée. En revanche, la fraction 31, relativement proche de la 26, est dotée d'un pouvoir agglutinant supérieur sur ces MS.

Le traitement des trois fractions s'est révélé efficace, ce qui nous autorise à poursuivre l'étude détaillée de leurs contenus (cf. Ch.II.1.2.3.).

3.2.2.3. Constitution de sous-pools.

Le tableau ci-dessous décrit la composition des 3 pools formés. Ils contiennent au total 27.4 mg de protéines soit 48% de la quantité déposée.

Caractéristiques des pools issus de la DEAE cellulose.

Pool	Fractions	Volume total (ml)	Concentration (g/l)
3A	5 à 9	20	0.23
3B	25 à 28	16	0.11
3C	29 à 33	20	1.05

3.2.3. Pool 2.

La description des résultats obtenus avec ce pool suivra un plan différent de celui adopté pour les deux pools précédents. Les tests de déstabilisation des MS se sont en effet heurtés à des problèmes dus à la faible concentration de ce pool, ce qui nous a conduit à modifier certains points expérimentaux.

3.2.3.1. Teneur en protéines (DO à 280 nm) des fractions.

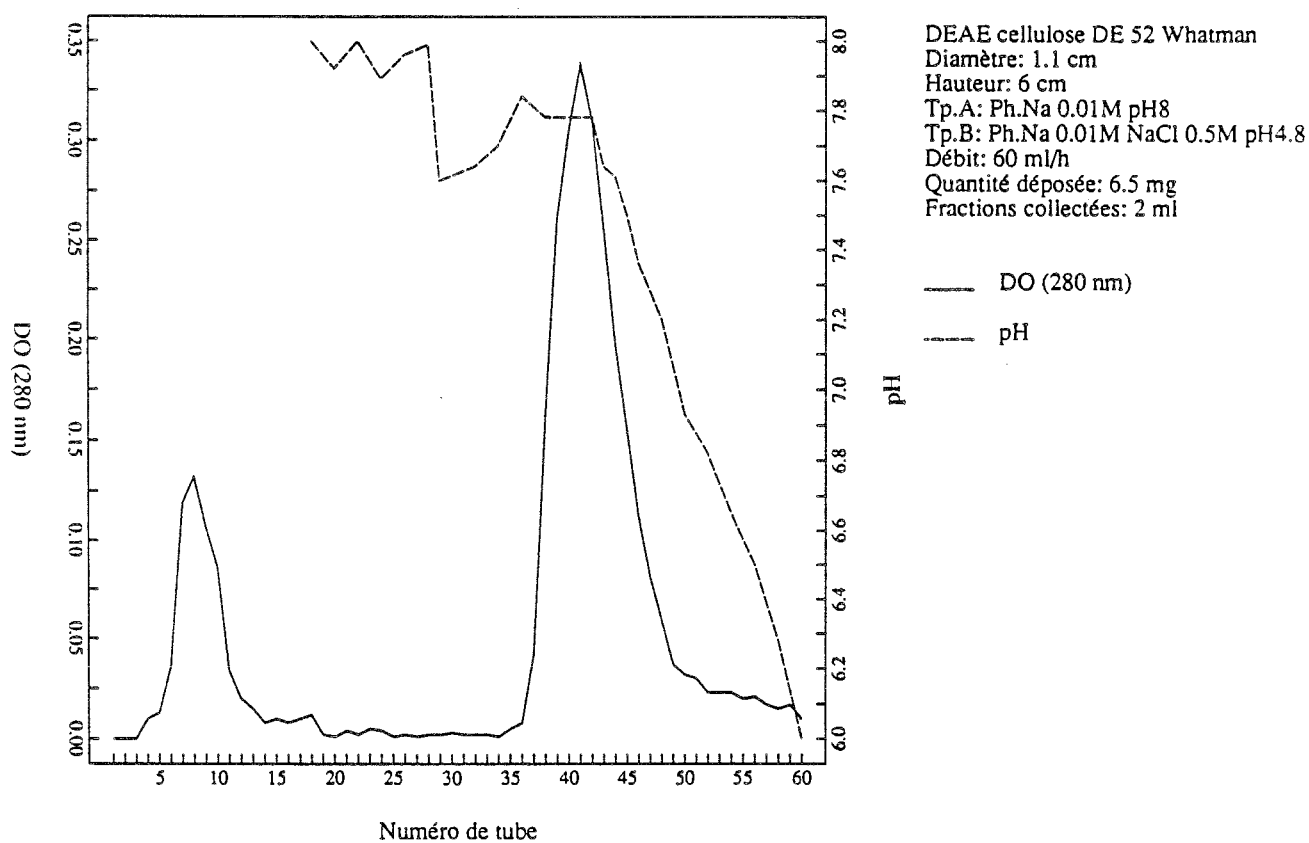
La figure 67 illustre le tracé de DO des fractions sortant de la colonne. Deux pics sont mis en évidence. Le premier correspond aux fractions non retenues, quittant la colonne avant la mise en place du gradient. Il contient 20% de la quantité totale de protéines déposée. Les 80% restants sont élués par le gradient en un pic unique. Les DO des deux pics sont relativement basses en raison de la faible quantité de protéines déposée (6.5 mg).

3.2.3.2. Constitution de sous-pools.

Nous n'avons pas pu déterminer la quantité minimale de PEG à mettre en oeuvre pour détecter des signaux d'agglutination dans les conditions expérimentales fixées. Les fractions sont en effet très diluées et requièrent probablement plus de 15% de PEG. Mais au delà de ce pourcentage, les MS sont instables. Nous avons donc reconcentré les échantillons après avoir réuni en pools les fractions formant un même pic de DO, afin d'augmenter les volumes, dans l'objectif de les concentrer.

Le pool 2A est constitué par les fractions non retenues. Les tubes formant le pic élué sont regroupés dans le pool 2B. Nous réunissons également les fractions situées en fin du pic élué (pool 2C). Ces pools ont été concentrés par dialyse inversée contre du PEG 20 M Da. La teneur en protéines des pools reconcentrés est la suivante:

Figure 67 Chromatographie du pool 2 sur colonne de DEAE cellulose



Caractéristiques des pools issus de la DEAE cellulose puis concentrés.

Pool	Fractions	Volume total (ml)	Concentration (g/l)
2A	3 à 16	7	0.51
2B	36 à 49	8.5	0.65
2C	52 à 60	8.5	0.37

3.2.3.3. Tests de déstabilisation.

Nous avons déterminé, pour chaque pool reconcentré, la teneur maximale en PEG; les pourcentages de PEG en limite de stabilité sont les suivants:

- Pool 2A: 8.75% de PEG.
- Pool 2B: 6.2% de PEG.
- Pool 2C: 10.6% de PEG.

Pour ces pools concentrés, le pourcentage toléré de PEG est inversement lié à leurs teneurs en protéines. Les quantités de PEG à ajouter sont importantes, ce qui est en accord avec le faible taux de protéines dans ces pools, en dépit de leur reconcentration.

Les tests de déstabilisation des MS-Eth menés sur les pools donnent les résultats suivants:

- Le pool 2A, renfermant les protéines non retenues, ne déstabilise pas les MS-Eth.
- Le pool 2B agglutine fortement les MS-Eth, un signal de 563 mV est observé.
- Le pool 2C déstabilise également les MS-Eth, un signal de 345 mV est constaté.

Le pool 2A est le premier des pools non retenus sur la colonne qui n'agglutine pas les MS. Le pool 2 est élué en début de filtration sur gel, il renferme donc principalement les constituants de forte MM du sérum entier. Le pool 2A contient vraisemblablement des IgG sous forme agrégée mais leur concentration trop faible ne permettrait pas d'en visualiser l'activité déstabilisante des MS.

3.2.3.4. Traitement.

Le traitement des pools 2B et 2C par les culots de MS-Eth à 25 mg/ml donne les résultats suivants:

- Les DO des surnageants traités sont équivalentes à celles des surnageants non traités.
- Les tests de déstabilisation de ces surnageants en présence des MS-Eth aboutissent aux chiffres suivants:
 - . MS-Eth + 2B NT: 563 mV.
 - . MS-Eth + 2B T: 330 mV.
 - . MS-Eth + 2C NT: 345 mV.
 - . MS-Eth + 2C T: 245 mV.

Les signaux de déstabilisation ont certes chuté à la suite du traitement mais une déstabilisation résiduelle persiste.

En conclusion, le fractionnement du pool 2 sur DEAE cellulose permet de distinguer 3 groupes de constituants; les protéines non retenues n'agglutinent pas les MS-Eth. Les deux autres populations déstabilisent les MS-Eth, phénomène que leur traitement n'élimine pas

totale. Nous poursuivrons néanmoins l'analyse de ces pools, en particulier du pool 2 non fractionné, capable de déstabiliser les MS et dont le traitement s'était révélé efficace.

3.2.4. Pool 1.

Ce pool contient les constituants sériques de MM importante. Sa très faible teneur en protéines (0.25 g/l) explique que la quantité déposée sur DEAE cellulose soit inférieure à celle des autres pools. Nous avons cependant rencontré moins de problèmes qu'avec le pool 2. La seule modification apportée au plan de travail est purement technique: le volume des fractions n'étant que de 1 ml, nous avons été conduits à constituer les pools avant le traitement afin de disposer de volumes plus importants.

3.2.4.1. Teneur en protéines (DO à 280 nm) des fractions et tests de déstabilisation.

Sur la figure 68 sont reportés le tracé de DO des fractions ainsi que les signaux d'agglutination des MS-Eth.

Le premier pic correspond à la sortie des fractions non retenues. Il représente en poids de protéines 32.5% du total déposé, pourcentage très supérieur à ceux précédemment constatés pour les autres pools. Les fractions sont éluées de la colonne en formant un pic unique, caractérisé dans sa partie descendante par un fléchissement de DO, comme si ce pic masquait la présence d'un autre pic.

Les tests de déstabilisation des MS-Eth sont réalisés par addition de 5% de PEG pour les fractions non retenues et 3% de PEG pour les fractions éluées.

La figure 68 met en évidence les signaux obtenus. Elle montre que:

- Les fractions non retenues ne provoquent aucune agglutination des MS-Eth, ce que nous avons constaté également pour les fractions non retenues du pool 2.
- Un pic de déstabilisation est observé pour les fractions éluées, tout à fait superposé au pic de DO. Les signaux chutent rapidement et de façon marquée dans la zone où l'existence d'un second pic de DO est suspectée.

3.2.4.2. Constitution d'un sous-pool et traitement.

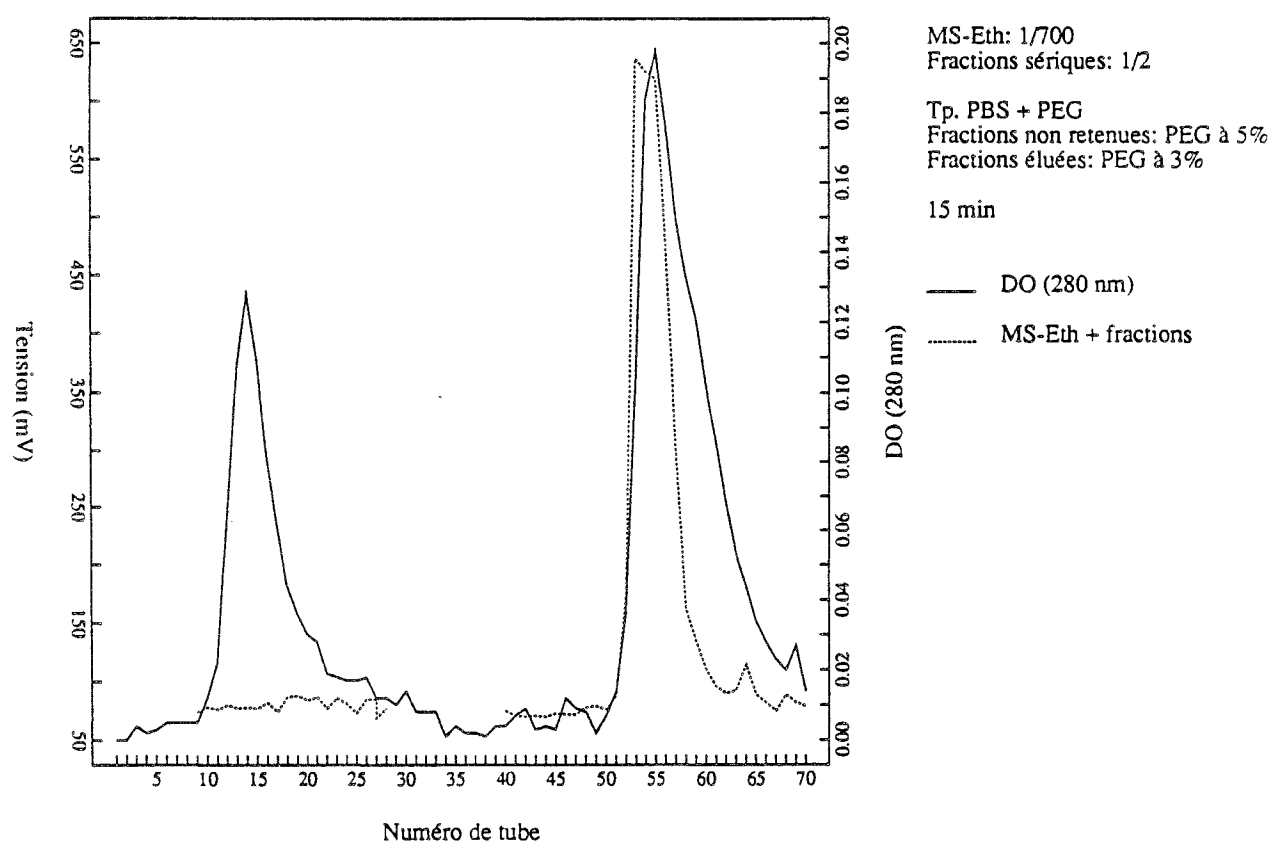
La fraction créant le signal maximal de déstabilisation ne peut être traitée en raison de son faible volume. Nous avons donc constitué le sous-pool, nommé 1B, sur lequel l'essai de traitement a été effectué. Il contient 0.68 mg de protéines et se caractérise comme suit:

Caractéristiques des pools issus de la DEAE cellulose.

Pool	Fractions	Volume total (ml)	Concentration (g/l)
1B	53 à 56	4	0.17

Le traitement de ce pool permet d'éliminer les signaux de déstabilisation: le signal de 600 mV du pool non traité en présence des MS-Eth est abaissé à 83 mV à la suite de son traitement.

Figure 68 Comportement des MS-Eth en présence des fractions sériques issues du pool 1 déposé sur colonne de DEAE cellulose



En conclusion une seule population de substances éluées à partir du pool 1 semble déstabiliser les MS-Eth; son traitement permet de retrouver des signaux plus faibles correspondant au blanc MS.

4. Conclusion.

Partant d'un sérum entier, agglutinant non spécifiquement les MS-Ag et les MS-Ac, et dont le traitement élimine cet effet déstabilisant, nous n'avons sélectionné que certains groupes de constituants possédant les mêmes propriétés que le sérum entier: d'une part leur pouvoir déstabilisant, d'autre part leur traitement qui a pour conséquence de faire disparaître cet effet. Ces pools formés constituent le matériel de base des analyses comparatives à mener en parallèle sur les surnageants traités et les surnageants non traités.

Les résultats des études du potentiel agglutinant des fractions issues des pools suggèrent que la déstabilisation est liée à la présence de plusieurs substances précises, ne possédant pas nécessairement de fortes concentrations. Nous allons tenter dans le chapitre suivant de déterminer quels sont ces constituants.

CHAPITRE II: Etudes analytiques qualitatives et quantitatives des pools.

INTRODUCTION.

Ce chapitre sera consacré à l'analyse de la composition des pools issus de la filtration sur gel et de la chromatographie sur DEAE cellulose. En vue de faire apparaître les modifications apportées par le traitement par les MS-Eth, nous étudierons systématiquement en parallèle les pools traités et non traités. Dans une première approche, nous identifierons les protéines présentes dans les échantillons et nous rechercherons d'éventuelles différences qualitatives dans la composition des pools traités et non traités; afin de s'assurer que ces résultats ne sont pas limités aux pools, nous vérifierons que les différences observées sont retrouvées lorsque l'on compare le sérum entier traité et non traité.

Les méthodes utilisées, relevant pour la plupart de l'immunochimie, seront décrites dans une première partie, à la suite de laquelle nous rapporterons les résultats qualitatifs enregistrés pour chaque pool et pour le sérum entier.

Les constituants dont les concentrations semblent abaissées par le traitement seront dosés en néphélométrie classique sur les pools concernés traités et non traités, sur le sérum entier et sur 35 sérums choisis au hasard parmi ceux disponibles au Laboratoire. L'ensemble de ces dosages sera décrit dans une deuxième partie.

Trois des protéines affectées par le traitement ont été étudiées plus en détail; pour l'une d'entre elles le mécanisme de l'interaction avec les MS-Eth a été établi; pour les deux autres protéines nous avons pu constater un lien direct entre leur pouvoir déstabilisant et leur concentration. Nous présenterons les résultats obtenus dans une troisième partie.

1. Composition des pools et du sérum entier.

Les techniques suivantes ont été utilisées:

- Electrophorèse et isoélectrofocalisation: ce sont des méthodes simples et rapides de comparaison des pools traités et non traités; la disparition d'une bande dans le pool traité indique qu'une protéine a été éliminée ou modifiée par le traitement. Ces techniques fournissent en outre des informations sur la masse moléculaire et le pHi de ce constituant.
- Immunodiffusion et immunoélectrophorèse: elles permettent d'identifier, par l'utilisation d'As spécifiques, les protéines présentes dans les pools. En outre, les modifications de l'emplacement et de l'épaisseur des arcs induites par le traitement fournissent des informations semi-quantitatives sur une éventuelle diminution de la concentration protéique.
- L'immunotransfert, associe, comme l'immunoélectrophorèse, la séparation électrophorétique et la détection immunologique, mais constitue une méthode d'analyse plus fine et plus sensible. Elle permettra de vérifier les résultats obtenus avec les autres méthodes.

De la combinaison de ces diverses techniques résulte une analyse précise et fiable de la composition des pools traités et non traités.

1.1. Protocoles techniques.

1.1.1. Méthodes électrophorétiques.

1.1.1.1. Electrophorèse en milieu dissociant (PAGE-SDS).

Nous avons adopté la méthode en tampons discontinus de Laemmli et Favre (82) en milieu dissociant. Les masses moléculaires des protéines à analyser varient selon les pools et notamment selon leur ordre d'élution lors du premier fractionnement par filtration sur gel. Le pool 1 renferme les protéines les plus grosses, le pool 4 est constitué des protéines de plus faible MM.

Le degré de réticulation des gels de séparation est adapté à chaque pool en modulant les proportions d'agent réticulant (bisacrylamide) et d'agent gélifiant (acrylamide). Le pool 3 est étudié sur un gel dont T est de 5% et C de 3%. Pour le pool 4, T s'élève à 7.5%, C étant maintenu à 3%. Le gel de séparation est préparé en tampon Tris-HCl 0.38M pH 8.8 additionné de SDS à 0.1%. Un gel de concentration faiblement réticulé (T = 2.5%; C = 3% en tampon Tris-HCl 0.125M pH 6.8 et SDS 0.1%) est coulé au-dessus du gel de séparation.

1.1.1.1.1. Echantillons.

Une quantité importante (90 µg) des surnageants traités et non traités est déposée sur les gels, dans le but de détecter le maximum de bandes. Les échantillons sont préalablement additionnés de 1.5% de SDS et de 5% de saccharose (solution stock concentrée contenant du bleu de bromophénol afin de visualiser le dépôt).

Les MM des protéines séparées sont estimées en se référant à la migration de marqueurs de MM connues: alpha-lactalbumine (14000 Da), inhibiteur de la trypsine (20100 Da), anhydrase carbonique (30000 Da), ovalbumine (43000 Da), catalase (60000 Da), albumine (67000 Da), lactate deshydrogénase (140000 Da), ferritine (220000 Da) et thyroglobuline (669000 Da).

Ces marqueurs sont traités par 2.5% de SDS et 5% de β mercaptoéthanol puis chauffés 10 min dans un bain-marie bouillant; 10 µl de la préparation sont déposés.

1.1.1.1.2. Migration électrophorétique.

Elle se fait en cuve verticale. Le tampon d'électrode est constitué par du Tris-HCl 0.05M glycine 0.38M SDS 0.1% pH 8.3. La migration est conduite à une température de 8°C sous un courant de 60 mV et un voltage constant de 500 V, pendant environ 3 h 30 min.

Détection des protéines: fixation - coloration - décoloration:

La migration est arrêtée lorsque le bleu de bromophénol a atteint l'extrémité inférieure de la plaque. Les protéines sont fixées dans une solution alcool isopropylique / acide acétique / eau (2.5 / 1 / 6.5; V / V) pendant une nuit. Le gel est ensuite placé pendant 4 h dans la solution colorant les protéines (bleu de Coomassie à 1 g par l de mélange eau / méthanol (1 / 1; V / V) contenant 2% de TCA (P / V). Il est décoloré dans plusieurs bains d'un mélange méthanol / acide acétique / eau (3 / 0.75 / 6.25; V / V).

Une fois décolorés, les gels sont séchés pendant une heure sur un sécheur, puis conservés.

1.1.1.2. Isoélectrofocalisation.

Nous avons utilisé un gel commercial prêt à l'emploi où les ampholines déterminent un gradient de pH de 5.5 à 8.5. Les solutions d'électrodes sont les suivantes:

- Anode: acide D.L. aspartique 0.04M.
- Cathode: NaOH 0.1M.

Les électrodes sont situées dans le couvercle de l'appareil et entrent en contact avec le gel par l'intermédiaire de bandes de papier épais imprégnées de ces solutions.

1.1.1.2.1. Echantillons.

On imbibe un petit papier filtre d'un volume de 15 µl d'échantillon renfermant 70 µg de protéines et on le dépose à la surface du gel où l'échantillon pénètre par diffusion. On fait migrer en parallèle 5 µl d'un marqueur de pHi contenant un mélange de protéines dont les pHi varient de 5.65 à 8.30.

1.1.1.2.2. Migration électrophorétique.

La focalisation s'effectue à haut voltage constant (1600 V) pour un courant de 50 mA, et pendant 2 h 30 min. L'enceinte est réfrigérée à 8°C.

Détection des protéines: fixation - coloration - décoloration.

Les protéines sont fixées pendant 1 h dans une solution aqueuse contenant 11.5% de TCA (P / V) et 3.5% d'acide sulfo-salicylique (P / V). Puis elles sont colorées pendant une heure dans une solution de bleu de Coomassie à 1.15 g dans 1 litre dans un mélange alcool éthylique / acide acétique / eau (2.5 / 0.8 / 6.70; V / V). Ce mélange est ensuite utilisé comme solution décolorante. Lorsque le gel est complètement décoloré, il est placé 1 h dans un bain de conservation (glycérol à 10% (P / V) dans la solution décolorante). Une membrane de cellophane appliquée à la surface du gel facilite sa conservation.

1.1.2. Méthodes immunologiques.

1.1.2.1. Immunodiffusion double - immunoélectrophorèse.

Pour ces deux techniques, un gel d'agarose à 1% (P / V) est préparé dans un tampon (véronal sodé à 20.6 g/l ajusté à pH 8.2 à l'aide d'HCl 0.1N) placé dans un bain-marie bouillant. Le gel d'agarose se conserve à 4°C en tubes bouchés. Sa solution liquéfiée au bain-marie est versée sur des lames porte-objets de microscope préalablement placées dans un cadre porte-lames. Un emporte-pièce permet de découper dans la couche d'agarose un réservoir longitudinal pour l'antisérum, ainsi que deux puits où seront déposés les échantillons du pool traité et non traité. Certains pools ont été étudiés sur des gels prêts à l'emploi, où l'agarose a été préalablement coulée sur un film de plastique.

En immunodiffusion, des puits disposés en cercle autour d'un puits central sont confectionnés. Soit l'échantillon est déposé dans le puits central et testé vis-à-vis de différents antisérums placés dans les puits périphériques, soit un unique antisérum déposé dans le puits central est mis en réaction avec plusieurs pools disposés en périphérie. Le volume des dépôts de pools et d'antisérums est de 8 µl.

En immunoélectrophorèse, le cadre est placé entre les bacs à électrodes et des éponges imbibées de tampon assurent la jonction entre l'agarose des lames et le tampon des bacs. Une

différence de potentiel de 75 V est créée aux bornes du gel pendant 1 h 30 min. Après la migration électrophorétique, la gouttière centrale est évidée puis remplie d'antisérum.

Les plaques d'immunodiffusion et d'immunoélectrophorèse sont laissées en chambre humide pendant 24 h à 48 h, où l'on suit l'évolution des arcs de précipitation. Les protéines non précipitées sont éliminées par des bains en NaCl à 9 g/l pendant 24 h. Après élimination des sels minéraux par plusieurs lavages d'1 à 2 h dans de l'eau distillée, les lames sont recouvertes de papier filtre humide et séchées à plat jusqu'à ce que la feuille de papier se détache d'elle même.

Détection des protéines: coloration - décoloration.

Les plaques sont réhumidifiées par passage sous l'eau du robinet avant de les immerger pendant 15 min dans la solution colorante de bleu de Coomassie à 0.5 g pour 1 l de mélange alcool éthylique / acide acétique (9 / 1; V / V).

Les lames sont décolorées dans la solution alcool éthylique / acide acétique / eau (9 / 2 / 9; V / V) puis séchées sur un papier filtre. Les arcs de précipitation apparaissent colorés en bleu.

1.1.2.2. Immunotransfert.

Le sérum entier, traité et non traité, et les seuls pools où les méthodes précédentes semblaient montrer des différences entre l'échantillon traité et non traité ont été analysés par cette technique longue à mettre en oeuvre.

