



HAL
open science

Immunonéphélémétrie microparticulaire : système protéolytique du plasminogène dans le sang humain et le lait bovin

Eric Marchal

► **To cite this version:**

Eric Marchal. Immunonéphélémétrie microparticulaire : système protéolytique du plasminogène dans le sang humain et le lait bovin. Microbiologie et Parasitologie. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 1994. Français. NNT : 1994NAN10125 . tel-01747569

HAL Id: tel-01747569

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01747569>

Submitted on 29 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



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>

THESE

Présentée devant

L'UNIVERSITE DE NANCY I

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE NANCY I

U.F.R. : Sciences et Techniques Biologiques

Ecole Doctorale : Biologie et Santé

Spécialité : Microbiologie-Enzymologie-Nutrition

par

Eric MARCHAL

Sujet :

**IMMUNONEPHELEMETRIE MICROPARTICULAIRE :
SYSTEME PROTEOLYTIQUE DU PLASMINOGENE DANS
LE SANG HUMAIN ET LE LAIT BOVIN.**

Soutenue publiquement le 1^{er} juin 1994 devant la commission d'examen

Membres du jury:

| | |
|-----------------|--|
| M J.L. CUQ, | Professeur (rapporteur) |
| M D. LEVIEUX, | Directeur de Recherche INRA (rapporteur) |
| M D. DELAHAYE, | Directeur Général ISI |
| M J. DUHEILLE, | Professeur |
| Mme C. FINANCE, | Professeur |
| M G. HUMBERT, | Ingénieur de Recherche |
| M G. LINDEN, | Professeur |

AVANT-PROPOS

AVANT-PROPOS

Qu'il me soit permis d'exprimer toute ma gratitude pour m'avoir accueilli dans leurs laboratoires respectifs et pour m'avoir donné, tout au long de ces années de thèse, les moyens de poursuivre et de mener à terme ce travail, à:

Monsieur le professeur G. LINDEN, qui m'a proposé ce thème de recherche et m'a témoigné sa confiance par ses conseils et sa bienveillance, tout au long de ce chemin qui ne fut pas sans embûches.

Monsieur le professeur J. DUHEILLE, qui, par sa constante disponibilité, sa rigueur scientifique, l'étendue de son savoir et son immense gentillesse reste pour moi un exemple d'homme de sciences.

Mes sincères remerciements s'adressent également aux autres membres de la commission d'examen:

A monsieur le professeur J.L. CUQ et à monsieur D. LEVIEUX, qu'ils soient assurés de l'honneur qu'ils me font de consacrer de leur temps pour juger ce travail.

A madame le professeur C. FINANCE, qui a gentiment accepté la participation à ce jury.

A monsieur D. DELAHAYE, pour l'intérêt qu'il a su porter à nos travaux, en espérant que tous les espoirs fondés vont pouvoir se concrétiser.

A monsieur G. HUMBERT, maître es "plasminogène", qui a su me communiquer ses passions et son savoir. Que ce travail soit le témoignage de ma profonde gratitude.

A monsieur P. MONTAGNE, autre passionné, dont les connaissances n'ont d'égales que sa modestie et sa disponibilité. Qu'il trouve ici l'expression de mon profond respect.

Une partie de ce travail a bénéficié des collaborations de M. BENALI et S. HAISSAT, que je remercie et à qui je souhaite de pouvoir (plus ou moins prochainement) finir leurs thèses.

Mes remerciements à toutes celles et tous ceux du laboratoire de Biochimie Appliquée pour leur collégialité et leur sympathie.

Enfin un grand merci à toute l'équipe du laboratoire d'Immunologie, tous étages confondus, pour l'ambiance qui régna dans cette communauté ainsi que pour toute l'aide morale apportée.

A tous, merci

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES

| | |
|----------------------|---|
| - AVANT-PROPOS | |
| - TABLE DES MATIERES | |
| - ABREVIATIONS | |
| - INTRODUCTION | 1 |

1ere PARTIE LE SYSTEME PROTEOLYTIQUE DU PLASMINOGENE

| | |
|---|----|
| I/ INTRODUCTION : LES PROTEASES A SERINE | 6 |
| II/ LE SYSTEME FIBRINOLYTIQUE HUMAIN | 7 |
| A/ Le Plasminogène humain | 7 |
| A.1/ Caractères généraux | 7 |
| A.2/ Structure du plasminogène humain | 8 |
| A.3/ Sites de fixation | 12 |
| A.3.1/ Fixation à la lysine | 12 |
| A.3.1.1/ Les sites d'affinité à la lysine | 12 |
| A.3.1.2/ Les molécules affines | 14 |
| A.3.1.2.a/ Fibrinogène-Fibrine | 14 |
| A.3.1.2.b/ Acide ϵ amino caproïque | 15 |
| A.3.1.2.c/ α 2 Antiplasmine | 15 |
| A.3.1.2.d/ Histidin Rich GlycoProtein | 15 |
| A.3.2.1.e/ Protéines d'adhésion | 15 |
| A.3.2.1.f/ Immunoglobulines | 16 |
| A.3.2.1.g/ Cellules sanguines | 16 |
| A.3.2/ Fixation de la benzamidine | 17 |
| A.3.3/ Fixation de l'héparine | 17 |

| | |
|--|----|
| A.3.4/ Autres | 18 |
| A.4/ Le plasminogène dans les espèces animales | 