Les différentes étapes de la technique employée (154) sont schématisées comme suit:

- Séparation électrophorétique en gel d'acrylamide en milieu dissociant des protéines des pools traités et non traités.
- Rinçages des gels dans le tampon de transfert afin d'éliminer le détergent. La matrice de transfert, préalablement découpée aux dimensions du gel, est également équilibrée dans ce tampon.
- Electrotransfert.
- Saturation des sites libres de la matrice.
- Révélation par addition d'As spécifiques.
- Rinçages, saturation.
- Révélation immunoenzymatique et identification des protéines.

La séparation électrophorétique des protéines constitutives des pools suit le protocole détaillé précédemment. Nous décrirons rapidement les étapes de l'électrotransfert et de l'immunodétection.

1.1.2.2.1. Electrotransfert.

La matrice de transfert adoptée est une membrane de nitrocellulose dont la taille des pores est de 0.2 μ m. Cette membrane a la capacité d'adsorber fortement les protéines par des interactions dont la nature, encore incomplètement élucidée, semble être de type hydrophobe.

La composition du tampon de transfert dépend du type de gel utilisé en électrophorèse; en PAGE-SDS, le tampon utilisé a la composition suivante:

- Tris-HCl 0.025M pH 8.3.
- Glycine 0.192M.
- Méthanol 20% (V / V).

Le méthanol favorise la fixation des protéines sur la matrice en augmentant les interactions hydrophobes. Cependant, il diminue l'efficacité de l'élution et la durée du transfert doit être allongée pour que les protéines de MM importante soient transférées efficacement. Il aurait aussi pour avantage de tendre à stabiliser la géométrie du gel pendant le transfert, l'empêchant de gonfler dans le tampon de faible force ionique utilisé (51).

La matrice préalablement équilibrée dans le tampon est appliquée délicatement contre le gel en prenant la précaution d'éliminer les éventuelles bulles d'air. Des encoches sont découpées à l'une des extrémités de la membrane afin de délimiter les différentes pistes. En effet, après transfert la membrane sera découpée en bandes, la révélation immunologique s'effectuera sur les bandes isolées, chacune étant traitée par un As déterminé. L'ensemble est placé entre deux pièces d'éponge imbibées de tampon, puis le tout est disposé dans le châssis porte-électrodes. Les protéines séparées sur PAGE-SDS se comportant comme des anions, la membrane de transfert est placée du côté de l'anode.

Le transfert est conduit à 8°C pendant 4 h 30 min sous une différence de potentiel de 100 V et une intensité de 0.5 A.

La qualité du transfert est appréciée de deux façons:

- Après transfert, le gel est fixé, coloré puis décoloré. L'absence de bandes signifie que le transfert a été total.
- Les marqueurs de MM transférés sur la membrane sont révélés par une coloration au rouge Ponceau. Le bain de coloration est préparé à partir de la solution stock suivante, diluée 5 fois au moment de l'emploi:
 - . Rouge Ponceau: 0.2 g.
 - . TCA: 3 g.
 - . Acide sulfo-salicylique: 3 g.
 - . Eau distillée: q.s.p. 100 ml.

Cette coloration est fugace car elle disparaît à la lumière. Elle permet néanmoins d'apprécier la qualité du transfert, en vérifiant que tous les marqueurs ont bien été transférés. Nous en présenterons des exemples dans le chapitre consacré à l'exposé des résultats. La disposition de ces marqueurs permet en outre d'évaluer les MM apparentes des protéines transférées.

1.1.2.2.2. Immunodétection.

- Saturation des sites de la membrane.

Après transfert, la matrice de nitrocellulose est traitée de telle sorte que les sites libres capables d'interagir avec des protéines soient bloqués. On évite ainsi le risque de capter non spécifiquement les protéines, et notamment les Ig de l'As, et de provoquer un bruit de fond indésirable. On choisit pour cette saturation une substance, ici la sérum albumine bovine (BSA), qui ne soit pas susceptible d'interférer avec l'As. La membrane est donc incubée 45 min à 37°C en présence de BSA à 3% en tampon PBS.

- Sensibilisation par les antisérums.

La solution saturante est éliminée puis la membrane est découpée en bandelettes correspondant aux pistes de migration; celles ci sont placées dans des tubes à essai. Un pool déterminé comporte toujours 2 bandes, correspondant l'une au pool traité et l'autre au même pool non traité.

Les As de lapin (Behring) utilisés sont tous introduits dans les tubes au 1/200 final en tampon PBS sous un volume de 18 ml. Les tubes sont incubés 2 h à T.A. sans agitation.

Après élimination des Ac non fixés, les bandelettes sont lavées par 3 bains de 15 min chacun dans le tampon PBS afin qu'aucun Ac ne reste dans les tubes, ce qui contribue à éliminer le bruit de fond.

- Saturation des sites de la membrane.

Cette deuxième saturation a pour but de bloquer soit des sites qui l'ont déjà été lors de la première saturation mais qui auraient été libérés à la suite des traitements de la membrane (lavages), soit de nouveaux sites créés après l'addition des Ac et les lavages répétés qui s'ensuivent. Elle se déroule dans les mêmes conditions que la première saturation.

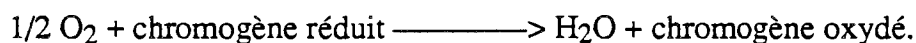
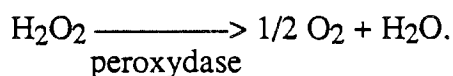
- Identification des complexes Ag/Ac.

- . Marquage des immunoglobulines.

La détection des Ac de lapin fixés aux protéines est assurée par l'addition d'une solution d'As de chèvre anti-Ig (H+L) de lapin conjugué à la peroxydase, dilué au 1/1000 en tampon PBS. Une solution unique de 250 ml est préparée, dans laquelle sont incubées toutes les bandelettes de nitrocellulose pendant 45 min à 37°C et sans agitation.

- . Révélation de l'activité enzymatique.

La solution d'Ac de chèvre est retirée, la membrane est rincée par 3 bains renouvelés de PBS de 15 min chacun, afin d'éliminer les Ac n'ayant pas réagi. La détection des complexes repose sur la révélation de l'activité de la peroxydase qui catalyse la réduction du peroxyde d'oxygène (H₂O₂) (substrat de l'enzyme) avec oxydation du chromogène (4-chloro-1-naphtol) incolore pour former un produit coloré en bleu-violet. La réaction est la suivante:



1.2. Analyses qualitatives des pools et du sérum entier.

Les résultats obtenus ne peuvent être regroupés par technique car la composition des pools diffère et donc une méthode peut être adaptée pour un pool et moins pour un autre. Nous exposerons donc, comme dans le chapitre précédent, l'ensemble des résultats pour chaque pool. Nous commencerons ici par le pool 1 pour terminer par les pools 3 et 4 dont les résultats ont été confirmés sur le sérum entier. L'étude de ce dernier sera détaillée après celle du pool 4.

Technique rapide d'identification, l'immunodiffusion a été utilisée pour l'analyse de tous les pools avant et après traitement. Systématiquement les As de lapin (Behring) dirigés contre les protéines humaines suivantes, qui sont les plus concentrées dans le sérum, ont été testés:

- Protéines inflammatoires: α_2 -macroglobuline (α_2 -macro), fibronectine, protéine C réactive, α_1 -antitrypsine (α_1 -antitry), haptoglobine (hapto), orosomucoïde.
- Protéines du système immunitaire: IgM, IgA, IgG.
- Protéines de transport: albumine, préalbumine, transferrine, α_2 -céruloplasmine (α_2 -cérulo), apolipoprotéine A1 (apo A1), apolipoprotéine B (apo B), hémopexine.
- Protéines de la coagulation: antithrombine III (anti III), plasminogène, fibrinogène.

- Composants du complément: C1q, C2, C4, C3c, C3 proactivateur (C3 PA), C1 inactivateur (C1 ina), C9.

Seules les protéines décelées dans les pools par cette technique seront nommées; par ailleurs l'absence d'une protéine déterminée ne signifie pas nécessairement que cette protéine n'est pas contenue dans l'échantillon; en effet, la méthode étant peu sensible, de faibles concentrations ne sont pas détectées.

1.2.1. Pools 1 et 1B.

L'analyse de ces pools doit prendre en compte leurs différences de concentration protéique, 0.25 g/l pour le pool 1 et 0.17 g/l pour le pool 1B. Par ailleurs ces pools conservés à -20°C sont troubles après décongélation. Ils renferment les constituants sériques de MM élevées, précipitant à froid.

Les pools traités et non traités ont été concentrés par ultrafiltration sur membrane de seuil de coupure 20000 Da. Une concentration de 0.69 g/l a été atteinte et nous avons tenté des électrophorèses en présence de SDS sur des gels réticulés à 5% de T, ainsi que des immunodiffusions.

Les électrophorèses des deux pools traités et non traités (dont 65 µg ont pu être déposés) ont révélé la présence de bandes de très faible intensité ayant des MM de 140000 Da, 135000 Da, 130000 Da et 67000 Da. Cette technique n'a pas permis de montrer de différence entre pools traités et non traités.

Les immunodiffusions ne détectent qu'un nombre restreint de protéines: IgM, IgA et des traces d'albumine. Cette dernière, très abondante dans le sérum, s'adsorbe vraisemblablement sur les constituants de MM élevées durant leur passage sur la colonne de filtration sur gel. Ces trois protéines sont retrouvées dans les deux pools traités et non traités.

Les MM des bandes observées en électrophorèse sont compatibles avec la nature des protéines décelées, mais les IgM n'ont manifestement pas migré.

En conclusion, ces deux techniques ne nous ont pas permis de révéler de différences entre les contenus protéiques des pools traités et non traités, en raison probablement de leurs faibles concentrations et surtout de leur apparence trouble. Nous n'avons donc pas poursuivi davantage les analyses sur ces pools.

1.2.2. Pools 2, 2B et 2C.

Les problèmes rencontrés avec ces pools sont du même ordre que ceux décrits ci-dessus pour les pools 1 et 1B; le trouble du pool 2 après la décongélation est important. Les échantillons 2B et 2C traités et non traités sont concentrés par ultrafiltration sur membrane de seuil de coupure 20000 Da. Les concentrations obtenues s'élèvent à 0.63 g/l de protéines pour le pool 2B et 0.60 g/l pour le pool 2C.

Les électrophorèses en gels réticulés à 5% d'acrylamide n'ont révélé aucune bande sur l'ensemble des pools traités et non traités. Il semble que les protéines n'aient pas migré, des colorations étant visibles à l'emplacement des dépôts.

Les immunodiffusions révèlent la présence des protéines suivantes, sans toutefois montrer de distinction entre les échantillons traités et non traités:

Composition protéique des pools 2 non traités et traités.

pool 2	pool 2B	MM (kDa)
α_2 -macro	α_2 -macro	725
IgM	IgM	971
IgA	IgA (f)	160
apo B		270
haptoglobine		400

(f): faible intensité de l'arc de précipitation.

Le pool 2, sortant en début de filtration sur gel, renferme les constituants de plus forte MM. La fibronectine, de MM 440000 Da n'est cependant pas décelée, probablement en raison de sa concentration sérique relativement faible (0.33 g/l) par rapport aux autres substances détectées; de plus, dans le sérum, des formes monomériques, donc plus légères, de MM 235000 Da et 220000 Da peuvent exister (113), ce qui pourrait expliquer leur absence dans ce pool.

L'haptoglobine sérique humaine est caractérisée par son polymorphisme génétique (157); elle existe sous forme de 2 chaînes légères α et 2 chaînes lourdes β , définissant trois phénotypes différant par la structure de la chaîne α : Hp 1-1 de MM 86000 Da, Hp 2-1 de MM 200000 Da et Hp 2-2 de MM 400000 Da.

L'apolipoprotéine B et l'haptoglobine ne sont pas retrouvées dans les pools 2B et 2C; dans ce dernier, aucune protéine n'a été détectée en raison de la sensibilité relativement faible de la méthode.

En conclusion, de même qu'avec le pool 1, l'identité des résultats obtenus sur les pools 2 traités et non traités nous a dissuadé d'en poursuivre l'étude.

1.2.3. Pools 3, 3A, 3B et 3C.

1.2.3.1. Résultats des électrophorèses.

Les pools 3A et 3B, de très faibles teneurs en protéines, sont concentrés après traitement par ultrafiltration sur membrane de seuil de coupure 10000 Da. Les concentrations obtenues sont de 0.45 g/l pour le pool 3A et de 0.32 g/l pour le pool 3B. Les quantités de protéines respectivement déposées sont de 45 μ g et de 30 μ g. Les pools 3 et 3C sont suffisamment concentrés pour que 90 μ g soient analysés.

Deux types de gels ont été testés (l'un réticulé à 5% de T, l'autre à 7.5% de T).

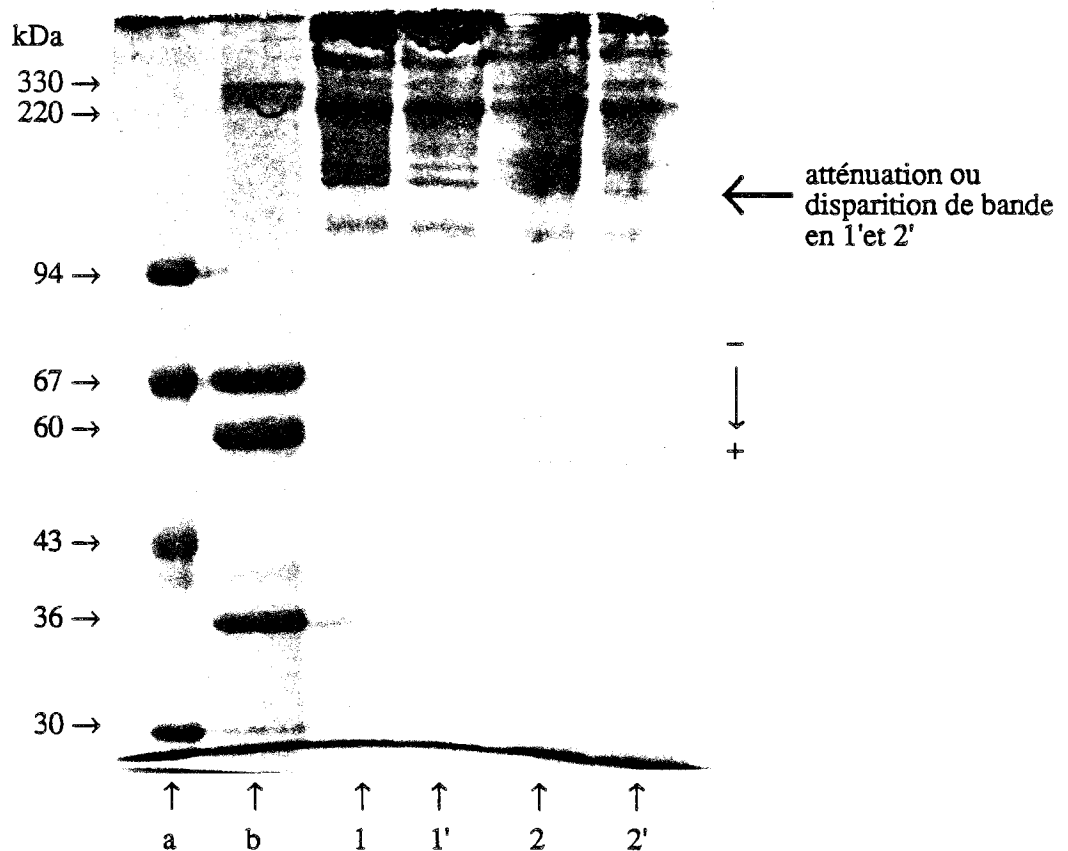
L'électrophorèse à 7.5% d'acrylamide permet de visualiser toutes les bandes présentées sur la figure 69. Leurs MM sont déterminées en référence à une courbe d'étalonnage établie à l'aide de protéines témoins de MM connue. Nous n'avons pas représenté les pools 3A et 3B pour lesquels une bande unique floue est observée vers des MM de 150000 Da.

Le pool 3 présente de nombreuses bandes dont les MM s'étendent de 40000 Da à plus de 330000 Da. Le pool 3C semble contenir les mêmes constituants de MM supérieure à 110000 Da que le pool 3, mais les substances de plus faible masse moléculaire n'y sont pas détectées.

Une différence entre les profils des pools traités et non traités est constatée dans une zone correspondant à une MM apparente de 135000 Da: en effet, les pools 3 et 3C traités montrent une atténuation de l'intensité des deux bandes présentes dans cette zone, ou la

Figure
69

Electrophorèse en gel de polyacrylamide (T = 7.5%) en tampon Tris-HCl 0.05M glycine 0.38M SDS 0.1% pH 8.3 des pools 3 et 3C non traités et traités



a: Protéines du kit de calibration de faibles MM
b: Protéines du kit de calibration de hautes MM

1: Pool 3C non traité: dépôt de 0.09 mg
1': Pool 3C traité: dépôt de 0.09 mg

2: Pool 3 non traité: dépôt de 0.09 mg
2': Pool 3 traité: dépôt de 0.09 mg

disparition d'une bande intermédiaire entre les deux, en comparaison avec les pools non traités. Ceci s'observe plus nettement encore sur l'électrophorèse présentée sur la figure 72.

Le traitement semble donc diminuer la concentration d'un des constituants de ces deux pools. Nous avons déjà relevé, dans le chapitre précédent (cf. Ch.I.2.2.5.1.), une chute de la concentration protéique du pool 3 traité. Ces deux constatations sont vraisemblablement liées; de plus, le constituant concerné est probablement en concentration assez élevée dans le pool non traité.

1.2.3.2. Résultats des immunodiffusions et immunoélectrophorèses.

En immunodiffusion, les protéines suivantes ont été décelées dans les pools non traités:

Composition protéique des pools 3, 3A, 3B et 3C non traités.

Pool 3	Pool 3A	Pool 3B	Pool 3C
α 2-macro fibronectine haptoglobine IgA IgG albumine apo A1 C1q C3c C4	IgG	IgA IgG (f)	α 2-macro haptoglobine IgA albumine (f)

(f): faible intensité de l'arc de précipitation.

Dans les pools 3A et 3B, peu de constituants sont en concentration suffisamment élevée pour être détectables dans nos conditions expérimentales; le pool 3A, correspondant aux fractions non retenues sur la colonne de DEAE cellulose ne contient que des IgG. Le pool 3B, où l'électrophorèse ne détecte qu'une seule bande large et floue, renferme en plus des IgA, dont l'élution en DEAE est rapide (41). Pour ces deux pools, aucune différence de coloration n'a pu être mise en évidence entre le traité et le non traité.

Le pool 3 contient de nombreux constituants dont certains ne sont retrouvés dans aucun des pools élués sur DEAE cellulose, en raison probablement de la trop faible concentration des échantillons.

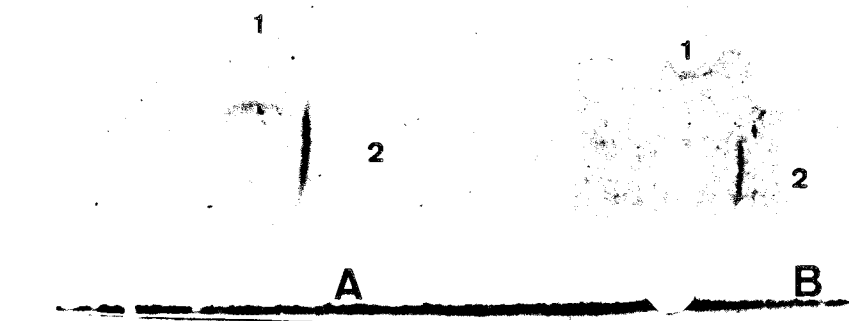
Le pool 3 traité se distingue du pool non traité pour la présence des protéines suivantes:

- La fibronectine est indétectable dans le pool traité alors que son arc est nettement visible dans le pool non traité (figure 70). Ce fait pourrait être lié avec l'atténuation d'une bande d'environ 135000 Da observée en électrophorèse. Il pourrait alors s'agir d'un fragment de fibronectine, dont on sait que des monomères de 146000 Da peuvent circuler dans le sérum (113).
- C1q disparaît dans le pool 3 traité (figure 71).
- L'arc de précipitation du C4 est très atténué dans le pool traité.
- De façon moins nette nous avons constaté que l'arc correspondant à l'haptoglobine est plus diffus dans le pool traité.

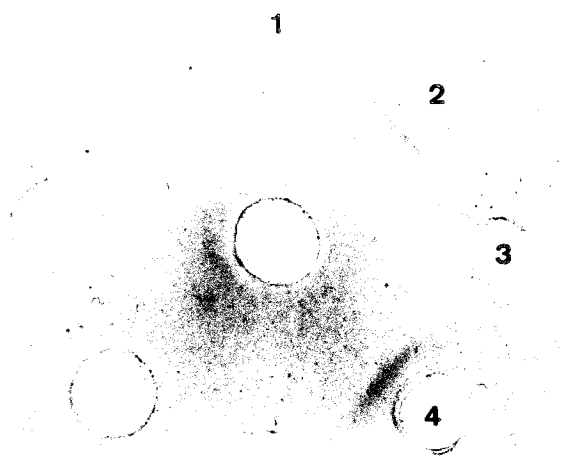
L'immunoélectrophorèse confirme les résultats précédents, bien que des traces de fibronectine restent détectables dans le pool traité.

En résumé, le pool 3 traité se différencie du pool non traité par:

Figures 70 et 71 **Immunodiffusions doubles en gel d'agarose des pools 3 non traité et traité**



A: Pool 3 non traité au centre
 B: Pool 3 traité au centre
 1: As anti-fibronectine
 2: As anti-apolipoprotéine A1



As anti-C1q au centre

1 et 3: Pool 3 traité
 2 et 4: Pool 3 non traité

- Une chute de 0.31 g/l de sa concentration protéique, soit une perte de 27% (cf. Ch.I.2.2.5.1.).
- L'atténuation d'une bande de MM apparente de 135000 Da en électrophorèse.
- Une diminution des concentrations de C4, d'haptoglobine et de fibronectine.
- Une disparition du Clq, traduisant certainement une chute importante de sa concentration après le traitement, le rendant indécélable par les techniques utilisées.

1.2.3.3. Résultats des immunotransferts.

Seul le pool 3, traité et non traité, a été étudié en immunotransfert. Les As utilisés sont dirigés contre la fibronectine et contre l'haptoglobine afin de valider plus clairement les résultats obtenus. C4 ne sera pas étudié ici, sa concentration, déjà basse dans le pool non traité, ne se modifiant que faiblement dans le pool traité si l'on en juge par le degré d'atténuation de l'arc d'immunoélectrophorèse.

Le pool 3 (traité et non traité) est donc soumis à une électrophorèse dans un gel réticulé à T = 7.5%. Après le transfert, nous nous sommes assurés que les protéines avaient bien migré sur la membrane: la coloration au rouge Ponceau d'une partie de la matrice de transfert contenant les pools 3 traité et non traité et les marqueurs de MM a montré des résultats positifs, les protéines ont donc été transférées. Nous ne pouvons pas, à ce niveau, établir de différences entre les pools traités et non traités car la coloration est diffuse.

La révélation immunoenzymatique de la matrice de nitrocellulose fournit les résultats suivants:

- Avec le sérum anti-fibronectine: une zone de coloration dans la région des fortes MM a été observée, les bandes ne sont pas nettement individualisées. Cependant, cette zone est moins intensément colorée dans le pool traité que dans le pool non traité. Il semble donc que la fibronectine soit présente dans les deux pools, mais en concentration plus faible dans le pool traité.
- Avec le sérum anti-haptoglobine: aucune différence n'est remarquée entre les pools traité et non traité. La concentration de l'haptoglobine ne serait pas modifiée par le traitement de ce pool.

1.2.3.4. Conclusions.

Le pool 3A contient essentiellement des IgG; le pool 3B renferme vraisemblablement d'autres constituants que nous n'avons pu mettre en évidence en raison de leur trop faible concentration. Le pool 3C se rapproche du 3. Il ne contient apparemment aucune des substances modifiées par le traitement, ces constituants sont retrouvés uniquement dans le pool 3.

L'ensemble des résultats discriminants entre échantillons traité et non traité a été obtenu sur le pool 3 non fractionné sur DEAE.

Les protéines (Clq, fibronectine) pour lesquelles une chute de concentration est suspectée à la suite du traitement seront dosées (cf. Ch.II.2.). Nous doserons également l'haptoglobine afin de confirmer que sa concentration est inchangée après le traitement.

Le tableau 2 récapitule l'ensemble des données acquises sur la composition des pools 3, ainsi que sur les pools 4, que nous allons maintenant étudier.

Tableau 2 Composition protéique des pools sériques non traités

Protéines détectées	PM kDa	Pool 3 ①①	Pool 3A	Pool 3B	Pool 3C ①	Pool 4	Pool 4A ①	Pool 4B ①	Pool 4C
α 2macroglobuline	725	★			★				
fibronectine	440	★②③⑤							
haptoglobine	400 200 86	★			★	★			★
IgA	180	★		★	★	★		★	★
IgG	150	★	★	★		★	★②③⑥	★	★
α 2céruloplasmine	150					★			★
C1q	400	★②③							
C4	206	★②				★			
C3c	180	★				★		★⑤	★
C2	110					★		★	★
C1inactivateur	104					★			
C3PA	94					★		★②④⑤	
C9	71					★			
plasminogène	90					★			★
transferrine	88					★		★	★
hémopexine	70					★		★	★
albumine	67	★			★	★			★
antithrombineIII	65					★			★
préalbumine	61					★			
α 1antitrypsine	53					★			★
orosomucoïde	44					★			★
Apo A1	28	★				★			★

Variations observées dans les pools traités par les MS-Eth:

- ①: Baisse de DO (280 nm)
- ②: Baisse d'intensité de l'arc d'immunodiffusion
- ③: Baisse d'intensité de l'arc d'immunoélectrophorèse
- ④: Baisse d'intensité ou disparition d'une bande en électrophorèse
- ⑤: Baisse d'intensité de bande en immunoblotting
- ⑥: Baisse d'intensité de bandes d'isoélectrofocalisation

★: Présence de la protéine

1.2.4. Pools 4, 4A, 4B et 4C.

1.2.4.1. Résultats des électrophorèses.

Les différents pools 4 ont été analysés sur des gels réticulés à 7.5% d'acrylamide.

Le pool 4B a été concentré par ultrafiltration jusqu'à une teneur de 0.7 g/l. 65 µg sont déposés. Pour les pools 4, 4A et 4C, les dépôts analysés sont de 90 µg.

1.2.4.1.1. Pools 4.

Les électrophorégrammes sont présentés sur la figure 72. L'analyse de chaque pool montre que:

- Le pool 4 renferme un nombre important de bandes dont les MM s'étendent de 25000 Da à 180000 Da; il contient les composants sériques de faible MM puisqu'il est élué en dernier en filtration sur gel. La bande la plus importante correspond à l'albumine. Aucune différence dans l'intensité des bandes n'est observée entre les pools traité et non traité.
- Le pool 4A traité, non présenté sur cette électrophorèse, est caractérisé par une zone floue de MM 110000 Da à 180000 Da, observée également dans le pool non traité.
- Le pool 4B non traité renferme un nombre restreint de bandes. L'une d'elles située à environ 180000 Da semble s'atténuer dans le pool traité. Une autre bande de MM estimée à 93000 Da disparaît complètement dans le pool traité.
- Le pool 4C traité et non traité comporte le même nombre de bandes que le pool 4, les composés de MM 180000 Da y apparaissent cependant nettement moins concentrés.

En électrophorèse, les conséquences du traitement ne se distinguent nettement que sur le seul pool 4B, où elles se manifestent par la disparition d'un constituant de MM proche de 93000 Da.

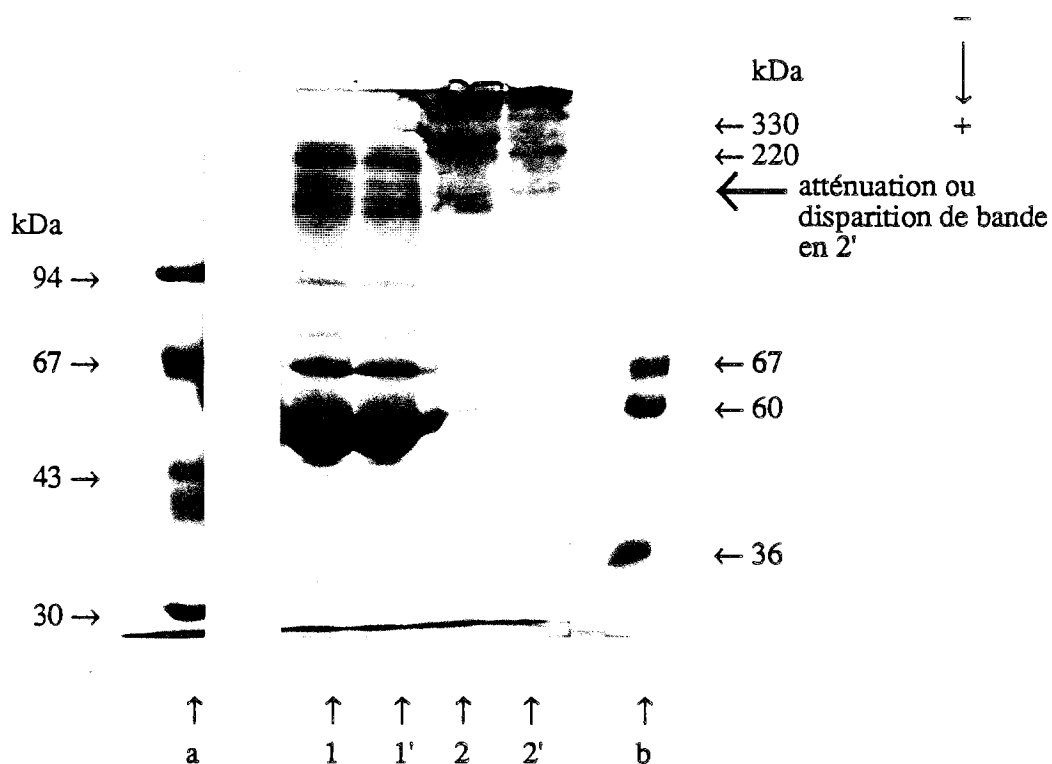
1.2.4.1.2. Comparaison avec les pools 3 et 3C.

Les électrophorégrammes de la figure 72 comportent également les profils des pools 3 et 3C dont le traitement affaiblissait l'intensité d'un constituant de MM estimée à 135000 Da. Cette MM étant relativement proche de celle d'environ 93000 Da observée uniquement dans le pool 4B non traité, nous avons comparé sur une même électrophorèse ces différents pools afin de vérifier que ces bandes correspondaient bien à deux protéines différentes, ce qui est effectivement confirmé par l'analyse des électrophorégrammes.

Nous constatons, par ailleurs, que les bandes floues du pool 3 non traité situées à des MM d'environ 135000 Da sont présentes dans les pools 4 et 4C, où elles ne sont pas modifiées par le traitement.

Figure
72

Electrophorèses en gel de polyacrylamide (T = 7.5%) en tampon Tris-HCl 0.05M glycine 0.38M SDS 0.1% pH 8.3 des pools 3 et 3C non traités et traités et des pools 4, 4B et 4C non traités et traités



a: Protéines du kit de calibration de faibles MM

b: Protéines du kit de calibration de hautes MM

1: Pool 4 non traité: dépôt de 0.09 mg

2: Pool 3 non traité: dépôt de 0.09 mg

3: Pool 4B non traité: dépôt de 0.065 mg

4: Pool 3C non traité: dépôt de 0.09 mg

5: Pool 4C non traité: dépôt de 0.09 mg

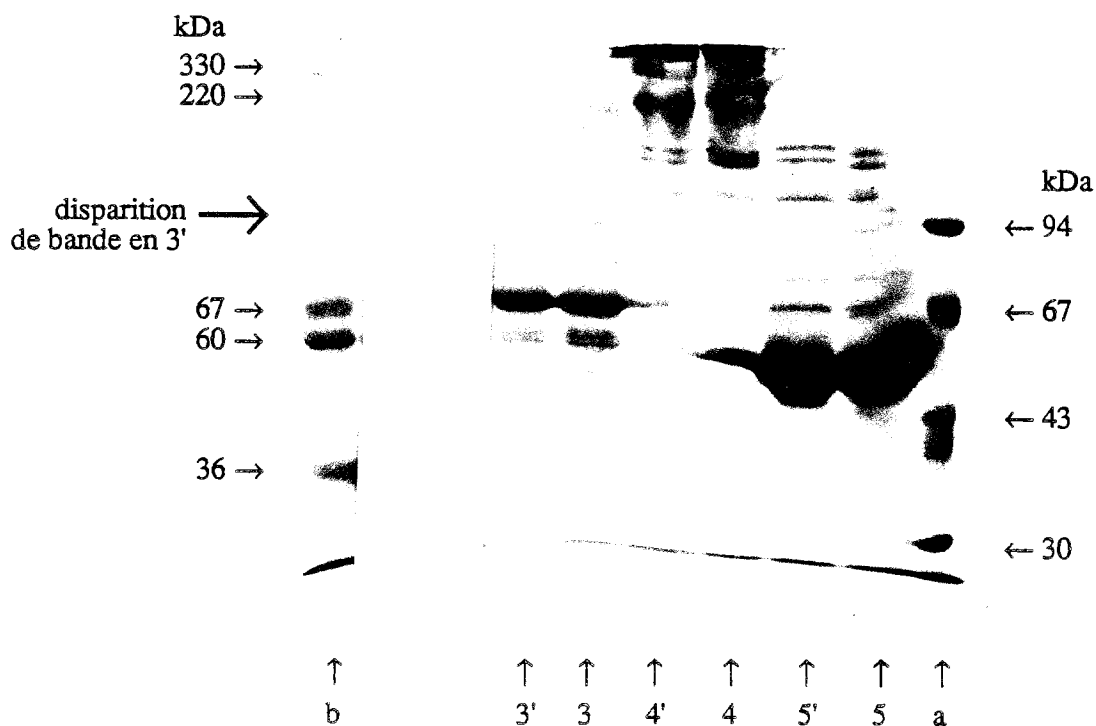
1': Pool 4 traité: dépôt de 0.09 mg

2': Pool 3 traité: dépôt de 0.09 mg

3': Pool 4B traité: dépôt de 0.065 mg

4': Pool 3C traité: dépôt de 0.09 mg

5': Pool 4C non traité: dépôt de 0.09 mg



1.2.4.2. Résultats des immunodiffusions, immunoélectrophorèses et isoélectrofocalisation.

1.2.4.2.1. Immunodiffusions.

L'ensemble des protéines révélées par immunodiffusion dans les pools non traités est recensé dans le tableau ci-dessous:

Composition protéique des pools 4, 4A, 4B et 4C non traités.

Pool 4	Pool 4A	Pool 4B	Pool 4C
haptoglobine α 1-antitryp orosomucoïde IgA IgG α 2-cérulo transferrine hémopexine albumine préalbumine apo A1 plasminogène anti III C1 ina C2 C3c C3 PA C4 C9	IgG	IgA IgG (f) transferrine hémopexine C2 C3 PA	haptoglobine α 1-antitryp orosomucoïde IgA IgG (f) α 2-cérulo transferrine hémopexine albumine apo A1 plasminogène anti III C2 C3c

Le pool 4A composé des fractions non retenues sur la colonne de DEAE cellulose ne contient que des IgG.

Le pool 4B, bien que de profil d'élution en DEAE cellulose très proche de celui du pool 4C, contient beaucoup moins de constituants détectables. Les IgA y sont logiquement retrouvées; les protéines de mobilité électrophorétique β (dont C2 et C3 PA et protéines du transport du fer: transferrine et hémopexine) sont éluées derrière les protéines gamma (41).

Les protéines α généralement éluées en fin de colonne (haptoglobine, apo A, orosomucoïde, α 2-céruloplasmine, α 1-antitrypsine, antithrombine III) sont retrouvées dans le pool 4C.

Les différences suivantes ont été observées au niveau des pools traités:

- Le pool 4A traité semble renfermer moins d'IgG, l'intensité de leur arc de précipitation est affaiblie.
- Le pool 4B traité montre nettement une chute de coloration de l'arc correspondant au C3 PA. Or l'électrophorèse avait montré la disparition d'au moins une substance de MM évaluée à 93000 Da, domaine où se situent C2, la transferrine et C3 PA dont la MM est précisément de 93000 Da.

Les pools 4 et 4C renferment tous deux un grand nombre de protéines dont principalement l'albumine; leur composition ne semble pas affectée par le traitement. Ces pools sont vraisemblablement trop concentrés en protéines pour que puisse être décelée de

façon qualitative une petite diminution de concentration de l'une d'entre elles. De plus, ils renferment un grand nombre de protéines, si bien que la diminution de concentration de l'une d'entre elles peut être difficile à déceler.

1.2.4.2.2. Immunoélectrophorèse et isoélectrofocalisation du pool 4A.

En immunoélectrophorèse, un As anti-protéines totales humaines (Behring) ne révèle dans le pool 4A non traité qu'un arc unique de précipitation correspondant aux IgG. Cet arc est nettement amoindri dans le pool traité (figure 73).

En isoélectrofocalisation, l'ensemble des différentes bandes fines correspondant aux IgG est présent dans les deux pools mais leur coloration est moins intense dans le pool traité.

Une nette diminution de DO avait été constatée sur ce pool (perte de protéines de 0.35 g/l, correspondant à 37% du contenu protéique du pool non traité). Ce pool ne contenant que des IgG, nous en déduisons que les MS de traitement en ont adsorbé une partie. Nous n'avons pu établir si la sous-classe des IgG et leur pHi influaient sur l'issue du traitement.

Les différentes techniques utilisées concordent pour montrer que le traitement entraîne une chute importante de la concentration des IgG dans le pool 4A; néanmoins un seul traitement ne suffit pas à éliminer la totalité des IgG. Nous avons donc répété les traitements sur ce pool et comparé à chaque fois les DO des surnageants traités et non traités; les conditions opératoires étaient les suivantes:

- Pool traité (T): 750 µl de pool + culot de MS-Eth (25 mg).
- Pool non traité (NT): 750 µl de pool.

Après centrifugation des deux milieux, les surnageants (S₁T et S₁NT) sont repris, leurs DO mesurées. S₁T est traité par un second culot de MS-Eth, le mélange est centrifugé ainsi que S₁NT; on obtient S₂T et S₂NT, que l'on traite une troisième fois. Les valeurs des DO mesurées sont les suivantes:

DO à 280 nm des surnageants des trois traitements successifs du pool 4A.

Surnageants	Trait. 1 (DO)	Trait. 2 (DO)	Trait. 3 (DO)
S T	0.63	0.60	0.54
S NT	0.96	0.95	0.95

Un seul traitement suffit pour écarter la majorité des IgG interférentes, les traitements ultérieurs sont peu efficaces et ne permettent pas d'éliminer la totalité des IgG. Une partie seulement des IgG du pool, possédant des propriétés physico-chimiques particulières, s'adsorberait sur les MS de traitement, les autres n'interagiraient pas avec les MS.

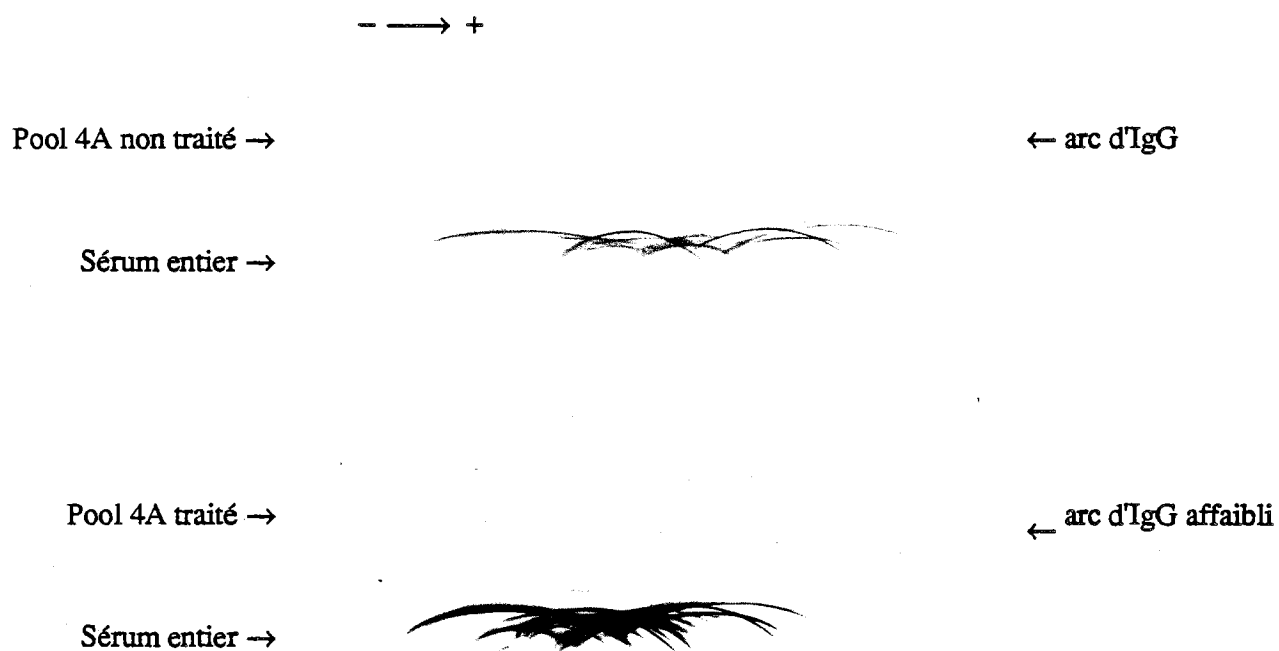
En conclusion, l'étude du pool 4A démontre que des IgG sont éliminées à la suite du traitement. Ce résultat n'est pas retrouvé sur le pool 3A dont les IgG sont probablement différentes. Nous vérifierons que ce résultat est reproductible sur le sérum entier.

1.2.4.3. Résultats des immunotransferts des pools 4 et 4B.

L'étude en électrophorèse et immunodiffusion du pool 4B traité fournit les résultats suivants:

- Une bande de MM proche de 93000 Da semble disparaître.
- L'intensité de l'arc correspondant au C3 PA chute.

Figure 73 Immunoélectrophorèses en gel d'agarose du sérum entier non traité et du pool 4A non traité et traité en tampon diéthylmalonylurée pH 8.2



Gouttières: As de lapin anti-protéines totales humaines

Nous avons cherché à identifier par immunotransfert la protéine correspondant à la bande située à 93000 Da. Il peut s'agir du C3 PA, mais on ne peut exclure de nombreuses autres protéines de MM voisines de 100000 Da détectées dans le pool 4 et qui n'auraient pas nécessairement réagi en immunodiffusion. Nous avons donc entrepris de tester le pool de façon systématique vis-à-vis de 11 As de spécificités différentes. Ces essais n'ont pu être effectués en totalité sur le pool 4B dont nous disposons de quantités insuffisantes.

Les travaux exploratoires tendant à sélectionner les As ont donc été effectués sur le pool 4, disponible en grandes quantités. Seul le pool non traité est analysé dans un premier temps en présence des 11 As, l'objectif ici n'étant pas d'établir de comparaison entre le traité et le non traité. Les As marquant une ou plusieurs bandes de MM proche de 93000 Da seront sélectionnés pour être employés dans un second temps vis-à-vis des pools 4B traité et non traité.

1.2.4.3.1. Essais préliminaires sur le pool 4 non traité.

Les conditions d'électrophorèse et de transfert ont été détaillées précédemment (cf. Ch.II.1.1.1.1. et Ch.II.1.1.2.2.). Après migration électrophorétique, la membrane est appliquée contre le gel; l'emplacement des puits est repéré sur la membrane par des encoches taillées à l'une des extrémités. Avant révélation, la membrane est découpée en autant de bandelettes que d'As à tester.

La coloration au rouge Ponceau du pool et des marqueurs de MM (les bandes sont portées sur la droite des profils en B de la figure 74) vérifie que le transfert a eu lieu dans des conditions satisfaisantes; les colorations étant fugaces, seules les bandes concentrées sont visibles sur le document.

Les antisérums de lapin utilisés sont dirigés contre les protéines suivantes: α_1 -antitrypsine (55000 Da), préalbumine (61000 Da), hémopexine (70000 Da), C9 (71000 Da), haptoglobine (86000 Da), transferrine (88000 Da), plasminogène (90000 Da), C3 PA (93000 Da), C1 inactivateur (104000 Da), C3c (140000 Da), IgG (150000 Da) et céruloplasmine (150000 Da).

Les résultats sont rapportés sur la figure 74. La bandelette révélée avec l'anti-IgG n'est pas représentée, car la coloration est uniforme sur toute la surface, comme si la matrice n'avait pas été saturée, se traduisant par un bruit de fond important.

Le marqueur de MM 94000 Da permet de localiser aisément la bande de MM environ 93000 Da. Les protéines pour lesquelles une bande proche de 93000 Da est observée appartiennent toutes au système du complément. Ce sont les composants C1 inactivateur, C3c, et surtout C3 PA dont la bande est particulièrement nette. Or en immunodiffusion, l'intensité de l'arc de cette protéine chute dans le pool 4B traité.

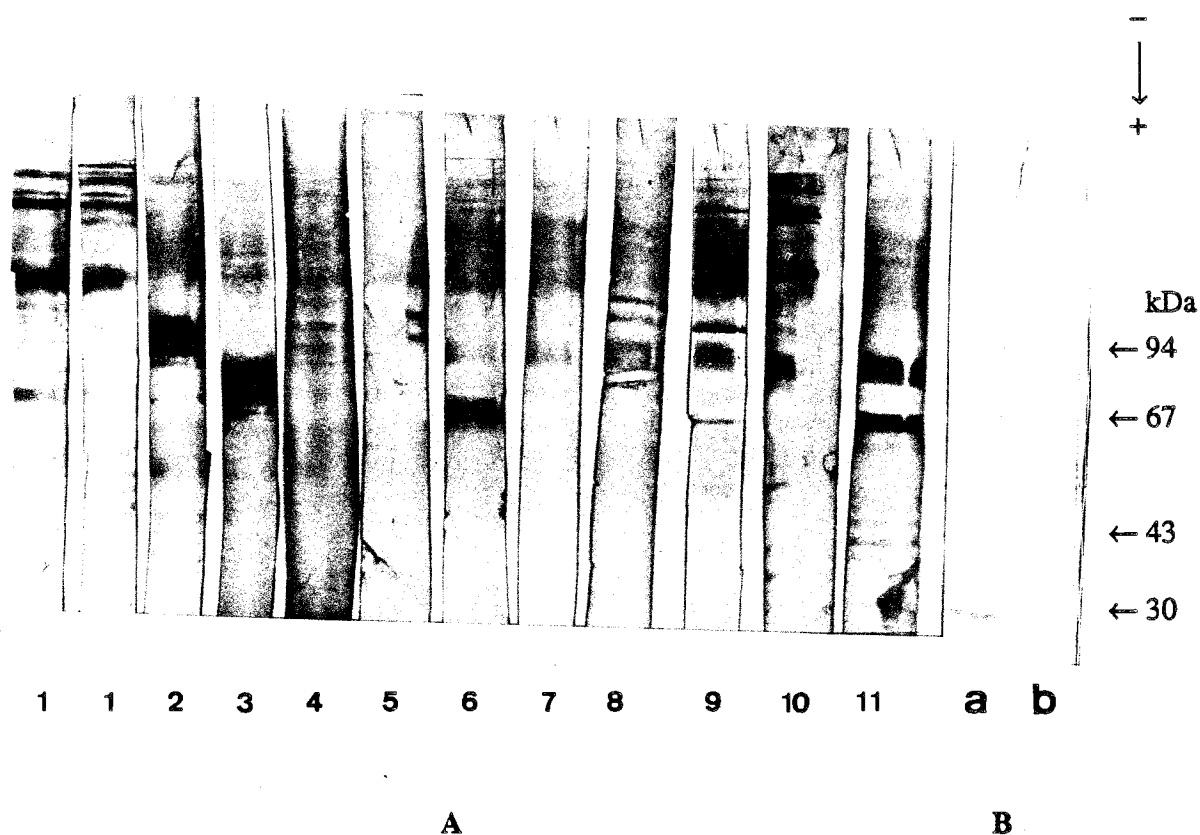
Plusieurs bandes sont néanmoins révélées par chacun des As, il s'agit des nombreux fragments issus de ces protéines qui continuent à réagir avec les As. Nous précisons dans le paragraphe suivant les caractéristiques de ces fragments.

En conclusion, parmi les 11 As utilisés, trois, dirigés contre des protéines de MM environ 93000 Da appartenant au système du complément, sont sélectionnés pour tester les pools 4B traité et non traité. Une seule de ces trois protéines, C3 PA, a été détectée en immunodiffusion dans le pool 4B.

1.2.4.3.2. Résultats du pool 4B.

Les As dirigés contre C1 inactivateur, C3c et C3 PA ont été utilisés sur les pools traité et non traité.

Figure 74 Electrotransfert du pool 4 non traité et détection immunologique à l'aide de différents As (dilution au 1/200)



Electrophorèse réalisée en gel de polyacrylamide (T = 7.5%) en tampon Tris-HCl 0.05M glycine 0.38M SDS 0.1% pH 8.3 - Dépôts de 0.09 mg

Electrotransfert sur matrice de nitrocellulose dont la taille des pores est de 200 nm en tampon Tris-HCl 0.025M glycine 0.192M pH 8.3 méthanol 20% - Révélation par des Ac anti-Ig (H + L) de lapin conjugués à la peroxydase (dilution au 1/1000)

A: Détection immunologique à l'aide de différents As:

- | | |
|---------------------------|-------------------------------------|
| 1: As anti-haptoglobine | 7: As anti- α 1 antitrypsine |
| 2: As anti-plasminogène | 8: As anti-C1 inactivateur |
| 3: As anti-transferrine | 9: As anti-C3PA |
| 4: As anti-préalbumine | 10: As anti-C3c |
| 5: As anti-céruloplasmine | 11: As anti-C9 |
| 6: As anti-hémopexine | |

B: Feuille de nitrocellulose colorée au rouge Ponceau après électrotransfert:

- a: Protéines du kit de calibration de faibles MM
b: Pool 4 non traité

La figure 75 illustre les résultats obtenus.

La partie de membrane colorée au rouge Ponceau comporte les pools 4B traité et non traité et les marqueurs de MM. Elle est représentée à la droite de la figure en B.

On constate que:

- C1 inactivateur est totalement absent des deux pools. Non détectée par ailleurs en immunodiffusion, cette protéine est absente des pools 4B traité et non traité.
- C3c et C3 PA sont présents dans les deux pools, mais des différences sont observées entre le pool traité et le pool non traité; les MM des bandes détectées sont portées dans le tableau ci-dessous:

MM des bandes détectées dans les pools non traité et traité.

Antisérums testés	MM bandes pool T (kDa)	MM bandes pool NT (kDa)
As anti C3c	130 (f)	130 125 62 (trace)
As anti C3 PA	94 (f)	94 77 (f) 62 (f) 57 (f)

(f): faible intensité de la bande.

Analyses des résultats:

- Protéines du complément: importance de C3.

Le système du complément est composé de 19 protéines plasmatiques et constitue, avec les Ac, un des éléments de défense contre les substances étrangères. Les protéines agissent selon deux voies reliées entre elles et formant deux cascades enzymatiques:

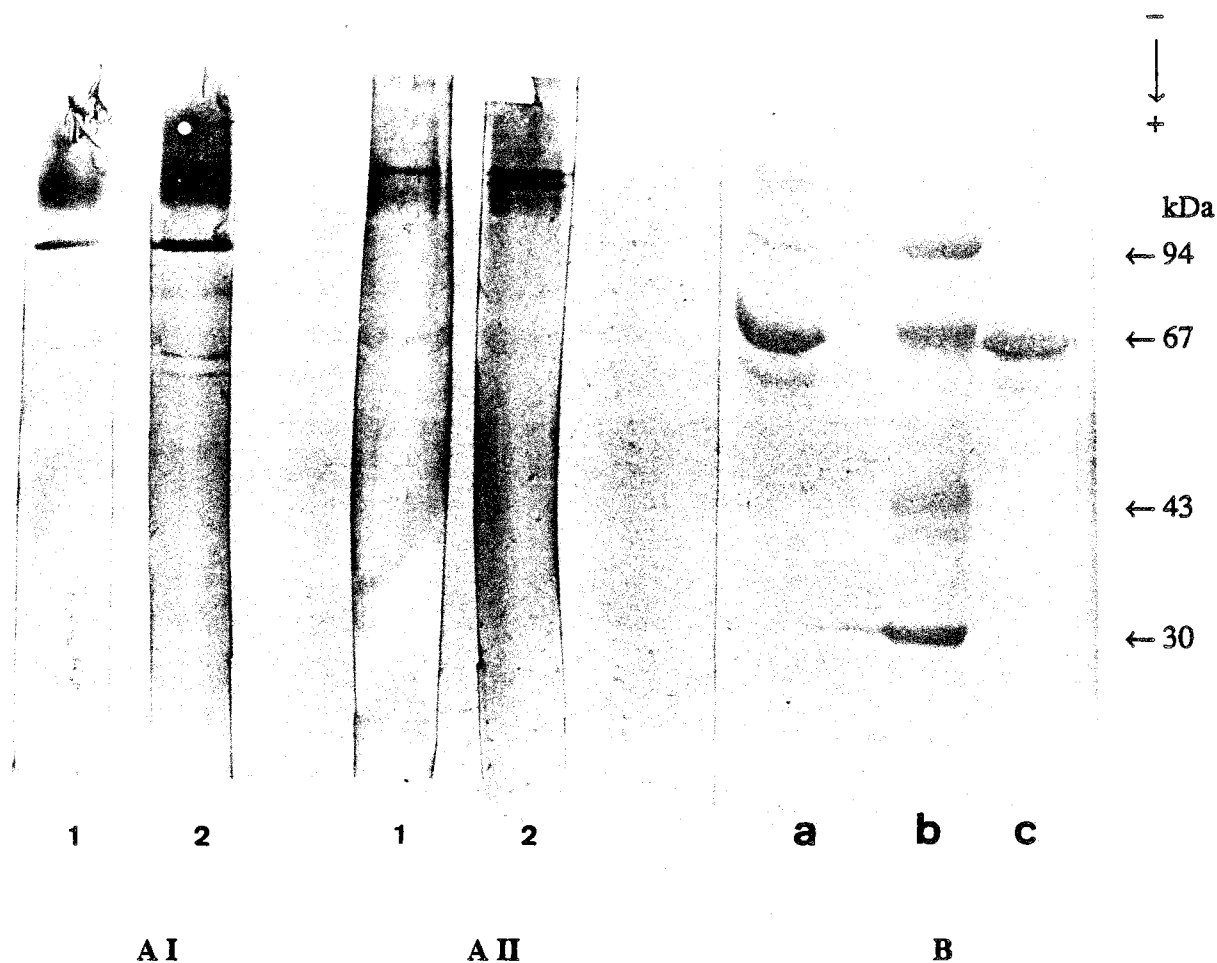
- . La voie classique fait intervenir les protéines C1 à C9. Elle est activée par les complexes Ag/Ac.
- . La voie alterne est activée en l'absence d'Ac par des surfaces polysaccharidiques ou anioniques.

Le point de convergence des deux voies conduit au clivage de C3, étape clé engendrant toute une cascade de réactions, aboutissant à des clivages de protéines. C3 (MM de 190000 Da) est le substrat des C3 convertases classique et alterne, il est fragmenté en C3a (anaphylatoxine) et C3b (181000 Da). L'activation de la voie alterne initie une boucle d'amplification mettant en jeu C3b et C3 PA (93000 Da, appelé facteur B) pour former la C3 convertase amplificatrice ou alterne. Le facteur D (24000 Da) clive alors le C3 PA engagé dans le complexe en facteur Bb ou C3 activateur (75000 Da) et libère un fragment Ba de 30000 Da. Le tout forme une nouvelle C3 convertase capable de cliver le C3.

Un système régulateur évite l'emballement de la boucle autocatalytique afin de ne pas détruire tout le C3 présent dans le sérum; C3b est dégradé par son enzyme inactivateur (C3bINA, MM 80000 Da) en C3bi, molécule inactive incapable de se lier à C3 PA. C3bi est clivé par des enzymes en C3c (140000 Da) et C3d (25000 Da).

**Figure
75**

Electrotransfert des pools 4B non traité et traité et détection immunologique à l'aide de différents As (dilution au 1/200)



Electrophorèse réalisée en gel de polyacrylamide (T = 7.5%) en tampon Tris-HCl 0.05M glycine 0.38M SDS 0.1% pH 8.3 - Dépôts de 0.065 mg

Electrotransfert sur matrice de nitrocellulose dont la taille des pores est de 200 nm en tampon Tris-HCl 0.025M glycine 0.192M pH 8.3 méthanol 20% - Révélation par des Ac anti-Ig (H + L) de lapin conjugués à la peroxydase (dilution au 1/1000)

A: Détection immunologique à l'aide de 2 As:

I: As anti-C3PA

1: Pool 4B traité

2: Pool 4B non traité

II: As anti-C3c

1: Pool 4B traité

2: Pool 4B non traité

B: Feuille de nitrocellulose colorée au rouge Ponceau après électrotransfert:

a: Pool 4B non traité

b: Protéines du kit de calibration de faibles MM

c: Pool 4B traité

C3 est le constituant du complément le plus abondant (taux plasmatique moyen de 0.9 g/l); la concentration moyenne de C3 PA est de 0.15 g/l.

Dans le sérum normal, la boucle d'amplification est ralentie par les protéines de régulation. Cependant des molécules de C3b sont probablement produites en permanence et sont capables, dès leur formation, de se fixer de façon covalente à des agrégats macromoléculaires, à des surfaces cellulaires ou à des particules activatrices (73).

Par ailleurs, les clivages des fragments se poursuivent dans les sérums conservés à T.A. ou à 4°C (49).

- Résultats obtenus avec l'As anti-C3c:

La séquence de C3c (MM de 140000 Da) est commune à C3b et à C3. L'As utilisé reconnaît donc C3 et C3b en plus de C3c mais ces deux formes ne sont pas détectées dans nos échantillons.

Dans le pool non traité, deux bandes distinctes et concentrées sont observées. Il n'en reste qu'une, de coloration atténuée, dans le pool traité. La bande située à environ 125000 Da a disparu. Ces différentes bandes correspondent vraisemblablement à des fragments de C3.

Les bandes de MM estimées à 125000 Da et 62000 Da ne sont pas identifiées, elles pourraient correspondre à une fragmentation des deux chaînes du C3 (de MM 120000 Da et 75000 Da). La bande de 125000 Da disparaissant dans le pool traité, il semble donc que ce fragment ait été retenu par la suspension de MS de traitement.

- Résultats obtenus avec l'As anti-C3 PA:

L'As utilisé est dirigé contre C3 PA mais reconnaît également ses fragments de clivage Bb (ou C3 activateur) et Ba, de MM respectives 75000 Da et 30000 Da, présents dans le sérum sous forme de traces. Ces constituants pourraient correspondre à deux des bandes observées dans le pool non traité.

Trois bandes de faible MM sont absentes du pool 4B traité. La bande de MM évaluée à 93000 Da, correspondant à la MM du C3 PA est atténuée à la suite du traitement.

L'utilisation de l'As anti-C3 PA confirme les résultats précédemment obtenus en immunodiffusion et en électrophorèse: la bande disparaissant en électrophorèse située au même emplacement que celle visualisée en immunotransfert, correspond au C3 PA; cependant l'immunotransfert, plus sensible que l'électrophorèse, révèle la persistance d'une bande atténuée dans le pool traité. La disparition de ce constituant n'est donc pas totale.

1.2.4.4. Conclusions.

L'analyse qualitative des pools 4A et 4B traités a mis en évidence des variations significatives de certaines protéines par rapport aux pools non traités (cf. tableau 2 récapitulatif):

- Une partie des IgG contenues dans le pool 4A a été éliminée au cours du traitement.
- Les constituants du complément C3c et C3 PA voient également leurs concentrations se modifier à la suite du traitement. Les protéines du complément semblent donc très concernées par le traitement puisque nous avons déjà constaté une chute du C1q dans le pool 3 traité.

Il nous reste à vérifier ces conclusions sur le sérum entier, que nous analyserons en immunotransfert comme nous l'avons fait pour les pools 3 et 4. Les résultats seront ensuite

quantifiés par le dosage des protéines interférentes identifiées par immunonéphélémétrie classique.

1.2.5. Sérum entier.

Les protéines interférentes avaient été identifiées en détectant les variations de leurs concentrations dans des pools de fractionnement. Il faut nous assurer que les observations effectuées sur les pools restent valables dans le sérum entier, ce que nous contrôlerons par des analyses en immunotransfert.

1.2.5.1. Traitement du sérum entier.

Le protocole de traitement est identique à celui adopté pour les pools; le sérum entier pur est traité par un culot de MS-Eth (25 mg/ml de sérum). Toutefois, ce sérum étant nettement plus concentré que les pools, nous avons répété cinq fois le traitement afin d'être certains d'éliminer toutes les protéines susceptibles de se fixer aux MS de traitement. Les DO à 280 nm ont été contrôlées au cours des traitements successifs sur les surnageants (S) dilués au 1/100. Les valeurs suivantes sont obtenues:

DO des surnageants des 5 traitements successifs du sérum entier (1/100) traités (T) et non traités (NT).

Surnageants	Trait. 1	Trait. 2	Trait. 3	Trait. 4	Trait. 5
S T	0.707	0.682	0.645	0.600	0.625
S NT	0.711	0.748	0.729	0.678	0.678

Les DO des témoins non traités fluctuent autour d'une valeur moyenne de 0.701. La DO du sérum traité décroît au fur et à mesure des traitements, elle se stabilise dès le 4^{ème} traitement. Une quantité de 7.6 g/l de protéines, représentant 10.8% de la teneur totale en protéines du sérum entier, est éliminée au cours des traitements.

1.2.5.2. Résultats des immunotransferts.

Les électrophorèses en SDS sont effectuées sur des gels où T est de 7.5%; 90 µg de protéines totales sont déposés dans chaque puits.

Le sérum entier traité 5 fois et non traité est analysé en présence des As dirigés contre les protéines suivantes:

- Protéines interférentes mises en évidence dans le pool 3: fibronectine. C1q n'ayant pas été testé pour ce pool, il ne l'a pas été non plus sur le sérum entier. Nous avons testé également un As anti-haptoglobine afin de vérifier que la concentration de cette protéine n'est pas modifiée à la suite du traitement.
- Protéines mises en évidence dans les pools 4A et 4B: IgG, C3 PA et C3c.

Les résultats suivants sont obtenus:

- Fibronectine: comme pour le pool 3, une plage de coloration située à des MM élevées est observée, plus intense dans le sérum entier non traité.
- Haptoglobine: aucune variation de l'intensité des bandes n'est observée entre le sérum entier traité et le non traité, confirmant que la concentration de l'haptoglobine ne semble pas affectée par le traitement.

- IgG: les variations des IgG n'ont pu être étudiées par ce procédé dans aucun des échantillons en raison des problèmes techniques déjà rencontrés avec le pool 4 lors de la révélation enzymatique; bien que saturées, les bandelettes apparaissent entièrement colorées.
- C3c et C3 PA: les résultats sont représentés sur la figure 76.
 - C3c: comme pour le pool 4, nous observons de nombreuses bandes dont les MM s'étendent de 33000 Da à plus de 330000 Da. Les constituants C3c et C3 sont présents. L'intensité des bandes semble équivalente dans les sérums entiers traité et non traité.
 - C3 PA: l'échantillon traité ne renferme qu'une bande à 91000 Da correspondant au C3 PA et une autre bande, légère, de 62000 Da, qui pourrait correspondre au C3 activateur. Le sérum entier non traité présente les mêmes bandes mais elles sont plus intenses; de plus 4 bandes peu marquées apparaissent.

En conclusion, l'étude du sérum entier en immunotransfert permet de conforter les résultats précédents à l'exception toutefois de celui obtenu sur le pool 4B vis-à-vis du C3c. Nous n'avons ici mis en évidence aucune variation de l'intensité des bandes de ce constituant après traitement par les MS-Eth.

1.2.6. Conclusion.

Les analyses qualitatives ont précisé la composition de chaque pool et ont permis de suspecter des variations de concentrations de certaines protéines affectées par le traitement: fibronectine, IgG, C1q, C3c et C3 PA.

Ces protéines appartiennent à des classes très différentes. Cependant, celles faisant partie du système du complément, aussi bien de la voie classique que de la voie alterne, sont concernées de façon particulièrement évidente.

Les paragraphes suivants rapporteront les résultats des dosages de ces protéines, effectués sur les pools et les sérums entiers traités et non traités.

2. Dosages par immunonéphélométrie classique des protéines supposées interférentes.

Cette étude est effectuée sur les pools affectés par le traitement, sur le sérum entier et sur 35 sérums individuels choisis au hasard au Laboratoire. Nous décrivons tout d'abord les résultats des pools et du sérum entier avant d'aborder les dosages sur des sérums individuels.

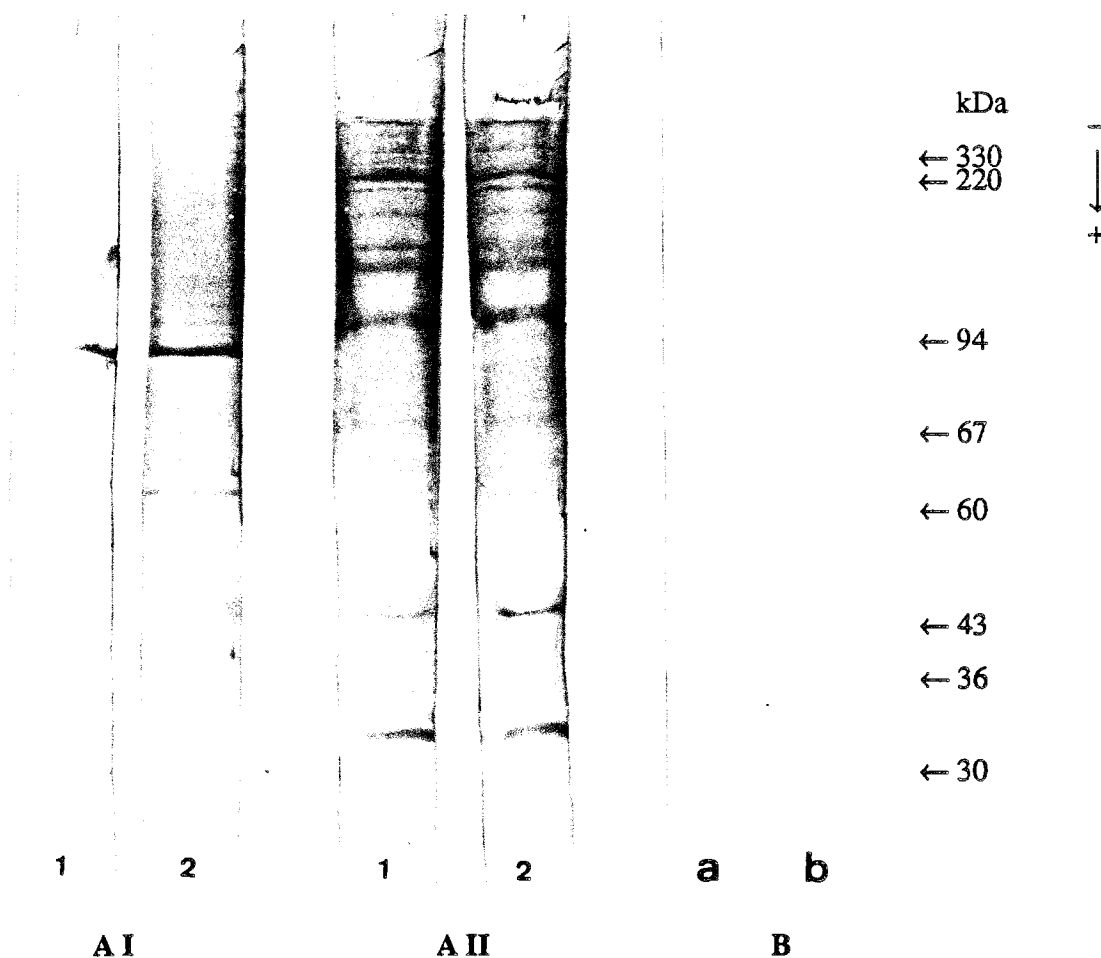
2.1. Pools et sérum entier.

2.1.1. Protocole.

Les protéines sont dosées selon le protocole du fournisseur de réactifs (Behring) en immunonéphélométrie classique; les solutions standards et les As proviennent de Behring à l'exception de la solution de C1q; cette préparation conservée congelée à -20°C a été effectuée au Laboratoire en 1984 à partir de sérums humains frais selon la technique de Yonemasu et Stroud (165). La solution est titrée en néphélométrie classique par rapport à un standard de l'OMS à 246 U.I./ml (1 U.I./ml = 1,2 mg/l).

Les dosages sont menés en parallèle sur les pools traités et non traités. Le sérum entier est traité 5 fois (cf. Ch.II.1.2.5.1.).

Figure 76 Electrotransfert du sérum entier non traité et traité et détection immunologique à l'aide de différents As (dilution au 1/200)



Electrophorèse réalisée en gel de polyacrylamide (T = 7.5%) en tampon Tris-HCl 0.05M glycine 0.38M SDS 0.1% pH 8.3 - Dépôts de 0.090 mg

Electrotransfert sur matrice de nitrocellulose dont la taille des pores est de 200 nm en tampon Tris-HCl 0.025M glycine 0.192M pH 8.3 méthanol 20% - Révélation par des Ac anti-Ig (H + L) de lapin conjugués à la peroxydase (dilution au 1/1000)

A: Détection immunologique à l'aide de 2 As:

I: As anti-C3PA

1: Sérum entier traité

2: Sérum entier non traité

II: As anti-C3c

1: Sérum entier traité

2: Sérum entier non traité

B: Feuille de nitrocellulose colorée au rouge Ponceau après électrotransfert:

a: Protéines du kit de calibration de hautes MM

b: Protéines du kit de calibration de faibles MM

Le tableau ci-dessous récapitule l'ensemble des dosages à effectuer, les dilutions finales des pools dans les cuves de réaction sont également indiquées:

Dosages protéiques effectués.

Prot. dosées valeurs (mg/l) physiol.	Milieu sérique (T et NT)	dilution finale du milieu sérique
fibronectine 325±75	pool 3 sérum entier	1/4 1/20
haptoglobine 1900±1000	pool 3 pool 4C sérum entier	1/4 1/4 1/100
C1q 150±50	pool 3 sérum entier	pur 1/4
C3c 850±350	pool 4B sérum entier	1/10 1/100
C3 PA 250±50	pool 4B sérum entier	1/2 1/8
IgG 11000±4000	pool 4A sérum entier	1/5 1/100
albumine 45000±10000	sérum entier	1/2000

L'haptoglobine et l'albumine constituent des témoins.

2.1.2. Résultats des dosages.

Le tableau de résultats est représenté ci-dessous:

Résultats des dosages d'immunonéphélométrie classique (en mg/l).

As testé	S. entier		3		4A		4B		4C	
	NT	T	NT	T	NT	T	NT	T	NT	T
fibro	180	49	13	8						
hapto	1261	1280	138	133					7	6
C1q	78	9	14	1						
C3c	956	593					< 50	< 50		
C3 PA	212	130					21	10		
IgG	12720	10940			496	244				
albumine	39160	37480								

Les quantités de protéines perdues lors du traitement sont évaluées en mg/l et nous avons calculé les pourcentages de récupération dans les pools traités ou pourcentages par rapport à la concentration originelle (la quantité de protéines présente dans l'échantillon non traité représentant 100%, concentration originelle). Le tableau ci-dessous reprend ces chiffres;

les pertes de concentrations des protéines totales des pools déterminées précédemment par la mesure des DO à 280 nm sont également reportées:

Quantités de protéines perdues (mg/l) après traitement des échantillons sériques.

Protéines	Perte et %	Sérum entier	3	4A	4B	4C
fibronectine	perte mg/l % récup.	131 27.4	5 60.6			
haptoglobine	perte mg/ l % récup.	0 101	5.5 96			0.36 94
C1q	perte mg/ l % récup.	68.9 11.4	12.6 9.2			
C3c	perte mg/l % récup.	363 62				
C3 PA	perte mg/l % récup.	82 61			10.7 48.2	
IgG	perte mg/l % récup.	1780 86		253 49		
albumine	perte mg/l % récup.	1680 96				
protéines totales	perte mg/l % récup.	7600 10.8	310	360	0	0

Les résultats de récupération sont également représentés sous forme d'histogramme (figure 77).

2.1.2.1. Protéines non affectées par le traitement.

Les concentrations d'haptoglobine et d'albumine dans le sérum entier et dans les pools ne sont pas significativement modifiées à la suite du traitement. Ces protéines ne se fixent donc pas aux MS de traitement.

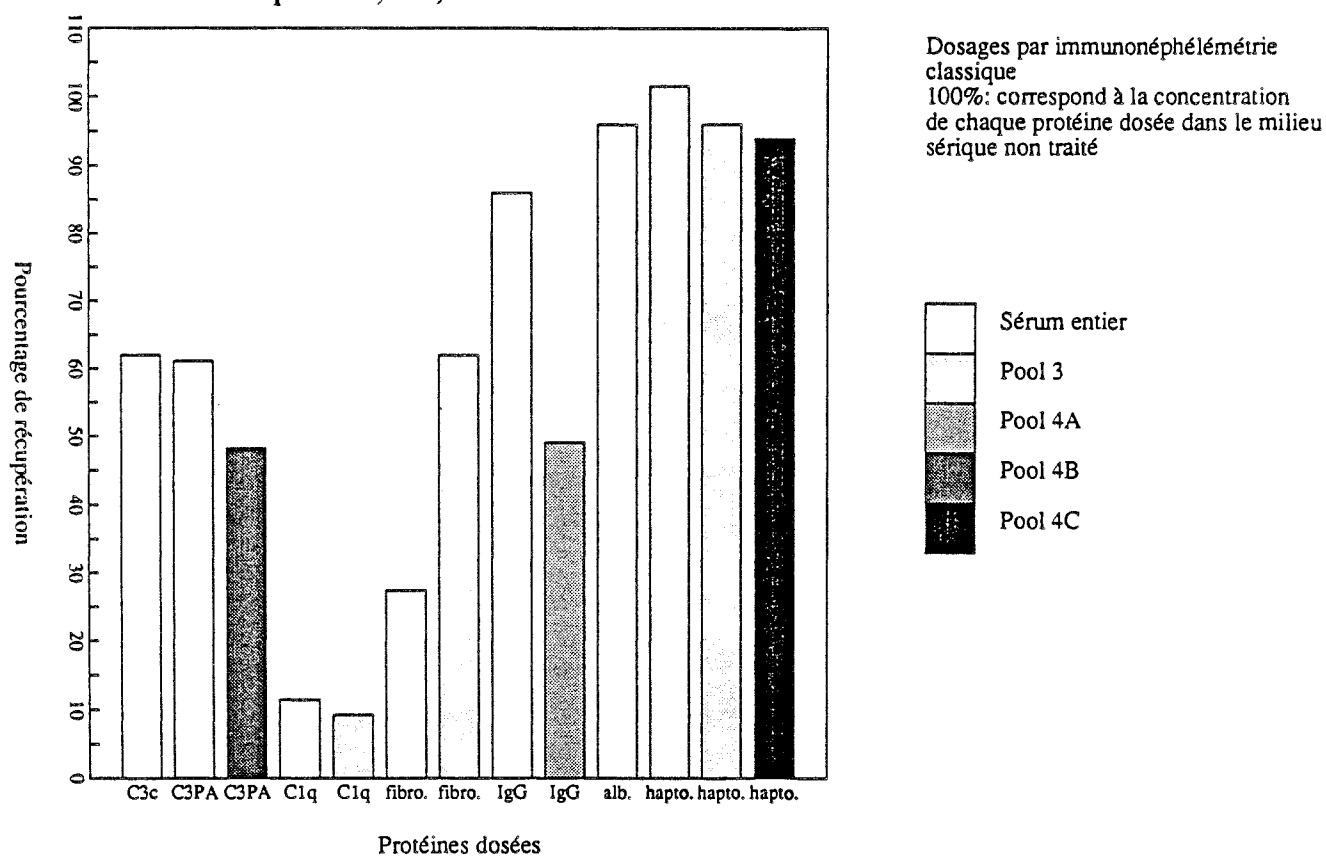
2.1.2.2. Protéines affectées par le traitement.

La fibronectine, les composants C1q, C3c, C3 PA et les IgG sont plus ou moins retenues par les MS de traitement, aussi bien dans le sérum entier que dans les pools; leurs concentrations respectives chutent à la suite du traitement mais ne s'annulent pas totalement.

2.1.2.2.1. Sérum entier.

En masse de protéines perdues, les IgG sont de loin les plus importantes, suivies par C3c puis la fibronectine. Les IgG sont les constituants les plus concentrés dans cette liste. Inversement, C1q, élément le moins concentré, est aussi celui pour lequel la quantité perdue est la plus faible. Les différences de concentrations de C1q et d'IgG sont telles que si la totalité du C1q détecté dans le sérum non traité se fixait aux MS, elle équivaldrait à la fixation de 0.6% des IgG totales de ce sérum. La masse de protéines perdues n'est donc pas

Figure 77 Taux de récupération des protéines dosées dans le sérum entier traité et dans les pools 3, 4A, 4B et 4C traités



un indicateur satisfaisant et la comparaison des pourcentages de récupération reflète davantage les variations dues au traitement.

La perte de protéines totales, mesurée par la DO du sérum entier après traitement, est de 7.6 g/l. Or, la somme des pertes constatées pour chaque protéine ne s'élève qu'à 4.1 g/l (l'albumine a été prise en compte, bien que la diminution de sa concentration ne soit pas significative). Il est donc fort probable que d'autres constituants affectés par le traitement n'aient pas été dosés, en particulier ceux du complément; une fois le système initié par l'une des voies classique ou alterne, ses constituants s'activent séquentiellement par des réactions en cascades. Or les protéines des deux voies sont touchées par le traitement: C1q est l'une des sous-unités de C1, composé de reconnaissance de la voie classique, C3 PA est l'un des facteurs de la voie alterne, et C3 et C3c sont communs aux deux voies. L'ensemble des protéines du complément intervient donc vraisemblablement; nous examinerons plus loin les mécanismes d'activation des deux voies afin d'établir un éventuel lien avec la déstabilisation.

Si l'on mesure l'efficacité du traitement en termes de pourcentage de récupération, les chiffres montrent que C1q est fortement retenu par les MS, nettement plus que les autres protéines dosées; près de 90% du contenu en C1q de l'échantillon non traité se fixent aux MS de traitement. La concentration de la fibronectine chute également de façon importante, de 73%. Les constituants du complément C3 et C3 PA se lient aux MS de traitement dans les mêmes proportions, mais leurs concentrations, comme celle des IgG, diminuent nettement moins que celles de C1q et de fibronectine.

2.1.2.2.2. Pools - comparaison avec le sérum entier.

C1q est le constituant le plus affecté par le traitement, suivi par C3 PA, les IgG, et la fibronectine. Les pertes de concentrations en protéines totales des pools 3 et 4A (déterminées précédemment par la mesure de la DO à 280 nm, cf. Ch.I.2.2.5.1. et 3.2.1.3.2.) sont respectivement de 0.31 g/l et 0.36 g/l. Toutes les protéines n'ayant pas été dosées dans le pool 3, nous ne pouvons analyser cette perte de concentration (la somme des pertes mesurées en protéines s'élève à 0.023 g/l). Par contre le pool 4A ne contient que des IgG, dosées à 0.25 g/l dans le pool traité. Cette valeur se rapproche davantage de celle déterminée en DO.

La comparaison des valeurs des pourcentages entre le sérum entier et les pools n'est pas aisée:

- D'un côté, les pools résultent d'au moins un fractionnement du sérum entier. Ils sont dilués et les concentrations en constituants interférents y sont plus basses que dans le sérum entier; de plus, ces constituants se répartissent sur plusieurs pools. Les substances interférentes sont partiellement purifiées et leur accessibilité aux MS de traitement peut être facilitée du fait de l'augmentation de la probabilité de leur rencontre avec les MS. Donc le traitement peut se révéler plus efficace dans les pools que dans le sérum entier. C'est ce que nous observons pour les IgG et C3 PA.
- D'un autre côté, le traitement des pools est unique alors que nous avons soumis le sérum entier à 5 traitements successifs, en vue d'éliminer éventuellement plus efficacement les protéines interférentes; les pourcentages de récupération peuvent donc être inférieurs à ceux des pools, ce que nous confirmons ici pour la fibronectine.

De plus, les pools étant plus dilués, les chances de rencontre de leurs constituants avec les MS-Eth peuvent être amoindries.

Les pourcentages de récupération de C1q sont identiques dans le pool 3 et dans le sérum entier.

Les résultats montrent que les pools issus des fractionnements, aussi bien que le sérum entier, constitué d'un mélange de 193 sérums, possèdent les mêmes constituants retenus par les MS de traitement. Ils suggèrent par ailleurs que probablement d'autres substances non décelées ici interviennent dans cette fixation. Nous allons maintenant exposer les résultats obtenus sur des sérums individuels. Ils nous permettront d'apprécier la validité de ceux obtenus sur le sérum entier et éventuellement de donner à nos conclusions une portée générale.

2.2. Sérums individuels.

2.2.1. Tests de déstabilisation et traitement.

35 sérums individuels ont été choisis au hasard parmi les sérums destinés aux analyses du Laboratoire: 23 sont frais (2 à 5 jours), 12 autres plus anciens (8 à 30 jours) permettront d'étudier l'incidence éventuelle de la durée de conservation à 4°C des sérums sur les résultats des dosages.

Nous contrôlerons que:

- Les sérums déstabilisent les MS-Eth.
- Leur traitement par les MS-Eth permet d'éliminer les signaux de déstabilisation.

Nous doserons les 5 protéines interférentes avant et après traitement des sérums.

2.2.1.1. Protocoles des tests de déstabilisation et du traitement.

Les tests de déstabilisation sont effectués dans les conditions suivantes:

- 1^{ière} étape: 30 µl de sérum pur + 30 µl de MS-Eth prédiluées + 120 µl de tampon PBS. Le mélange est incubé 30 min à T.A.
- 2^{ème} étape: 20 µl de la solution de PBS renfermant 37,5% de PEG sont ajoutés; le volume est complété à 300 µl par addition de 100 µl de PBS. La lecture des signaux intervient après 15 min d'incubation.

La réaction porte sur du sérum dilué au 1/10 et se déroule dans une solution de PEG à 2,5%. La seule modification apportée au protocole réside dans la dilution du milieu sérique (les pools étaient testés au 1/2 final).

Le traitement par les MS-Eth ne diffère pas de celui adopté pour les pools et le sérum entier, mais les sérums ne subissent qu'un seul traitement au lieu de 5 pour le sérum entier.

2.2.1.2. Résultats.

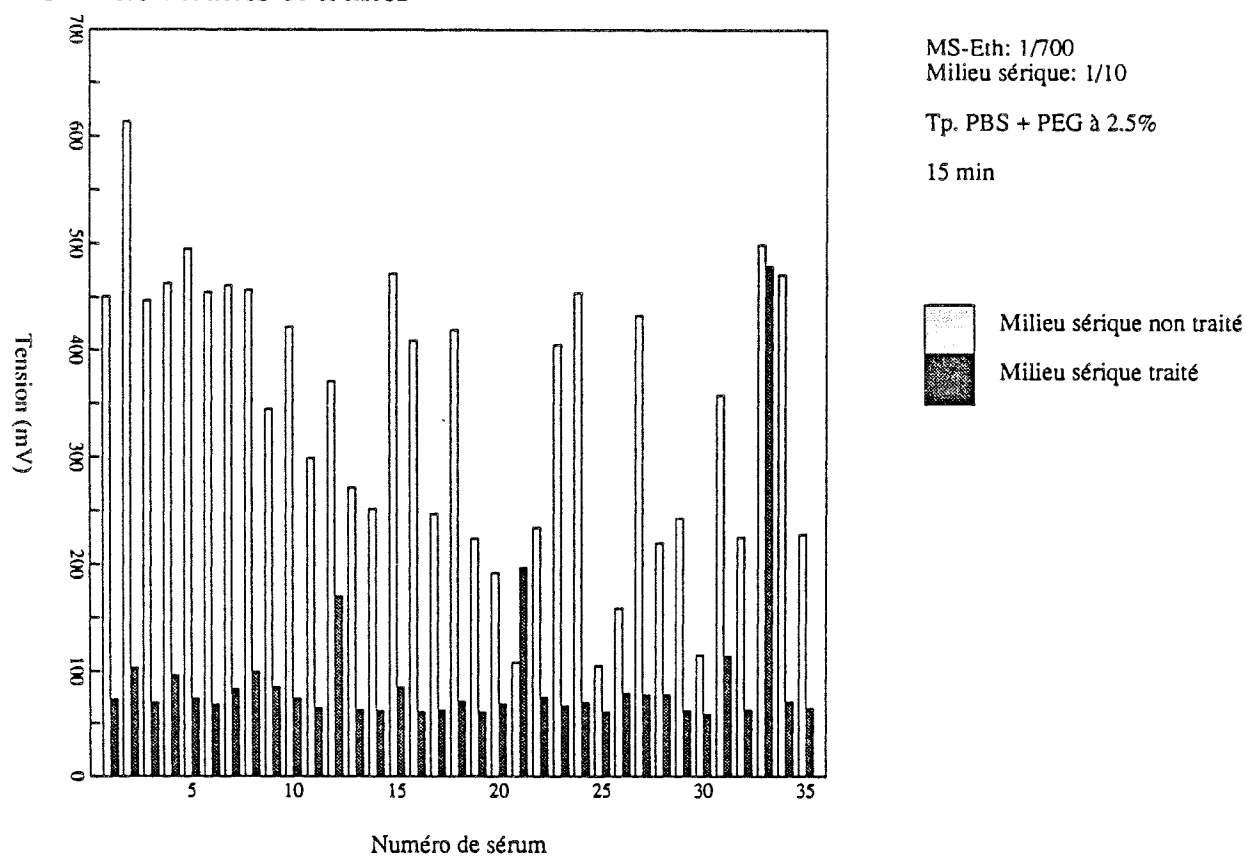
Les signaux de déstabilisation (obtenus en 15 min) des surnageants traités et non traités des 35 sérums sont reportés dans le tableau 3. Les pourcentages de déstabilisation ont été calculés (notés % dans le tableau): après déduction du blanc MS (58 mV), le rapport T/NT traduit la déstabilisation résiduelle après traitement: celle-ci est nulle lorsque les signaux des sérums traités équivalent au blanc MS.

L'histogramme illustré sur la figure 78 reprend sous forme graphique les signaux de déstabilisation originelle (avant traitement) et de déstabilisation résiduelle (après traitement) pour les 35 sérums.

Tableau 3 Résultats des dosages d'IgG, de C1q, de C3PA, de C3c, de fibronectine et d'haptoglobine dans les 35 sérums non traités et traités - Valeurs des signaux de déstabilisation

Lot	Déstabilisations			IgG (g/l)			C1q (UI/ml)			C3 PA (mg/l)			C3c (g/l)			Fibronectine (mg/l)			Haptoglobine (g/l)		
	NT	T	%	NT	T	%	NT	T	%	NT	T	%	NT	T	%	NT	T	%	NT	T	%
1	450.60	73.40	3.9	10.86	10.04	92.4	81.60	8.00	9.8	210.00	184.00	87.6	1.00	0.88	88.0	349.00	294.00	84.2	1.44	1.41	97.9
2	613.70	102.50	8.0	14.70	13.54	92.1	97.60	10.40	10.7	272.00	238.00	87.5	1.05	0.98	93.3	254.00	232.00	91.3	3.30	3.29	99.7
3	446.60	70.00	3.1	12.69	12.18	96.0	89.00	15.70	17.6	239.00	215.00	90.0	0.85	0.77	90.6	351.00	313.00	89.2	1.70	1.63	95.9
4	462.90	95.50	9.3	12.61	11.90	94.4	75.10	9.90	13.2	280.00	251.00	89.6	1.17	1.03	88.0	197.00	178.00	90.4	1.50	1.48	98.7
5	495.30	73.70	3.6	19.56	18.71	95.7	80.50	12.70	15.8	303.00	179.00	59.1	0.83	0.69	83.1	280.00	248.00	88.6	1.94	1.97	101.5
6	455.30	67.80	2.5	15.03	14.04	93.4	73.20	5.30	7.2	206.00	181.00	87.9	0.79	0.67	84.8	245.00	203.00	82.9	2.36	2.29	97.0
7	460.80	82.50	6.1	9.39	9.07	96.6	98.20	15.10	15.4	381.00	301.00	79.0	0.87	0.74	85.1	225.00	191.00	84.9	3.92	3.77	96.2
8	456.80	98.60	10.2	14.27	13.49	94.5	66.20	3.80	5.7	170.00	154.00	90.6	0.69	0.56	81.2	229.00	188.00	82.1	0.64	0.65	101.6
9	345.10	84.60	9.3	15.81	15.03	95.1	114.00	32.00	28.1	248.00	218.00	87.9	1.12	1.01	90.2	454.00	367.00	80.8	1.83	1.93	105.5
10	422.00	74.20	4.5	9.88	9.32	94.3	90.20	8.10	9.0	208.00	185.00	88.9	0.81	0.68	84.0	297.00	245.00	82.5	2.71	2.64	97.4
11	299.20	65.20	3.0	15.47	15.55	100.5	99.20	14.50	14.6	281.00	226.00	80.4	0.99	0.90	90.9	275.00	213.00	77.5	3.82	4.15	108.6
12	370.70	169.50	35.7	17.57	16.22	92.3	98.50	35.40	35.9	381.00	312.00	81.9	1.45	1.35	93.1	399.00	337.00	84.5	4.32	4.48	103.7
13	271.50	62.50	2.1	10.27	10.00	97.4	94.00	5.20	5.5	214.00	188.00	87.9	1.00	0.88	88.0	57.00	69.00	121.1	1.91	1.93	101.0
14	252.20	61.60	1.9	7.02	6.96	99.1	86.60	3.00	3.5	162.00	151.00	93.2	0.84	0.70	83.3	299.00	246.00	82.3	2.54	2.55	100.4
15	472.40	85.20	6.6	12.48	11.59	92.9	87.50	14.00	16.0	204.00	189.00	92.6	0.79	0.64	81.0	230.00	218.00	94.8	2.23	3.32	102.8
16	409.00	60.70	0.8	10.62	10.11	95.2	105.60	12.80	12.1	219.00	181.00	82.6	1.47	1.33	90.5	169.00	142.00	84.0	3.47	3.48	100.3
17	247.10	63.00	2.6	10.42	9.92	95.2	78.00	12.10	15.5	322.00	258.00	80.1	1.17	1.01	86.3	287.00	238.00	82.9	4.01	4.12	102.7
18	418.90	71.00	3.6	17.46	16.78	96.1	115.90	15.80	13.6	161.00	166.00	103.1	0.70	0.68	97.1	224.00	191.00	85.3	0.67	0.67	100.0
19	224.00	60.80	1.7	12.69	12.09	95.3	101.20	5.30	5.2	216.00	184.00	85.2	0.80	0.81	101.3	300.00	229.00	76.3	0.55	0.56	101.8
20	192.20	69.00	8.2	15.37	14.65	95.3	64.30	7.70	12.0	187.00	169.00	90.4	0.60	0.57	95.0	226.00	179.00	79.2	0.48	0.49	102.1
21	107.60	197.30	280.8	11.51	11.02	95.7	64.80	10.70	16.5	214.00	198.00	92.5	0.58	0.51	87.9	22.00	33.00	150.0	1.08	1.05	97.2
22	233.90	75.20	9.8	15.27	15.03	98.4	85.10	11.20	13.2	260.00	209.00	80.4	0.83	0.81	97.6	204.00	176.00	86.3	1.71	1.64	95.9
23	404.60	67.20	2.7	16.22	15.87	97.8	102.20	15.10	14.8	218.00	191.00	87.6	0.65	0.61	93.8	200.00	171.00	85.5	1.98	1.99	100.5
24	453.90	70.30	3.1	12.91	12.52	97.0	120.20	20.00	16.6	201.00	188.00	93.5	1.10	1.06	96.4	319.00	265.00	83.1	3.52	3.45	98.0
25	105.30	60.60	5.5	7.79	7.52	96.5	83.10	4.00	4.8	235.00	196.00	83.4	0.73	0.62	84.9	257.00	209.00	81.3	1.42	1.39	97.9
26	159.30	78.60	20.3	9.58	9.14	95.4	91.40	7.80	8.5	150.00	159.00	106.0	0.81	0.77	95.1	191.00	167.00	87.4	2.36	2.27	96.2
27	432.70	77.60	5.2	13.58	13.09	96.4	86.00	11.80	13.7	200.00	180.00	90.0	0.68	0.62	91.2	213.00	181.00	85.0	1.01	1.01	100.0
28	219.60	77.60	12.1	10.46	10.31	98.6	97.80	13.10	13.4	232.00	191.00	82.3	0.90	0.84	93.3	283.00	232.00	82.0	2.37	2.29	96.6
29	243.20	61.50	1.9	16.37	15.67	95.7	92.40	9.50	10.3	199.00	179.00	89.9	0.79	0.79	100.0	371.00	283.00	76.3	1.31	1.33	101.5
30	115.10	58.70	1.2	10.66	10.23	96.0	95.60	8.60	9.0	285.00	214.00	75.1	0.94	0.91	96.8	218.00	202.00	92.7	2.79	2.72	97.5
31	357.60	114.40	18.8	20.02	19.56	97.7	86.00	36.40	42.3	237.00	205.00	86.5	1.03	0.91	88.3	291.00	252.00	86.6	1.79	1.69	94.4
32	225.30	63.00	3.0	10.46	10.27	98.2	126.20	20.80	16.5	280.00	219.00	78.2	1.00	0.98	98.0	273.00	215.00	78.8	2.67	2.59	97.0
33	498.60	479.90	95.8	21.77	19.73	90.6	114.40	61.80	54.0	217.00	180.00	82.9	0.55	0.52	94.5	348.00	268.00	77.0	1.75	1.72	98.3
34	471.40	70.80	3.1	10.82	10.82	100.0	87.80	19.30	22.0	248.00	210.00	84.7	1.07	0.94	87.9	347.00	288.00	83.0	1.21	1.21	100.0
35	228.20	64.90	4.1	8.63	8.70	100.8	74.80	8.20	11.0	176.00	163.00	92.6	0.62	0.55	88.7	70.00	76.00	108.6	3.22	3.68	114.3
Moy.	346.00	76.70	6.6	13.15	12.59	96.0	91.55	14.43	15.2	234.74	200.34	86.6	0.89	0.81	90.6	255.83	215.40	87.6	2.19	2.20	100.0
SD	124.90	21.00	6.9	3.51	3.27	2.4	15.05	11.37	10.3	54.20	36.08	7.9	0.22	0.20	5.3	90.53	69.79	13.8	1.05	1.09	3.8

Figure 78 Comportement des MS-Eth en présence de sérums humains non traités et traités



Les MS-Eth sont plus ou moins déstabilisées par l'ensemble des sérums (signal moyen de 346 mV); le traitement de ces sérums permet l'élimination presque totale des signaux de déstabilisation (signal moyen de 77 mV, hormis les sérums 21 et 33) sauf pour trois d'entre eux, les 12, 21 et 33 surtout, où des signaux de déstabilisation résiduelle importants persistent. Pour ces sérums, soit un seul traitement n'a pas suffi à éliminer la totalité des éléments interférents, soit la déstabilisation observée relève d'un autre mécanisme que l'adsorption de protéines sur les microsphères.

Les sérums âgés et frais ne montrent aucune différence dans les valeurs des signaux de déstabilisation originelle et de déstabilisation résiduelle.

En conclusion, le traitement se révèle tout aussi efficace sur les sérums que sur les pools pour éliminer les constituants responsables des signaux de déstabilisation, exceptés cependant sur les sérums 12, 21 et 33.

2.2.2. Dosages des protéines interférentes.

Ces protéines sont dosées par immunonéphélométrie classique dans les sérums traités et non traités, dans les mêmes conditions que celles adoptées précédemment pour les pools et le sérum entier. Les dilutions des sérums dans les cuves de réactions sont identiques à celles du sérum entier.

Le tableau 3 récapitule les résultats obtenus pour l'ensemble des protéines dosées. Les colonnes intitulées % comprennent les pourcentages de récupération. Toutes les protéines dosées voient leurs concentrations modifiées par le traitement, indépendamment de la durée de conservation des sérums. Seule l'haptoglobine, prise à titre de témoin, est retrouvée intégralement après traitement, confirmant les résultats précédemment obtenus sur sérum entier.

2.2.2.1. C3c et C3 PA.

Les pourcentages de récupération moyens de ces deux protéines sont plus élevés (90.6% pour C3c, 86.6% pour C3 PA) que ceux observés sur le sérum entier. Ce dernier ayant subi 5 traitements, il est possible que ces protéines se soient davantage liées aux MS-Eth au fur et à mesure des opérations successives.

Certains sérums (les 19 et 29 pour C3c, les 18 et 26 pour C3 PA) ne montrent aucune variation de leurs concentrations originelles après traitement; or le pouvoir déstabilisant résiduel de ces sérums après traitement est faible. Il ne semble donc pas que la déstabilisation résiduelle des sérums soit la conséquence directe de l'élimination de C3c ou de C3 PA par fixation sur les MS-Eth. Aucune corrélation significative n'a pu en effet être établie entre les signaux de déstabilisation résiduelle et les concentrations résiduelles de C3c ou de C3 PA après traitement. Ces protéines n'interviennent vraisemblablement qu'en second lieu, à la suite d'autres événements.

2.2.2.2. Fibronectine.

Les concentrations de fibronectine chutent de façon nettement moins importante que dans le sérum entier (27.4% de récupération contre 84.0% en moyenne pour les sérums); il apparaît que le nombre de traitements influe sur l'élimination de ce constituant. On peut penser que cette protéine, qui s'adsorbe sur les surfaces cellulaires, bactériennes et virales, se fixe directement à la surface des MS de traitement. Dans ce cas, la répétition des traitements, ou un traitement par une quantité plus importante de MS-Eth, augmentera son élimination par adsorption.

Trois des sérums possèdent des concentrations plus faibles que les autres sérums, en liaison probablement avec leurs pathologies.

Les signaux de déstabilisation originelle sont corrélés ($r = 0.3$, $0.05 < p < 0.1$) à la concentration de fibronectine avant traitement. Par contre, après traitement, cette corrélation n'est plus significative. La déstabilisation ne serait donc que partiellement liée à la concentration de fibronectine et le reliquat de déstabilisation après traitement ferait intervenir une espèce moléculaire autre que la fibronectine.

2.2.2.3. C1q.

C1q est de loin la protéine la plus affectée par le traitement; une moyenne de 15% de récupération est obtenue, proche des 12% constatés sur le sérum entier, bien que les sérums individuels n'aient subi qu'un seul traitement. Il semble donc que cette protéine, faiblement concentrée dans le sérum, ait une forte affinité pour les MS-Eth.

L'analyse des résultats montre que, dans certains sérums, les concentrations de C1q, bien que chutant, restent relativement élevées après traitement, alors qu'elles ne l'étaient pas particulièrement avant traitement. Les sérums 12 et 33 se trouvent dans ce cas; or le traitement de ces sérums n'aboutit pas à une stabilisation complète des MS-Eth. Un lien pourrait donc exister entre déstabilisation et concentration résiduelles de C1q après le traitement.

Nous avons donc recherché l'existence de corrélations entre d'une part les signaux de déstabilisation et la concentration originelles de C1q avant traitement et d'autre part les signaux de déstabilisation et la concentration résiduelles de C1q après traitement:

- Les signaux de déstabilisation originelle ne sont pas significativement corrélés aux concentrations originelles de C1q.
- Les signaux de déstabilisation résiduelle corréleront avec C1q résiduel ($r = 0.76$, $p < 0.001$); l'efficacité du traitement quant à la déstabilisation des MS serait donc liée directement à la concentration résiduelle du C1q, une fixation insuffisante de ce dernier sur les MS de traitement se traduisant par une persistance de la déstabilisation.

2.2.2.4. IgG.

Les pourcentages de récupération sont légèrement supérieurs à ceux obtenus pour le sérum entier. L'incidence du nombre de traitements est probablement en cause car ces sérums n'ont été traités qu'une fois.

Toutefois la concentration des IgG chute pour la plupart des sérums. Comme nous l'observons avec C1q, les sérums 12 et 33 ont perdu peu d'IgG au cours du traitement. Mais contrairement au C1q, ces sérums (ainsi que le 31) non traités ont des concentrations originelles importantes d'IgG. Ici il semble que les signaux de déstabilisations originelle et résiduelle soient liés respectivement à la concentration d'IgG avant et après traitement.

Les calculs de corrélations renforcent ces hypothèses:

- Les signaux de déstabilisation originelle corréleront avec la concentration d'IgG avant traitement ($r = 0.40$; $0.01 < p < 0.05$).
- Les signaux de déstabilisation résiduelle corréleront avec la concentration d'IgG après traitement ($r = 0.45$; $0.01 < p < 0.05$).

Nous disposons pour cette protéine d'une information supplémentaire par rapport aux autres protéines dosées: nous avons constaté une chute de sa concentration dans le pool 4A traité; or l'analyse de ce pool a montré que seules des IgG y étaient mises en évidence. A priori, dans ce pool, cette protéine est la seule à pouvoir intervenir dans le mécanisme d'interaction avec les MS. Les IgG se fixeraient donc directement sur les MS de traitement.

2.2.2.5. Lien IgG-C1q.

Les IgG sont responsables pour une part des signaux de déstabilisation avant traitement.

C1q interviendrait à un deuxième niveau. Une corrélation existe entre les concentrations des IgG avant traitement et celles résiduelles de C1q après traitement ($r = 0,62$; $p < 0.001$); il apparaît que ces deux protéines agissent mais selon des mécanismes et dans des ordres différents: certaines IgG se fixeraient préférentiellement sur les MS de traitement (ou de tests); C1q ne s'adsorberait qu'ensuite, à condition que les MS ne soient pas saturées par les IgG, ce qui expliquerait la persistance après traitement de fortes concentrations en C1q dans certains sérums à forte teneur en IgG.

La molécule de C1q possédant des récepteurs pour les IgG, elle pourrait se lier à ces dernières préalablement fixées sur les MS de traitement.

Les mécanismes d'action de ces deux protéines, dont on ignore si elles agissent par un système de compétition ou de façon tout à fait indépendante, seront discutés dans la troisième partie de ce chapitre (cf. 3.2.1.).

2.3. Conclusions: données sur les protéines dosées.

La littérature décrit les interactions de protéines au contact de diverses surfaces solides artificielles. Les études concernent le plus souvent les protéines plasmatiques. Le mécanisme d'adsorption, très complexe, est encore incomplètement élucidé car plusieurs espèces moléculaires interviennent. Les substances les plus abondantes se fixeraient dans un premier temps pour ensuite être déplacées par des substances en concentrations plus faibles, mais possédant des affinités élevées pour les surfaces (10). La protéine qui se fixe initialement est le fibrinogène (20, 160), déplacée par le facteur de Fitzgerald et semble-t-il par le facteur d'Hageman (20, 160).

Une étude récente (10) conforte nos résultats. Ces auteurs ont incubé des résines de polystyrène chargées négativement en présence de plasma. Après lavage, les protéines adsorbées sont éluées. Outre le fibrinogène, ces auteurs ont identifié de faibles quantités d'IgG, d'albumine, de transferrine et de plasminogène. De la fibronectine et des constituants du C3 ont également été décelés.

Nous ne sommes pas en mesure actuellement d'établir de liens entre les différentes protéines dosées cependant:

- La fibronectine, dont nous proposerons un mécanisme de fixation aux MS dans les paragraphes suivants (cf. 3.1.), est connue pour se lier au C1q, au C3 et à ses fragments de clivage (79). Couplée de façon covalente à un support solide, elle devient capable d'activer les récepteurs membranaires du C3b et C3bi.
- C1q semble le constituant du complément le plus touché par le traitement. Les constituants biologiques capables d'activer la voie classique sont généralement les complexes immuns; mais cette voie peut également être activée par des polyanions ou des IgG agrégées. La voie alterne est activée par de nombreuses substances contenant des structures polysaccharidiques chargées négativement telles que l'inuline et le zymosan (42). Les MS-Eth étant entourées de charges négatives, nous pouvons proposer un modèle selon lequel C1q se lierait en

premier aux MS-Eth et déclencherait les réactions de la voie classique. Les fragments de C3 détectés dans les pools témoigneraient d'une activation du C3 aussi bien par la voie alterne que par la voie classique.

3. Essai de compréhension du phénomène interférant.

Une amorce de compréhension de ce qui se produit à la surface des MS-Eth au cours du traitement a été ébauchée pour la fibronectine, C1q et en partie, pour les IgG. L'étude de la fibronectine fera l'objet d'un paragraphe séparé. Par contre les résultats obtenus avec les IgG et C1q seront décrits en parallèle, ces deux protéines ayant été étudiées le plus souvent ensemble.

3.1. Fibronectine.

La fibronectine est affectée par le traitement du pool 3 où sa concentration passe de 12.6 µg/ml avant traitement à 7.6 µg/ml après traitement.

3.1.1. Principe.

Les fibronectines forment une famille de glycoprotéines de haute masse moléculaire (MM de 450000 Da), structuralement proches, impliquées dans l'expression de diverses fonctions cellulaires, dont l'adhésion cellulaire. Toutes ces fonctions requièrent l'interaction de la fibronectine avec les surfaces cellulaires. La fibronectine plasmatique est composée de plusieurs domaines résistants à la protéolyse et plusieurs équipes ont réussi à définir et à isoler les fragments de la molécule impliqués lors des interactions avec les cellules. Un fragment de 11500 Da, dont la séquence est entièrement connue (60), permet à la fibronectine d'interagir avec les surfaces cellulaires. Plusieurs séquences de 4 à 10 acides aminés issues de ce fragment ont récemment été isolées: elles renferment la séquence Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS), qui représente précisément le site de liaison de la fibronectine. Cette petite séquence est très hydrophile, formant probablement une boucle à la surface de la molécule adaptée pour interagir avec les cellules (117).

Il a été démontré que les solutions de peptides synthétiques contenant la séquence RGD sont capables d'inhiber spécifiquement et de façon compétitive (2) la fixation de la fibronectine aux plaquettes sanguines et aux fibroblastes, les plus puissants étant le RGDS et le GRGDS. Afin d'évaluer la spécificité de l'inhibiteur, des substitutions d'acides aminés ont été effectuées; il apparaît que la modification d'un seul acide aminé perturbe l'inhibition. Seule Ser peut être substituée par Ala sans modification de l'activité inhibitrice. De telles constatations montrent que les cellules sont capables de reconnaître spécifiquement une très petite région de la structure de la fibronectine.

Cette inhibition requiert cependant des quantités importantes de peptide en solution car l'affinité de la fibronectine pour les sites récepteurs est supérieure à celle des peptides (2).

La fibronectine contenue dans le pool 3 s'adsorbe sur la surface des MS-Eth de traitement ou de test. Si cette fixation s'effectue par l'intermédiaire de la séquence RGDS, elle devrait pouvoir être inhibée par le peptide libre en solution.

3.1.2. Inhibition.

Deux peptides sont testés:

- Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS): n°H-1155 (Bachem); 5 mg; MM = 433.4 Da.
- Gly-Arg-Gly-Asp-Ser (GRGDS): n°H-1345 (Bachem); 5 mg; MM = 571.6 Da.

Le RGDS est repris par 1 ml d'acide acétique, le GRGDS par 1 ml d'eau distillée. Ces deux préparations constituent les solutions mères à partir desquelles seront effectuées les dilutions.

3.1.2.1. Protocole.

Le pool 3 non traité, dilué au 1/2 dans un milieu dépourvu de PEG, déstabilise les MS-Eth (les mêmes que celles utilisées lors du traitement). L'expérimentation consistera à ajouter à ce milieu des concentrations croissantes de peptide en solution, en maintenant constantes les concentrations de fibronectine (6.3 µg/ml), apportée par le pool 3 non traité, et de MS-Eth, introduites à la même dilution (1/700) que lors des précédents tests de déstabilisation.

Une vérification préalable montre que le peptide GRGDS, quelque soit sa concentration, ne déstabilise pas les MS. En revanche, le peptide RGDS, conservé en milieu acide, déstabilise les MS-Eth pour des dilutions finales inférieures au 1/800, soit pour plus de 6 µg/ml de peptide dans la cuve.

La mise en réaction s'effectue selon le protocole suivant:

- Dans une première étape, à 150 µl de pool 3 sont additionnés 30 µl d'une gamme de concentrations de peptide RGDS (0.098 µg/ml à 3.125 µg/ml final) ou GRGDS (1.30 µg/ml à 83.30 µg/ml final).
- 30 µl de MS-Eth sont distribués dans chaque cuve, sans incubation préalable du pool 3 et des dilutions de peptide. Le mélange final est amené à 300 µl par addition de PBS.

La figure 79 illustre les courbes d'inhibition obtenues 3 min 45 s après l'addition des MS-Eth:

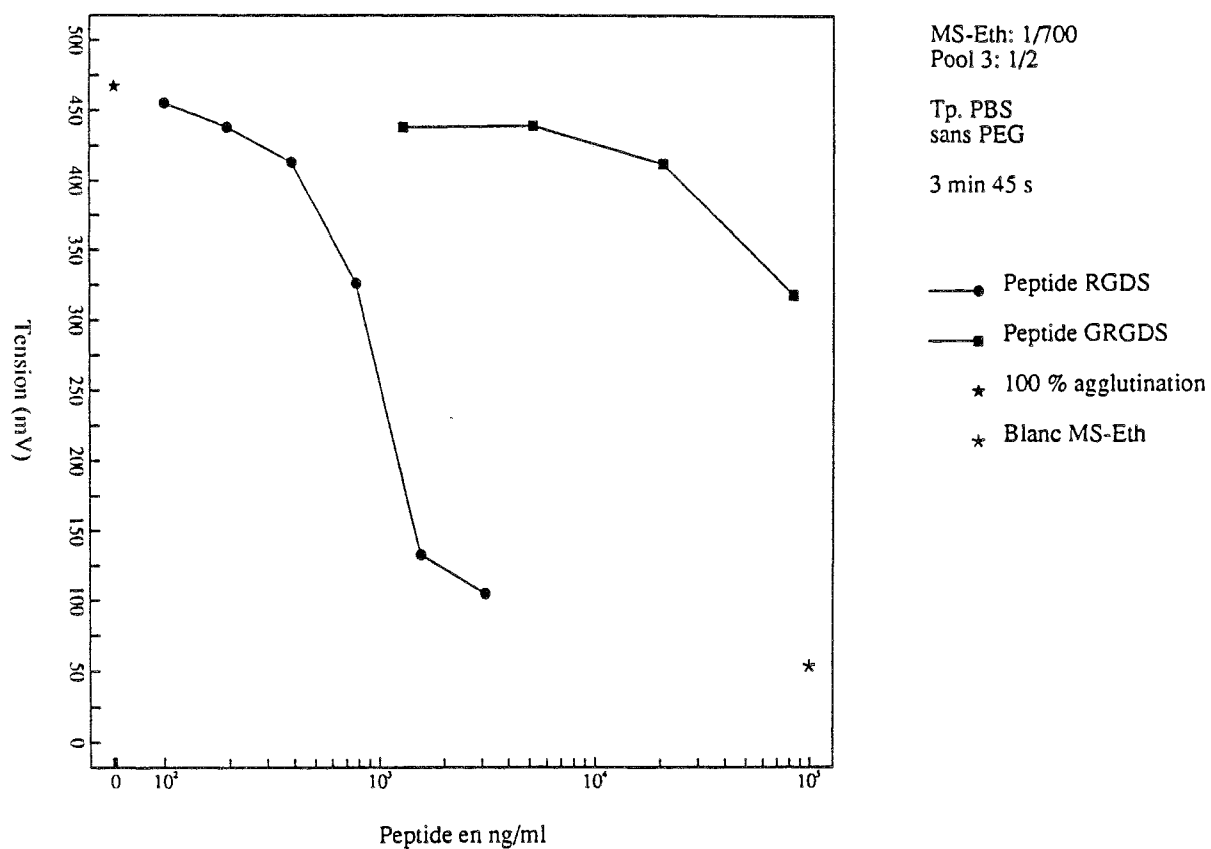
- Le peptide RGDS inhibe la réaction de déstabilisation des MS-Eth par le pool 3, et ce d'autant plus que sa concentration est plus élevée. Il persiste cependant 12% d'agglutination résiduelle. Les quantités de peptide nécessaires pour obtenir une inhibition presque totale sont très importantes (il existe un facteur de 515 entre le nombre de molécules de RGDS et celui de fibronectine présente).
- Le peptide GRGDS inhibe également la réaction de déstabilisation, mais les concentrations de peptide à mettre en oeuvre sont plus élevées que pour le peptide RGDS. Pour atteindre 30% d'inhibition, il faut 0.15 µg/ml de peptide RGDS et 40 µg/ml de GRGDS.

Le peptide RGDS est donc plus efficace à l'inhibition que le GRGDS; bien que ne différant que par un acide aminé, ces deux peptides se comportent tout à fait différemment dans le système d'inhibition, ce qui démontre la spécificité de la fixation de la fibronectine sur les MS-Eth.

Les pouvoirs inhibants relatifs de ces peptides sont appréciés diversement dans la littérature, les résultats variant selon le système étudié; ainsi le GRGDS est plus actif que le RGDS lorsque l'étude est réalisée sur des cellules fibroblastiques (164) alors que dans le système plaquettaire, les deux peptides ne diffèrent pas significativement (60).

En conclusion, nos résultats tendent à confirmer que lors du traitement du pool 3, la fibronectine se fixe aux MS-Eth par l'intermédiaire du fragment RGDS. Le processus de fixation semble être proche de celui constaté au niveau cellulaire. Nous avons constaté précédemment qu'un seul traitement ne suffisait pas pour éliminer totalement la fibronectine, ou que les MS de traitement devaient être utilisées concentrées (cf. Ch.II.2.2.2.2.). Ce mode de fixation de la fibronectine par le biais d'une infime partie de la molécule aux MS de

Figure 79 Inhibition de la déstabilisation MS-Eth/pool 3 non traité par les peptides RGDS et GRGDS



traitement implique en effet que la surface offerte par les MS soit suffisamment importante et accessible pour permettre une fixation maximale.

La même séquence RGD a été trouvée dans la chaîne α du fibrinogène (117), dans la protéine S (65) (cette protéine intervient au stade terminal des réactions du complément en inhibant la formation du complexe lytique), et dans le C3 (30). Cette dernière protéine est également affectée par le traitement mais nous n'avons pas étudié l'éventualité d'une fixation du C3 par ce peptide sur les MS de traitement.

3.2. C1q et IgG.

Nous avons précédemment établi une corrélation significative entre la concentration en IgG présente dans les sérums non traités et celle résiduelle de C1q après traitement.

Nous avons donc recherché si ces deux protéines interagissaient sur les MS de traitement en liaison ou de façon indépendante.

Puis nous avons étudié plus particulièrement l'interaction du C1q avec les MS de traitement.

3.2.1. Etude des IgG et du C1q.

Les expériences ont été réalisées sur des préparations purifiées d'IgG et de C1q:

- C1q: solution de C1q préparée à partir de sérums humains, concentration de 246 U.I./ml.
- IgG: préparations n°8 et 10 doublement purifiées sur colonnes Trisacryl GF-05 (IBF) et DEAE Trisacryl M (IBF); concentration de 8.6 g/l déterminée par néphélométrie classique.

Ces deux solutions sont utilisées sans dilution préalable.

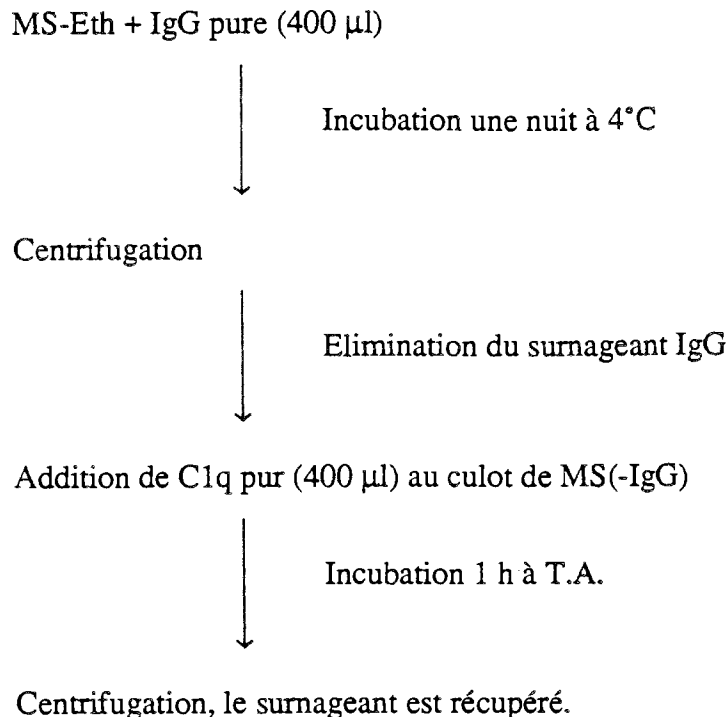
3.2.1.1. Essais réalisés.

Les protocoles de traitement sont identiques à ceux décrits précédemment. Les essais suivants sont réalisés:

- Traitement de la solution d'IgG pure,
- Traitement de la solution de C1q pure:

Chaque manipulation comprend un témoin non traité. Les protéines résiduelles sont dosées par néphélométrie classique dans les surnageants de traitement. Ces deux essais ont un double but. D'une part, nous nous assurons que le comportement des solutions purifiées de C1q ou d'IgG vis-à-vis des MS de traitement est identique à celui de ces mêmes protéines en sérum entier, c'est à dire que leurs concentrations respectives chutent à la suite du traitement. D'autre part, les valeurs des concentrations obtenues constituent les témoins des essais suivants.

- Traitement d'un mélange C1q + IgG: les deux solutions purifiées sont mélangées à volume égal, puis traitées. Un témoin non traité est inclus. L'objectif est ici d'étudier l'incidence du mélange des deux protéines sur l'efficacité du traitement afin de déceler une éventuelle compétition vis-à-vis des MS-Eth.
- Deux traitements séquentiels sont effectués, selon le schéma suivant:



La concentration résiduelle en C1q est dosée dans le surnageant.

Il s'agit ici d'étudier l'incidence de l'adsorption préalable des IgG sur la capture du C1q par les MS-Eth et de rechercher une éventuelle hiérarchie dans la fixation des deux protéines.

3.2.1.2. Résultats des dosages.

Les résultats des dosages des trois premières expériences seront d'abord exposés pour chaque protéine. Puis ceux relatifs au 4^{ème} essai seront décrits.

3.2.1.2.1. IgG.

Le tableau ci-dessous regroupe les concentrations détectées:

Concentration en IgG des surnageants NT et T.

	Concentration IgG (g/l)	Concentration résiduelle (%)
IgG NT	8.64	100
IgG T	8.18	94.7
(IgG+C1q) NT	8.49	98.2
(IgG+C1q) T	7.91	91.5

La concentration de la solution purifiée d'IgG chute après traitement dans des proportions identiques à celles observées sur les sérums individuels.

La chute de concentration est identique lorsque la solution d'IgG est mélangée à celle de C1q. La présence de C1q ne perturbe donc pas la fixation des IgG sur les MS de traitement.

3.2.1.2.2. C1q.

Les résultats sont portés dans le tableau ci-dessous:

Concentration en C1q des surnageants NT et T.

	Concentration IgG (U.I./ml)	Concentration résiduelle (%)
C1q NT	291	100
C1q T	119	41
(IgG+C1q) NT	308	105
(IgG+C1q) T	118	40.5

A la suite du traitement, la concentration résiduelle de la solution purifiée de C1q est inférieure à celle observée pour les sérums individuels.

De même que nous l'avons observé pour les IgG en présence de C1q, la présence des IgG n'affecte pas la chute de concentration du C1q, qui est identique dans le mélange IgG + C1q et dans la solution pure de C1q.

3.2.1.2.3. Effets des traitements successifs.

Une concentration résiduelle de 117 U.I./ml est mesurée dans le surnageant de la solution de C1q traitée par des MS ayant servi au préalable au traitement d'une solution d'IgG (MS(-IgG)). Cela correspond à 40% de la concentration originelle.

Cette concentration résiduelle en C1q est identique à celle observée dans la manipulation précédente. Des MS-Eth incubées une nuit dans la solution d'IgG, puis lavées, fixent donc autant de C1q que des MS-Eth nues. Les fixations des IgG et du C1q semblent donc tout à fait indépendantes l'une de l'autre et l'on ne démontre pas de compétition entre elles dans nos conditions expérimentales.

En conclusion, ces résultats confirment que:

- Les IgG se fixent en faible proportion sur les MS de traitement.
- La fixation de C1q sur les MS n'est pas la conséquence d'une préfixation d'IgG, puisque la pré-incubation d'une nuit des MS-Eth en présence d'IgG ne modifie pas la concentration résiduelle de C1q.

3.2.2. C1q.

L'étude de 35 sérums individuels nous avait permis de constater que les signaux de déstabilisation après traitement corrélaient significativement avec les concentrations résiduelles de C1q après traitement.

Nous avons repris l'étude des 10 sérums présentant les plus forts signaux de déstabilisation après traitement (et des concentrations résiduelles de C1q importantes), ainsi que celle du sérum entier.

Deux séries d'expériences sont réalisées avec les sérums individuels:

- Les effets de deux traitements successifs sur, d'une part, les signaux de déstabilisation résiduelle des sérums et sur, d'autre part, les concentrations résiduelles de C1q sont recherchés dans le but d'évaluer l'efficacité de traitements séquentiels sur ces deux paramètres.
- Des surcharges fixes de C1q sont introduites dans chaque sérum traité deux fois. Le pouvoir déstabilisant de ces sérums surchargés est ensuite testé sur les MS-Eth. Cela devrait permettre de confirmer l'incidence de la concentration résiduelle de C1q sur le pouvoir déstabilisant résiduel des sérums, phénomène suggéré par les corrélations tirées des études précédentes.

La même démarche est reprise pour le sérum entier, mais des surcharges variables de C1q seront ajoutées.

3.2.2.1. Travail sur les sérums individuels.

3.2.2.1.1. Résultats des dosages de C1q après des traitements successifs.

3.2.2.1.1.1 Protocole.

Les sérums étudiés portent les n°3, 7, 9, 12, 18, 23, 24, 31, 33 et 34. La démarche expérimentale est résumée dans le schéma ci-dessous:

MS-Eth + sérum



Traitement 1

Culot de MS éliminé + surnageant 1

→ Tests de déstabilisation en présence des MS-Eth.

→ Dosage de C1q résiduel.

MS-Eth + surnageant 1



Traitement 2

Culot de MS éliminé + surnageant 2

→ Tests de déstabilisation en présence des MS-Eth.

→ Dosage de C1q résiduel.

3.2.2.1.1.2 Résultats.

Les valeurs des signaux de déstabilisation obtenus en 15 min et des dosages de C1q sont portés dans le tableau ci-dessous:

Déstabilisations et concentrations en C1q de 10 sérums traités 2 fois.

	Avant traitement		Après 1 traitement		Après 2 traitements	
N°sérum	Dést. (mV)	C1q (U.I./ml)	Dést. (mV)	C1q (U.I./ml)	Dést. (mV)	C1q (U.I./ml)
3	446.6	89.0	74.8	13.5	72.0	4.6
7	460.8	98.2	113.5	16.6	120.0	< 3.6
9	345.1	114.0	102.0	39.6	88.9	10.5
12	370.7	98.5	73.3	20.6	63.6	< 3.6
18	418.9	115.9	98.1	15.8	109.6	< 3.6
23	406.6	102.2	79.2	7.9	75.0	< 3.6
24	453.9	120.2	100.8	23.8	78.2	< 3.6
31	357.6	86.0	174.7	32.8	132.3	6.3
33	498.6	114.4	451.3	63.9	72.6	5.4
34	471.6	87.8	78.1	17.9	68.3	< 3.6
Moy.	423.0	102.6	134.5	25.2	87.9	4.8
SD	52.2	12.8	115.0	16.5	23.9	2.2

. Concentrations de C1q:

Comme nous l'avions déjà constaté, les concentrations résiduelles de C1q chutent (de 76% en moyenne) à la suite du 1^{er} traitement. Après le 2^{ème} traitement, la concentration moyenne chute de nouveau, 8 sérums se trouvent en limite inférieure de la gamme d'étalonnage. Le pourcentage moyen de récupération de C1q est inférieur à 4.71%. Nous confirmons l'affinité du C1q pour les MS-Eth. Deux traitements suffisent pour éliminer la quasi-totalité du C1q présent dans les sérums.

. Déstabilisations:

Après le 1^{er} traitement, la valeur moyenne des signaux de déstabilisation résiduelle est de 134 mV pour l'ensemble des sérums. Certains sérums (les 31 et 33 notamment) déstabilisent encore les MS-Eth. Les signaux de déstabilisation résiduelle des autres sérums sont faibles. Le 2^{ème} traitement permet de réduire les signaux de déstabilisation résiduelle des sérums 31 et 33. La moyenne des signaux est abaissée à 88 mV ce qui correspond au blanc MS-Eth.

. Corrélation entre déstabilisations et concentrations en C1q:

Après le 1^{er} traitement, nous retrouvons une concordance significative ($r = 0,879$; $p < 0.001$) entre les signaux de déstabilisation et les concentrations résiduelles de C1q. Le calcul est impossible pour les concentrations de C1q du 2^{ème} traitement, le nombre de points hors-gamme étant important.

3.2.2.1.2. Résultats des surcharges.

Chacun des 10 sérums traités deux fois et peu déstabilisants après ces deux traitements (résultats précédents) est surchargé de C1q purifié à une concentration approximativement équivalente à celle qui subsistait après le 1^{er} traitement.

Les signaux de déstabilisation de ces sérums surchargés et leurs taux de C1q sont portés dans le tableau ci-dessous:

Déstabilisations et concentrations en C1q des 10 sérums traités 2 fois et surchargés.

N°sérum	Concentration (U.I./ml)	Déstabilisation 3 min 45 s (mV)
3	36.5	464
7	30.7	456
9	56.7	485
12	30.7	494
18	28	490
23	22.1	379
24	32.2	458
31	47	497
33	60.8	506
34	30.2	469

Les 10 sérums traités et surchargés de C1q déstabilisent à nouveau les MS-Eth (moyenne de 469 mV). En 3 min 45 s, les signaux sont aussi élevés que ceux obtenus en 15 min avec les sérums non traités (portés dans le tableau de la page précédente).

Les signaux de déstabilisation corréleront significativement ($r = 0,615$; $0.05 < p < 0.1$) avec la quantité de C1q mesurée.

Nous confirmons bien que les signaux de déstabilisation sont liés pour une part à la quantité de C1q présente dans les sérums. Cette protéine intervient comme l'une des causes premières de la déstabilisation.

3.2.2.2. Travail sur le sérum entier.

Comme pour les 10 sérums précédents, le sérum entier est soumis à deux traitements consécutifs, les concentrations en C1q et les déstabilisations résiduelles sont déterminées.

Puis des surcharges croissantes en C1q sont introduites dans le sérum entier traité deux fois. Les déstabilisations et concentrations de C1q sont à nouveau mesurées après surcharges.

Les résultats sont résumés dans le tableau ci-dessous:

Déstabilisations et concentrations en C1q du sérum entier traité 2 fois et surchargé.

	Concentration (U.I./ml)	Déstabilisation 3 min 45 s (mV)
Sérum entier non traité	70.3	369
Sérum entier traité 1 fois	12.8	110
Sérum entier traité 2 fois	12.7	118

Surcharges C1q (U.I./ml)	Concentration (U.I./ml)	Déstabilisation 3 min 45 s (mV)
1	12.8	124
2	13.8	131
4	19.2	208
8	29.1	495
16	43.3	534
32	63.5	543
64	102.5	572

La concentration résiduelle de C1q et la déstabilisation résiduelle ne varient pas entre les deux traitements du sérum entier, un seul traitement suffit pour éliminer 83% de la concentration originelle.

Le sérum entier traité deux fois contient 12.7 U.I./ml de C1q.

La figure 80 représente les signaux de déstabilisation observés en fonction de la concentration mesurée de C1q; elle comporte également les valeurs observées précédemment (tableau 3) pour les 35 sérums individuels après un traitement.

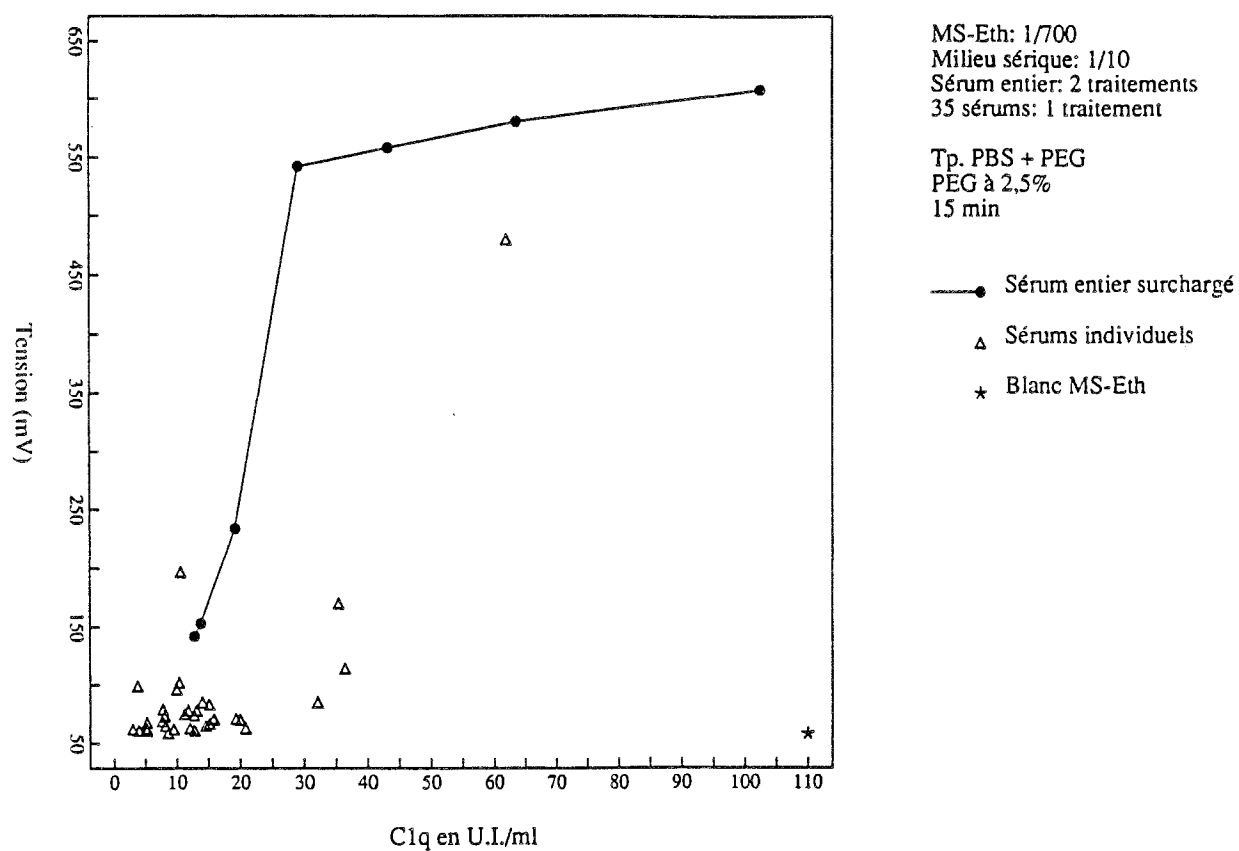
Nous constatons que:

- Pour le sérum entier, la déstabilisation est directement fonction de la concentration de C1q présente jusqu'à environ 30 U.I./ml. Au-delà, les signaux de déstabilisation augmentent de façon moins importante.
- L'ensemble des 35 sérums décrit le même profil mais décalé vers de plus fortes concentrations en C1q.

3.3. Conclusions.

La fibronectine se fixerait sur les MS-Eth par un mécanisme identique à celui responsable de l'adhésion cellulaire de cette molécule (particulièrement dans les systèmes

Figure 80 Déstabilisation résiduelle des MS-Eth par le sérum entier traité surchargé en C1q
Déstabilisation résiduelle des MS-Eth par 35 sérums individuels traités



plaquettaire et fibroblastique); cette fixation fait intervenir un petit peptide de 4 acides aminés, le RGDS.

Seule une partie des IgG semble se fixer sur les MS de traitement; toutes les IgG ne sont donc pas impliquées. La raison de cette fixation partielle et préférentielle d'une partie des IgG reste à être élucidée.

Les composants du complément, dont C3, C3 PA et C1q s'adsorbent sur les MS. C1q participe activement à la déstabilisation des MS-Eth par les sérums humains. Cette protéine se fixe sur les MS indépendamment de la fixation des IgG.

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE.

Deux groupes de conclusions se dégagent de ce travail, les unes étant d'ordre pratique, les autres plus fondamentales.

1. Sur un plan pratique.

Les besoins actuels de méthodes de dosages sensibles et spécifiques de marqueurs de nécrose myocardique, moins contraignantes que la technique radioimmunologique, nous ont conduits à adopter la technique d'immunonéphélométrie à supports microparticulaires. Notre objectif premier consistait à la mise au point de dosages sensibles de la myoglobine et de la myosine sériques.

La technique d'immunonéphélométrie à supports microparticulaires a prouvé sa grande souplesse d'adaptation, dans la mesure où nous avons pu l'appliquer au dosage de deux molécules d'origine musculaire aussi fondamentalement différentes (de par leurs natures chimiques et leurs masses moléculaires) que la myosine et la myoglobine.

Dans notre système d'inhibition, les résultats du dosage de la myoglobine en milieu sérique concentré peuvent être obtenus en 15 min, si l'on excepte la période de prétraitement des sérums. Contrairement aux méthodes immunoenzymatiques et immunoradiologiques, l'immunonéphélométrie se présente comme une méthode rapide et simple à mettre en oeuvre. Le test de détection sur lame est certes plus rapide mais il présente l'inconvénient de ne pas quantifier des résultats dont la reproductibilité ne nous est pas apparue satisfaisante, variant d'un lot de réactifs à l'autre.

La principale difficulté rencontrée lors des dosages en milieu sérique concentré est la présence de composés interférents déstabilisant les réactifs microparticulaires. Nous avons pu mettre au point un traitement éliminant ces substances indésirables des sérums sans affecter leurs concentrations en myoglobine. Il est ainsi permis d'envisager des dosages en milieu sérique concentré. Ce prétraitement des échantillons biologiques peut se faire selon deux modalités:

- soit les substances interférentes sériques sont éliminées du milieu réactionnel en séparant par une simple centrifugation les MS de traitement qui les ont adsorbées;
- soit les substances interférentes restent piégées sur des MS de traitement de faible diamètre directement introduites dans les cuves de réaction, ce qui évite l'étape de séparation.

Les conditions d'utilisation de ce prétraitement sont précises quant à la nature de la phase solide employée. Il faut souligner que la composition chimique des MS, ainsi que leur concentration, influe sur l'efficacité du traitement; des MS en polystyrène se sont en effet révélées inopérantes.

Le domaine d'application de ce type de prétraitement des milieux biologiques pourrait vraisemblablement être étendu au dosage de nombreuses autres protéines sériques en milieu concentré, indépendamment du système immunologique employé: ce traitement se révèle en effet aussi efficace pour éliminer les agents qui interfèrent sur les MS-Ag que ceux qui déstabilisent les MS-Ac.

Notre travail permet donc d'envisager un dosage par immunonéphélométrie à supports microparticulaires de la myoglobine contenue dans des sérums infarctiques, non seulement dans un contexte d'urgence mais aussi lors du suivi thérapeutique de cicatrisation d'un

infarctus myocardique. Les résultats issus de l'étude de sérums pathologiques corrélerent en effet avec le tableau clinique des patients concernés.

2. Sur un plan fondamental.

Les conséquences avantageuses apportées par la perte de la déstabilisation à la suite du traitement du sérum nous ont incité à entreprendre une étude sur les mécanismes mis en jeu lors de cette procédure.

Nous avons identifié la nature d'une partie des substances déstabilisantes en étudiant les surnageants de milieux sériques traités par une suspension de MS de diamètre important afin de pouvoir les séparer facilement de l'échantillon sérique. L'analyse a été menée sous deux aspects, l'un qualitatif, l'autre quantitatif.

Les études qualitatives nous ont permis de dresser un catalogue des propriétés de ces substances dans des pools de fractions issues de sérum entier: ainsi nous n'avons pas observé de relation entre les MM, les charges des protéines et l'effet déstabilisant de ces dernières sur les MS. La concentration des protéines interférentes module l'importance de la déstabilisation, mais ce ne sont pas les protéines sériques les plus concentrées qui jouent le rôle le plus important dans la déstabilisation des MS.

Les analyses quantitatives menées sur les pools, sur le sérum entier puis finalement sur une série de sérums individuels ont abouti à l'établissement d'une liste, sans doute non exhaustive, de protéines déstabilisantes. Nous aurions pu craindre des discordances entre les résultats obtenus sur les pools de fractions sériques, ceux obtenus sur le sérum entier, et ceux acquis sur les différents sérums individuels. En fait, ces résultats se sont avérés cohérents et, en raison du nombre important de sérums individuels étudiés, il apparaît que les protéines interférentes se comportent de façon identique vis-à-vis des MS de traitement quelque soit le sérum humain considéré.

Les protéines responsables directement ou indirectement de la déstabilisation des MS sont la fibronectine, les IgG, et des composants du complément dont C1q, C3c et C3PA, ou facteur B. Il est probable que d'autres substances interviennent, notamment d'autres composés du complément, dont on sait qu'ils interagissent par des réactions en cascade.

Seul le mode de fixation de la fibronectine aux MS a été élucidé. La liaison s'effectue par le biais d'un court peptide de 4 aminoacides.

C1q, proportionnellement à la quantité présente dans le sérum, constitue l'élément qui s'adsorbe le plus aux MS.

L'épuration de la fibronectine et du C1q est proportionnelle au nombre des MS, ce qui permet de les éliminer totalement par un traitement adéquat.

En revanche le mécanisme de fixation des IgG se particularise; une partie seulement des IgG, sans doute caractérisée par des propriétés physico-chimiques particulières, s'adsorbe sur les MS. La voie est ouverte pour de nouvelles investigations en vue de comprendre ce phénomène aux conséquences importantes en immunochimie. Quelle serait l'incidence sur l'efficacité du traitement de la déglycosylation des IgG, de leur fractionnement en fonction de critères physico-chimiques, ou de leur dénaturation?

Lorsque l'ensemble des phénomènes se produisant à la surface des MS sera expliqué, le traitement idéal à mettre en oeuvre pour éliminer les agents déstabilisants pourra être appréhendé, en synthétisant par exemple de petites MS ou un réactif adsorbant ayant une très forte avidité pour les substances à épurer. Ainsi les problèmes liés à l'interaction de ces composés sériques avec les phases solides lors des immunodosages, actuellement contournés par l'addition de substances saturant les sites libres de ces matrices, seront maîtrisés.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE.

1. ADAMS E.C., ELLIOTT T.A.
Urinary myoglobin in myocardial infarction.
J. Am. Med. Ass., 1970, 211, 1013-1014.
2. AKIYAMA S.K., YAMADA K.M.
Synthetic peptides competitively inhibit both direct binding to fibroblasts and functional biological assays for the purified cell-binding domain of fibronectin.
J. Biol. Chem., 1985, 260, 10402-10405.
3. ATASSI M.Z.
Preparation of monoclonal antibodies to preselected protein regions.
Methods Enzymol., 1986, 121, 69-95.
4. AWDEH Z.L., WILLIAMSON A.R., ASKONAS B.A.
Isoelectric focusing in polyacrylamide gel and its application to immunoglobulins.
Nature, 1968, 219, 66-67.
5. BAZIN H.
Hybridomes et anticorps monoclonaux.
Biofutur, 1986, 44, 15-17.
6. BERNSTEIN S.H., SARANCHAK H.
Myoglobinuria; a diagnostic test for acute myocardial infarction.
Circulation (abstract), 1973, supp.IV, VII-VIII, IV-39.
7. BERZOFSKY J.A., BUCKENMEYER G.K., HICKS G., KILLION D.J., BERKOWER I., KOHNO Y., FLANAGAN M.A., BUSCH M.R., FELDMANN R.J., MINNA J., GURD F.R.N.
Topographic antigenic determinants detected by monoclonal antibodies to myoglobin.
Protein Conformation as an Immunological Signal, Plenum Press, 1983, 165-180.
8. BESSOU T.
Immunonéphélométrie à supports microparticulaires. Application aux dosages biologiques.
Th. Docteur Ingénieur, Nancy I, 1985.
9. BIEVA C., BERNARD R., PUTZEYS G., DE MARNEFFE M., VAN STEIRTEGHEM A., VAN THIEL E., SMETS P.
Sensibilité et spécificité de la myoglobulinémie dans l'infarctus aigu du myocarde.
Ann. Cardiol. Angéiol., 1980, 29, 303-307.
10. BOISSON-VIDAL C., JOZEFONVICZ J., BRASH J.L.
Interactions of proteins in human plasma with modified polystyrene resins.
J. Biomed. Mater. Res., 1991, 25, 67-84.
11. BOLTON A.E., HUNTER W.M.
The labelling of proteins to high specific radioactivities by conjugation to a ¹²⁵I-containing acylating agent.
Biochem. J., 1973, 133, 529.
12. BORQUE L., RUS A., RUIZ R.
Quantitative automated latex nephelometric immunoassay for determination of myoglobin in human serum.
J. Clin. Lab. Analysis, 1991, 5, 175-179.

13. BOSADJIEV L.G., BINEVA I.
L'électrophorèse en acrylamide-gel et la filtration en gel comme méthodes d'analyse des dérivés protéiniques du sérum.
Develop. biol. Standard., 1974, 27, 43-48.
14. BOSCATO L.M., STUART M.C.
Incidence and specificity of interference in two-site immunoassays.
Clin. Chem., 1986, 32, 1491-1495.
15. BOUDOU Ph., FIET J., LAUREAUX C., PATRICOT M.C., GUEZENNEC C.Y., FOGLIETTI M.J., VILLETTE J.M., FRIEMEL F., HAAG J.C.
Variations de quelques constituants plasmatiques et urinaires chez les marathoniens.
Ann. Biol. Clin., 1987, 45, 37-45.
16. BOUGET J., DAUBERT J.C., CATHELINE M., BEAUVERGER Y., BESSON C., LE GALL J.Y., GOUFFAULT J.
Intérêt de la myoglobine sérique dans l'infarctus du myocarde aigu.
Arch. Mal. Coeur, 1981, 74, 1205-1215.
17. BOULANGER P., POLONOVSKI J., TAYEAU F., MANDEL P., BISERTE G.
Biochimie médicale, Fascicule III.
Masson et Cie, Huitième édition, 1971.
18. BOUVAGNET P., LEGER J., PONS F., DECHESNE C., LEGER J.J.
Fibre types and myosin types in human atrial and ventricular myocardium.
Cir. Res., 1984, 55, 794-804.
19. BOUVAGNET P., LEGER J., DECHESNE C.A., DUREAU G., ANOAL M., LEGER J.J.
Local changes in myosin types in diseased human atrial myocardium: a quantitative immunofluorescence study.
Circulation, 1985, 72, 272-279.
20. BRASH J.L., SCOTT C.F., TEN HOVE P., WOJCIECHOWSKI P., COLMAN R.W.
Mechanism of transient adsorption of fibrinogen from plasma to solid surfaces: role of the contact and fibrinolytic systems.
Blood, 1988, 71, 932-939.
21. BURNET F.M.
The clonal selection theory of acquired immunity.
University Press, Cambridge, 1959.
22. CATHELINE M., BOUGET J., AUBREE A., DAUBERT C., GOUFFAULT J., LE GALL J.Y.
Etude de la myoglobulinémie et de son évolution au cours de l'infarctus du myocarde.
Clin. Chim. Acta, 1980, 105, 311-315.
23. CHAPELLE J.P., HEUSGHEM C.
Semi-quantitative estimation of serum myoglobin by a rapid latex agglutination method: an emergency screening test for acute myocardial infarction.
Clin. Chim. Acta, 1985, 145, 143-150.
24. CHAPELLE J.P.
Early detection and therapy follow-up of acute myocardial infarction by myoglobin measurement.
Behring workshop, 8th European Congress of Clinical Chemistry, 1989, 18-33.

25. CIRET P., CLAUDEL J.P., PAYEN E.
Dosage rapide et automatisé des protéines spécifiques par néphélémétrie laser.
XXVIII^{es} journées nationales de l'A.P.D.I.L.A., Conférences et Ateliers Behring, 1983, 32-47.
26. CLOONAN M.J., BISHOP G.A., WILSON-SMITH P.D., CARTER J.W., ALLAN R.M., WILCKEN D.E.L.
An enzyme-immunoassay for myoglobin in human serum and urine. Method development, normal values and application to myocardial infarction.
Pathology, 1979, 11, 689-699.
27. COHEN J.H.M., REVILLARD J.P.
Hybridation lymphocytaire. Evolution et limites des techniques.
Biofutur, 1986, 44, 19-22.
28. COLLARD-BOVY C.
Dosage des protéines du lait par immunonéphélémétrie sur supports microparticulaires. Mise au point des applications.
Th. Doctorat de l'Université de Nancy I., 1988.
29. CUILIERE M.L., MONTAGNE P., BESSOU T., EL OMARI R., RIOCHET D., VARCIN P., LAROCHE P., PRUD'HOMME P., MARCHAND J., FLECHEUX O., PAU B., DUHEILLE J.
Microparticle-enhanced nephelometric immunoassay (Nephelia®) for immunoglobulins G, A, and M.
Clin. Chem., 1991, 37, 20-25.
30. DE BRUIJN M.H.L., FEY G.H.
Human complement component C3: cDNA coding sequence and derived primary structure.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1985, 82, 708-712.
31. DECHESNE C.A., BOUVAGNET P., WALZTHONY D., LEGER J.J.
Visualization of cardiac ventricular myosin heavy chain homodimers and heterodimers by monoclonal antibody epitope mapping.
J. Cell Biol., 1987, 105, 3031-3037.
32. DELAGNEAU J.F., RIOCHET D.
L'immunonéphélémétrie sur supports microparticulaires. Une méthode d'avenir pour les dosages immunologiques.
Laborama, Diagnostics Pasteur, 1985, n°22, 3-7.
33. DONALD T.G., CLOONAN M.J., NEALE C., WILCKEN D.E.L.
Excretion of myoglobin in urine after acute myocardial infarction.
Br. Heart J., 1977, 39, 29-34.
34. DREXEL H., DWORZAK E., KIRCHMAIR W., MILZ M.M., PUSCHENDORF B., DIENSTL F.
Myoglobinemia in the early phase of acute myocardial infarction.
Am. Heart J., 1983, 105, 642-651.
35. DUFOUR D.R., LAGRENADE A., GUERRA J.
Rapid serial enzyme measurements in evaluation of patients with suspected myocardial infarction.
Am. J. Cardiol., 1988, 63, 652-655.

36. DUHEILLE J., PAU B., GROS P.
Réactif permettant un dosage de très haute sensibilité de l'antigène caractéristique du virus de l'hépatite B dans les liquides biologiques humains.
Brevet européen EPO 0104101 B1.
37. DURAND H., BICLET P.
Dictionnaire des examens biologiques et investigations paracliniques.
Nouvelle édition année 1988, Doin Editeurs.
38. EL BARI N.
Etude de l'antigénicité de la caséine bêta et de ses produits de dégradation. Mise au point du dosage de la caséine bêta dans le lait par immunonéphélométrie sur supports microparticulaires.
Th. Doctorat de l'Université de Nancy I., 1989.
39. EL OMARI R.
Immunonéphélométrie sur supports microparticulaires. Modélisation de systèmes de dosage.
Th. Doctorat de l'Université de Nancy I., 1989.
40. EVERETT A.W., CLARK W.A., CHIZZONITE R.A., ZAK R.
Change in synthesis rates of α - and β -myosin heavy chains rabbit heart after treatment with thyroid hormone.
J. Biol. Chem., 1983, 258, 2421-2425.
41. FAHEY J.L., TERRY E.W.
Ion exchange chromatography and gel filtration.
Handbook of Experimental Immunology, Blackwell Scientific Publications, 3^{ème} édition, 1978, ch.8.
42. FEARON D.T., AUSTEN K.F.
Activation of the alternative complement pathway due to resistance of zymosan-bound amplification convertase to endogenous regulatory mechanisms.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1977, 74, 1683-1687.
43. FELGENHAUER K.
Quantitation and specific detection methods after disc electrophoresis of serum proteins.
Clin. Chim. Acta, 1970, 27, 305-312.
44. FIET J., LE RAPT J., LOUVARD Y., VILLETTE J.M., LAUREAUX C., CLAUDEL J.P., FOGLIETTI M.J., HAAG J.C.
Intérêt de la détection de la myoglobine par immunoagglutination au cours de l'infarctus du myocarde.
Path. Biol., 1985, 33, 861-864.
45. FIREMAN P., VANNIER W.E., GOODMAN H.
Immunochemical studies of human serum fractionated by gel filtration with Sephadex G-200.
Proc. Soc. exp. Biol. Med., 1964, 115, 845-849.
46. FLINK I.L., MORKIN E.
Evidence for a new cardiac myosin species in thyrotoxic rabbit.
FEBS Lett., 1977, 81, 391-394.
47. FLINK I.L., MORKIN E.
Sequence of the 20-kilodalton heavy chain peptide from the carboxyl-terminus of bovine cardiac subfragment-1.
J. Clin. Invest., 1984, 74, 639-646.

48. FLODIN P., KILLANDER J.
Fractionation of human serum by gel filtration.
Biochim. Biophys. Acta, 1962, 63, 403-410.
49. FONTAINE M., RIVAT C.
A study of the breakdown of the third component of human complement (C3).
Ann. Immunol. (Inst. Pasteur), 1979, 130 C, 349-366.
50. FREEMAN A.P., FATCHES K.R., CARTER I.W., CLOONAN M.J., WILCKEN D.E.L.
Comparison of serum myoglobin and creatine kinase MB isoenzyme in early diagnosis of acute myocardial infarction.
Br. Heart J., 1981, 45, 389-392.
51. GERSHONI J.M., PALADE G.E.
Protein blotting: principles and applications.
Anal. Biochem., 1983, 131, 1-5.
52. GILKESON G., STONE M.J., WATERMAN M., TING R., GOMEZ-SANCHEZ C.E., HULL A., WILLERSON J.T.
Detection of myoglobin by radioimmunoassay in human sera: its usefulness and limitations as an emergency room screening test for acute myocardial infarction.
Am. Heart J., 1978, 95, 70-77.
53. GLAIZAL S.
Intérêt du dosage de la myoglobine sérique au cours de l'infarctus du myocarde récent.
Th. Médecine, Lyon, 1988.
54. GOLDBERG R.J., CAMPBELL D.H.
The light scattering properties of an antigen-antibody reaction.
Immunology, 1951, 66, 74-88.
55. GRABAR P., WILLIAMS C.A.
Méthode permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et immunochimiques d'un mélange de protéines. Application au sérum humain.
Biochim. Biophys. Acta, 1953, 10, 193-194.
56. GRAND A., GLAIZAL S., CAUDIE C., SCHRIVE I., MATAS O., FICHTER P., SHIBLI H.
Intérêt du dosage de la myoglobine sérique au cours de l'infarctus myocardique récent.
Ann. Cardiol. Angéiol., 1990, 39, 137-142.
57. GRANGE J., ROCH A.M., QUASH G.A.
Nephelometric assay of antigens and antibodies with latex particles.
J. Immunol. Methods, 1977, 18, 214-224.
58. GRENADIER E., KEIDAR S., KAHANA L., ALPAN G., MARMUR A., PALANT A.
The roles of serum myoglobin, total CPK, and CK-MB isoenzyme in the acute phase of myocardial infarction.
Am. Heart J., 1983, 105, 408-416.
59. HARRINGTON W.F., RODGERS M.E.
Myosin.
Ann. Rev. Biochem., 1984, 53, 35-73.
60. HAVERSTICK D.M., COWAN J.F., YAMADA K.M., SANTORO S.A.
Inhibition of platelet adhesion to fibronectin, fibrinogen, and von Willebrand factor substrates by a synthetic tetrapeptide derived from the cell-binding domain of fibronectin.
Blood, 1985, 66, 946-952.

61. HEIDELBERGER M., KENDALL F.E.
The quantitative theory of the precipitation reaction I.
J. Exp. Med., 1935, 62, 467-481.
62. HEIDELBERGER M., KENDALL F.E.
The quantitative theory of the precipitation reaction II.
J. Exp. Med., 1935, 62, 697-720.
63. HOH J.F.Y., YEOH G.P.S., THOMAS M.A.W., HIGGINBOTTOM L.
Structural differences in the heavy chains of rat ventricular myosin isoenzymes.
FEBS Lett. 1979, 97, 330-334.
64. ISOBE M., NAGAI R., YAMAOHIDE K., NAKAOKA H., TAKAKU F., YAZAKI Y.
Quantification of myocardial infarct size after coronary reperfusion by serum cardiac myosin light chain II in conscious dogs.
Circ. Res., 1989, 65, 684-694.
65. JENNE D., STANLEY K.K.
Molecular cloning of S-protein, a link between complement, coagulation and cell-substrate adhesion.
The EMBO Journal, 1985, 4, 3153-3157.
66. JURONEN E.I., VIKMAA M.H., MIELSAAR A.-V.N.
Rapid, simple and sensitive antigen capture ELISA for the quantitation of myoglobin using monoclonal antibodies.
J. Immunol. Methods, 1988, 111, 109-115.
67. JUTZY R.V., NEVATT G.W., PALMER F.J., NELSON J.C.
Radioimmunoassay of serum myoglobin in acute myocardial infarction.
Am. J. Cardiol., 1975, 35, 147.
68. KAGEN L., SCHEIDT S., ROBERTS L., PORTER A., PAUL H.
Myoglobinemia following acute myocardial infarction.
Am. J. Med., 1975, 58, 177-182.
69. KAGEN L., SCHEIDT S., BUTT A.
Serum myoglobin in myocardial infarction: the "staccato phenomenon". Is acute myocardial infarction in man an intermittent event?
Am. J. Med., 1977, 62, 86-92.
70. KAGEN L., BUTT A.
Myoglobin binding in human serum.
Clin. Chem., 1977, 23, 1813-1818.
71. KATUS H.A., HURRELL J.G., MATSUEDA G.R., EHRLICH P., ZURAWSKI V.R., KHAW B., HABER E.
Increased specificity in human cardiac-myosin radioimmunoassay utilizing two monoclonal antibodies in a double sandwich assay.
Mol. Immunol., 1982, 19, 451-455.
72. KATUS H.A., YASUDA T., GOLD H.K., LEINBACH R.C., STRAUSS H.W., WAKSMONSKI C., HABER E., KHAW B.
Diagnosis of acute myocardial infarction by detection of circulating cardiac myosin light chains.
Am. J. Cardiol., 1984, 54, 964-970.
73. KAZATCHKINE M., NYDEGGER U., FEARON D.T.
La voie alterne du complément.
La nouvelle presse médicale, 1979, 8, 2187-2194.

74. KENDREW J.C., WATSON H.C., STRANDBERG B.E., DICKERSON R.E., PHILLIPS D.C., SHORE V.C.
The amino-acid sequence of sperm whale myoglobin. A partial determination by X-ray methods, and its correlation with chemical data.
Nature, 1961, 190, 666.
75. KLOCKE F.J., VISCO J.P., REICHLIN M.
Myoglobinemia as an index of myocardial infarction and/or ischemia.
Circulation (abstract), 1976, supp.II, 53-54, II-29.
76. KLOTZ C., SWYNGHEDAUW B., MENDES H., MAROTTE F., LEGER J.J.
Evidence for new forms of cardiac myosin heavy chains in mechanical heart overloading and in ageing.
Eur. J. Biochem., 1981, 115, 415-421.
77. KOCHWA S., LITWAK R.S., ROSENFELD E.
Blood elements at foreign surfaces: a biochemical approach to the study of the adsorptions of plasma proteins.
Ann. N. Y. Acad. Sci., 1977, 283, 37-49.
78. KOHLER G., MILSTEIN C.
Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity.
Nature, 1975, 256, 495-497.
79. KONO I., SAKURAI T., KABASHIMA T., YAMANE K., KASHIWAGI H.
Fibronectin binds to C1q: possible mechanisms for their co-precipitation in cryoglobulins from patients with systemic lupus.
Clin. exp. Immunol., 1983, 52, 305-310.
80. KOSKELO P., KEKKI M., WAGNER O.
Kinetic behavior of ¹³¹I labelled myoglobin in human being.
Clin. Chim. Acta, 1967, 226, 179.
81. KUTTER D.
Tests rapides dans le diagnostic clinique.
Librairie Maloine, 1977.
82. LAEMMLI U.K.
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature, 1970, 227, 680-685.
83. LAGRUE G.
Les myoglobinuries.
Presse Méd., 1989, 18, 604-605.
84. LAROCHE P.
Immunonéphélémétrie sur supports microparticulaires. Mise au point de dosages biologiques.
Th. Doctorat de l'Université de Nancy I, 1987.
85. LARUE C., CALZOLARI C., LAGRANGE M.C., HEINEN C., LEGER J., LEGER J.J., PAU B.
Intérêt du dosage de la myosine dans le diagnostic et le suivi de l'infarctus du myocarde.
Immunoanal. Biol. Spéc., 1989, 18, 49-54.
86. LAURENT P., FIGUEROA N., ZELLER H.
Néphélémétrie. Principes. Application à l'immunoprécipitation en milieu liquide.
Revue de l'Institut Pasteur de Lyon, 1980, 13, 153-179.

87. LEGER J.J., ELZINGA M.
Studies on cardiac myosin light chains: comparison of sequences of cardiac and skeletal myosin LC II.
Biochem. Biophys. Res. Comm., 1977, 74, 1390-1396.
88. LEGER J., BOUVAGNET P., PAU B., RONCUCCI R., LEGER J.J.
Levels of ventricular myosin fragments in human sera after myocardial infarction, determined with monoclonal antibodies to myosin heavy chains.
Eur. J. Clin. Invest., 1985, 15, 422-429.
89. LEGER J., CALZOLARI C., BRUGADA J., PUECH P., LEGER J.J.
Mesure de l'efficacité d'un traitement fibrinolytique par voie intraveineuse à la phase aiguë de l'infarctus du myocarde.
Arch. Mal. Coeur, 1987, 80, 1447-1452.
90. LENEGRE J., BLONDEAU M., BOURDARIAS J.P., GERBAUX A., HIMBERT J., MAURICE P.
Coeur et circulation.
Flammarion Médecine, 1973.
91. LEVINE R.S., ALTERMAN M., GUBNER R.S., ADAMS E.C.
Myoglobinuria in myocardial infarction.
Am. J. Med. Sci., 1971, 262, 179-183.
92. LEVY G.
Diagnostic biologique de l'infarctus du myocarde.
Presse Méd., 1987, 16, 1750-1754.
93. LICHTER P., UMEDA P.K., LEVIN J.E., VOSBERG H.
Partial characterization of the human β -myosin heavy-chain gene which is expressed in heart and skeletal muscle.
Eur. J. Biochem., 1986, 160, 419-426.
94. LOMPRES A.M., NADAL-GINARD B., MAHDAVI V.
Expression of the cardiac ventricular α - and β -myosin heavy chain genes is developmentally and hormonally regulated.
J. Biol. Chem., 1984, 259, 6437-6446.
95. LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L., RANDALL R.J.
Protein measurement with the folin phenol reagent.
J. Biol. Chem., 1951, 193, 265.
96. MAC COMB J.M., MAC MASTER E.A., MAC KENZIE G., ADGEY A.A.J.
Myoglobin and creatine kinase in acute myocardial infarction.
Br. Heart J., 1984, 51, 189-194.
97. MADDISON A., CRAIG A., YUSUF S., LOPEZ R., SLEIGHT P.
The role of serum myoglobin in the detection and measurement of myocardial infarction.
Clin. Chim. Acta, 1980, 106, 17-28.
98. MADHAVI V., PERIASAMY M., NADAL-GINARD B.
Molecular characterization of two myosin heavy chain genes expressed in the adult heart.
Nature, 1982, 297, 659-664.
99. MALAPRADE L.
Periodic acid oxydation.
Bull. Soc. Chim. France, 1928, 4, 683.

100. MALIN E.L., MAERKER G., STEVENSON B.C., SABATO W.
Separation and qualitative recovery of major proteins from a single sample of skeletal muscle.
Preparative Biochemistry, 1984, 14, 281-302.
101. MIE G.
Beiträge zur Optik trüber Medien, spezielle kolloidaler Metallösungen.
Ann. Phys., 1908, 25, 377.
102. MONTAGNE P., DUHEILLE J.
Augmentation de la sensibilité des dosages immunonéphélométriques. Application au titrage des auto-anticorps anti-thyroglobuline humaine.
1ère Journée du groupe d'Etudes sur les Applications du Laser Néphélémètre, Behring édit., Paris, 1978.
103. MONTAGNE P., CUILIERE M.L., DUHEILLE J.
Essais méthodologiques pour la recherche et le dosage par néphélémétrie des facteurs rhumatoïdes et des complexes immuns.
2ème Réunion du groupe d'Etudes Laser Behring, Bendor, Behring édit., Paris, 1979.
104. MONTAGNE P., CUILIERE M.L., DUHEILLE J.
Highly sensitive immunonephelometric assay detecting C1q-binding immune complexes.
4th International Congress of Immunology, Paris, 1980, Abstract n° 15-7-15.
105. MONTAGNE P.
Approche biophysique de la réaction antigène-anticorps sur phase solide.
Ann. Biol. Clin., 1990, 48, 459-464.
106. MONTAGNE P., LAROCHE P., CUILIERE M.L., RIOCHET D., FLECHEUX O., VARCIN P., MARCHAND J., PAU B., DUHEILLE J.
Polyacrylic microspheres as a solid phase for microparticle enhanced nephelometric immunoassay (Nephelia®) of transferrin.
Journal of Immunoassay, 1991, 12, 165-183.
107. MOSCOSO H., KIEFER C.R., SHYAMALA M., VON DOHLEN T., GARVER F.A.
Monoclonal antibody-based immunoassays for serum myoglobin quantification in acute myocardial infarction.
J. Clin. Lab. Analysis, 1990, 4, 437-442.
108. NAGAI R., UEDA S., YAZAKI Y.
Radioimmunoassay of cardiac myosin light chain II in the serum following experimental myocardial infarction.
Biochem. Biophys. Res. Comm., 1979, 86, 683-688.
109. NISHIDA Y., KAWAI H., NISHINO H.
A sensitive sandwich enzyme immunoassay for human myoglobin using Fab'-horseradish peroxydase conjugate; methods and results in normal subjects and patients with various diseases.
Clin. Chim. Acta, 1985, 153, 93-104.
110. NORREGAARD-HANSEN K., LINDO K.E., LUDVIGSEN C.V., NORGAARD-PEDERSEN B.
Serum myoglobin compared with creatine kinase in patients with acute myocardial infarction.
Acta Med. Scand., 1980, 207, 265-270.

111. NORREGAARD-HANSEN K., HANGAARD J., NORGAARD-PEDERSEN B.
A rapid latex agglutination test for detection of elevated levels of myoglobin in serum and its value in the early diagnosis of acute myocardial infarction.
Scand. J. Lab. Invest., 1984, 44, 99-103.
112. OLLERICH M.
Enzyme-Immunoassay: a review.
Clin. Chem. Clin. Biochem., 1984, 22, 895-904.
113. OUAISSI M.A., CAPRON A.
Fibronectines: structures et fonctions.
Ann. Immunol. (Inst. Pasteur), 1985, 136 C, 169-185.
114. OUCHTERLONY O.
Antigen-antibody reactions in gels.
Acta Path. Microbiol. Scand., 1949, 26, 507-515.
115. OUDIN J.
Méthode d'analyse immunochimique par précipitation spécifique en milieu gélifié.
Compt. Rend. Acad. Sci. Paris, 1946, 222, 115-116.
116. PASTEWKA J.V., NESS A.T., PEACOCK A.C.
Electrophoretic patterns of normal human serums by disc electrophoresis in polyacrylamide gel.
Clin. Chim. Acta, 1966, 14, 219-226.
117. PIERSCHBACHER M.D., RUOLAHTI E.
Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule.
Nature, 1984, 309, 30-33.
118. PIPER H.M., SCHWARZ P., SPAHR R., HUNTER J.F., SPIECKERMANN P.G.
Early enzyme release from myocardial cells is not due to irreversible cell damage.
Mol. Cell. Cardiol., 1984, 16, 385-388.
119. POKRIC B., PUCAR Z.
Effects of polyethylene glycol and dextrans on immunoprecipitations: a two-cross immunodiffusion study.
Anal. Biochem., 1985, 146, 374-388.
120. POLGE P.
Utilisation de la myoglobulinémie en pathologie cardiaque.
Th. Pharmacie, Montpellier, 1989.
121. PORATH J., FLODIN P.
Gel filtration: a method for desalting and group separation.
Nature, 1959, 183, 1657-1659.
122. POULETTY P.
L'immunodiagnostic rapide à la portée du praticien.
Le concours médical, 1988, 110, 3219-3227.
123. QUASH G.A., NIVELEAU A., AUPOIX M., GREENLAND T.
Immunolateral visualization of cell surface Forssman and polyamine antigens.
Exper. Cell. Res., 1976, 98, 253-261.

124. RAYLEIGH Lord.
On the transmission of light through an atmosphere containing small particles in suspension and on the origin of the blue of the sky.
Phil. Mag., 1899, 47, 375-384.
125. REICHLIN M., COPLEY D.P., KLOCKE F.J.
Rapid radioimmunoassay for serum myoglobin.
Am. J. Physiol., 1980, 239, H565-H569.
126. REICHLIN M., VISCO J.P., KLOCKE F.J.
Radioimmunoassay for human myoglobin; initial experience in patients with coronary heart disease.
Circulation, 1978, 57, 52-56.
127. REMBAUM A., YEN P.S., MOLDAV R.S.
Synthesis and reactions of hydrophilic functional microspheres for immunological studies.
Macromol. Sci. Chem., 1979, 13, 603-632.
128. RIOCHET D.
Immunonéphélométrie à supports microparticulaires. Synthèse et sensibilisation du réactif.
Th. Docteur Ingénieur, Nancy I, 1984.
129. RITCHIE R.F., ALPER C.A., GRAVES J., PEARSON N., LARSON C.
Automated quantitation of proteins in serum and other biologic fluids.
Am. J. Clin. Pathol., 1973, 59, 151-159.
130. ROITT I.
Immunologie.
Ed. Pradel, 1990.
131. ROMERO-HERRERA A.E., LEHMANN H.
The aminoacid sequence of human myoglobin and its minor fractions.
Proc. R. Soc. Lond. B., 1973, 186, 249-279.
132. ROSANO T.G., KENNY M.A.
A radioimmunoassay for human serum myoglobin: method development and normal values.
Clin. Chem., 1977, 23, 69-75.
133. RYMER J.C., RONCATO M., MAURICE C., PARIS M., ADAMS C., LE HEUZEY J.Y., GUIZE L.
Infarctus du myocarde. Intérêt diagnostique comparatif de la myoglobulinémie, des enzymes cardiaques et des protéines de l'inflammation.
Presse Méd., 1984, 13, 285-286.
134. RYMER J.C., KOUYOUMDJIAN J.C.
Dosage rapide de la myoglobine sérique: peut-on réfuter un diagnostic d'infarctus du myocarde au cours des 6 premières heures suivant l'apparition d'une douleur thoracique évocatrice?
Ann. Biol. Clin., 1986, 44, 523-525.
135. SARANCHAK H.J., BERNSTEIN S.H.
A new diagnostic test for acute myocardial infarction; the detection of myoglobinuria by radioimmunodiffusion assay.
J. Am. Med. Ass., 1974, 228, 1251-1255.

136. SARTORE S., GORZA L., PIEROBON BORMIOLI S., DALLA LIBERA L., SCHIAFFINO S.
Myosin types and fiber types in cardiac muscle. I. Ventricular myocardium.
J. Cell Biol., 1981, 88, 226-233.
137. SCHRIVE I., CAUDIE C., GLAIZAL S., ZOUGARI M., QUINCY Cl.
Infarctus aigu du myocarde: évolution des marqueurs les plus précoces sous thrombolytiques.
Biologie Prospective. Comptes rendus du 7^{ième} Colloque de Pont à Mousson, 1989, 229-233.
138. SCHULTZ A., LARSEN C.E., KRISTENSEN S.D., SCHMIDT E.B., ASTRUP G.
Serum myoglobin measured by latex agglutination: rapid test for exclusion of acute myocardial infarction.
Am. Heart J., 1986, 112, 609-610.
139. SCHWARTZ D.
Méthodes statistiques à l'usage des médecins et biologistes.
Editions médicales Flammarion, 3^{ième} édition, 1963.
140. SCHWARTZ K., BOUVERET P., BERCOVICI J., SWYNGHEDAUW B.
An immunochemical difference between myosins from normal and hypertrophied rat hearts.
FEBS Lett., 1978, 93, 137-139.
141. SCOTT J.A., KHAW B.A., LOCKE E., HABER E., HOMCY C.
The role of free radical-mediated processes in oxygen-related damage in cultured murine myocardial cells.
Circ. Res., 1985, 56, 72-77.
142. SEGUIN J.R., SAUSSINE M., FERRIERE M., LEGER J.J., LEGER J., LARUE C., CALZOLARI C., GROLLEAU R., CHAPTAL P.A.
Myosin: a highly sensitive indicator of myocardial necrosis after cardiac operations.
Thorac. Cardiovasc. Surg., 1989, 98, 397-401.
143. SIEBER A., GROSS J.
Determination of proteins by laser nephelometry.
Laborblätter, 1976, 26, 117-123.
144. SILVERBERG M., VEST DIEHL S.
The activation of the contact system of human plasma by polysaccharide sulfates.
Ann. N. Y. Acad. Sci., 1987, 516, 268-279.
145. SOBEL B.E., SHELL W.E.
Serum enzyme determinations in the diagnosis and assessment of myocardial infarction.
Circulation, 1972, XLV, 471-482.
146. SOBEL B.E., BRESNAHAN G.F., SHELL W.E., YODER R.D.
Estimation of infarct size in man and its relation to prognosis.
Circulation, 1972, XLVI, 640-648.
147. STONE M.J., WILLERSON J.T., GOMEZ-SANCHEZ C.E., WATERMAN M.R.
Radioimmunoassay of myoglobin in human serum.
J. Clin. Invest., 1975, 56, 1334-1339.
148. STRECKER H., HACHMANN H., SEIDEL L.
Le dosage radioimmunologique (RIA). Une méthode d'analyse quantitative hautement spécifique et extrêmement sensible.
Chemiker Zeitung, 1979, 103, 53-68.

149. SOUTHERN E.M.
Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis.
Mol. Biol., 1975, 98, 503-517.
150. SYLVEN C., BENDZ R.
Myoglobin, creatine kinase and its isoenzyme MB in serum after acute myocardial infarction.
Eur. J. Cardiol., 1978, 8/4-5, 515-521.
151. TOFT E., STENTOFT J., THORGAARD ANDERSEN P.
False-negative latex-agglutination test for myoglobin owing to antigen excess.
Clin. Chem., 1988, 34, 177.
152. TOMBS M.P., COOKE K.B., BURSTON D., MAC-LAGEN N.F.
The chromatography of normal serum proteins.
Biochem. J., 1961, 80, 284-292.
153. TOMMASO C.L., SALZEIDER K., ARIF M., KLUTZ W.
Serial myoglobin vs. CPK analysis as an indicator of uncomplicated myocardial infarction size and its use in assessing early infarct extension.
Am. Heart J., 1980, 99, 149-154.
154. TOWBIN H., STAEBELIN T., GORDON J.
Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1979, 76, 4350-4354.
155. TRAHERN C.A., GERE J.B., KRAUTH G.H., BIGHAM D.A.
Clinical assessment of serum myosin light chains in the diagnosis of acute myocardial infarction.
Am. J. Cardiol., 1977, 41, 641-645.
156. TSUCHIMUCHI H., SUGI M., KURO-O M., UEDA S., TAKAKU F., FURUTA S., SHIRAI T., YAZAKI Y.
Isozymic changes in myosin of human atrial myocardium induced by overload.
J. Clin. Invest., 1984, 74, 662-665.
157. VALETTE I., POINTIS J., RONDEAU Y., WAKS M., ENGLER R.
Is immunochemical determination of haptoglobin phenotype dependent?
Clin. Chim. Acta, 1979, 99, 1-6.
158. VARKI A.P., ROBY D.S., WATTS H., ZATUCHNI J.
Serum myoglobin in acute myocardial infarction: a clinical study and review of the literature.
Am. Heart J., 1978, 96, 680-688.
159. VON SCHULTHESS G.K., GIGLIO M., CANNELL D.S., BENEDEK G.B.
Detection of agglutination reactions using anisotropic light scattering: an immunoassay of high sensitivity.
Mol. Immunol., 1980, 17, 81-92.
160. VROMAN L., ADAMS A.L., FISCHER G.C., MUNOZ P.C.
Interaction of high molecular weight kininogen, factor XII, and fibrinogen in plasma at interfaces.
Blood, 1980, 55, 156-159.

161. WANG J., SHI Q., WU T.W., JACKOWSKI G., MICKLE D.
The quantitation of human ventricular myosin light chain I in serum after myocardial necrosis and infarction.
Clin. Chim. Acta, 1989, 181, 325-336.
162. WEBER K., OSBORN M.
The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis.
J. Biol. Chem., 1969, 244, 4406-4412.
163. WRIGHT G.L.
High resolution two-dimensional polyacrylamide electrophoresis of human serum proteins.
Am. J. Clin. Path., 1972, 57, 173-185.
164. YAMADA K.M., KENNEDY D.W.
Amino acid sequence specificities of an adhesive recognition signal.
Cell. Biochem., 1985, 28, 99-104.
165. YONEMASU K., STROUD R.M.
Clq: rapid purification method for preparation of monospecific antisera and for biochemical studies.
Immunology, 1971, 106, 304-313.

PUBLICATIONS.

Ce travail a donné lieu aux publications suivantes:

- Development of a Rapid Microparticle-enhanced Nephelometric Immunoassay for Serum Myoglobin in Acute Myocardial Infarction; F. Cliquet, P. Montagne, M.L. Cuillère, P. Varcin, J. Duheille, J. Clin. Lab. Analysis, 1992, 6, 176-181.
- Adsorption of Subcomponent C1q of Complement, Fibronectin, and Immunoglobulins G on Polyacrylic Microparticles used as Solid-phase in Immunoassay; Florence Cliquet, Marie-Louise Cuillère, Paul Montagne and Jean Duheille, soumise à J. Biomed. Mater. Res.
- Use of Microsphere-Antibody Conjugates Microparticle-enhanced Nephelometric Immunoassay; Paul Montagne, Rachida El Omari, Florence Cliquet, Marie-Louise Cuillère, Jean Duheille, soumise à Bioconjugate Chemistry.

UNIVERSITE DE NANCY I

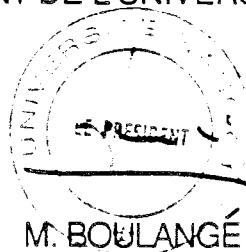
NOM DE L'ETUDIANT : Mademoiselle CLIQUET Florence

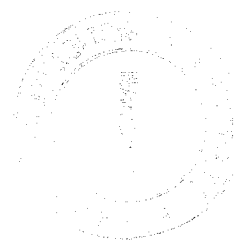
NATURE DE LA THESE : DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE NANCY I
en IMMUNOCHIMIE

VU, APPROUVE ET PERMIS D'IMPRIMER

NANCY, le 20 MAI 1992 n° 227

LE PRESIDENT DE L'UNIVERSITE DE NANCY I







MEDICOOP
CO-OPERATIVE

de Conservation des Etudiants des Facultés
de Nancy
Société Anonyme au capital variable

FACULTE DE MEDECINE
9, Avenue de la Forêt de Haye
54184 Vandœuvre Cedex

Tel : 83-44-66-33 ou 83-59-25-27

MOTS-CLES: Immunonéphélémétrie
Microsphères
Immuno-essai
Myoglobine
Interférences sériques
C1q
Infarctus du myocarde

RESUME.

Les progrès récents de la cardiologie permettent de réduire la mortalité des accidents cardiovasculaires, en particulier de l'infarctus du myocarde, grâce à la mise en place d'un traitement fibrinolytique destiné à désobstruer l'artère coronaire bouchée. Cependant l'administration d'un tel traitement doit être rapide et de plus impose un diagnostic de certitude d'infarctus.

Un des objectifs de notre travail a consisté à mettre au point les dosages de la myoglobine et de la myosine sériques par immunonéphélémétrie à supports microparticulaires. Cette technique sensible offre de nombreux avantages dont la simplicité et la rapidité.

La myoglobine, petite molécule rapidement retrouvée dans la circulation après la constitution de la nécrose myocardique constitue le marqueur biologique le plus précoce de l'infarctus. La myosine, de masse moléculaire plus importante, est libérée plus tard des cellules lésées; sa détermination permet de suivre l'efficacité du traitement et de pronostiquer l'importance de la zone nécrosée.

Deux systèmes de détection sont développés, l'un par inhibition en 15 min, mettant en oeuvre des microsphères recouvertes de myoglobine, l'autre par immunocapture en 1 h 30 min, où les microsphères sont couplées à des anticorps monoclonaux. Ce dernier système a été appliqué au dosage de la myosine.

Le dosage de myoglobine par inhibition a été validé sur des sérums de patients souffrant d'un infarctus du myocarde. Les sérums subissent néanmoins préalablement un traitement, dont les conditions d'utilisation sont étudiées, destiné à éliminer les signaux non spécifiques qu'ils engendrent lorsqu'ils sont introduits concentrés dans la suspension de microsphères.

Un second axe, émanant des difficultés rencontrées lors de la mise en présence des microsphères et de sérum concentré, s'oriente vers une étude plus fondamentale de recherche des constituants sériques intervenant dans la déstabilisation des microsphères. Des méthodes chromatographiques ont été utilisées pour fractionner le milieu sérique. Les analyses qualitatives et quantitatives ont révélé qu'à la surface des microsphères, plusieurs espèces moléculaires aussi différentes que les IgG, la fibronectine, les composants C3 proactivateur, C3c et C1q s'adsorbaient. Il est montré que C1q participe directement à la formation des signaux non spécifiques et constitue donc l'un des éléments sériques responsable de la déstabilisation des microsoutports en milieu sérique concentré.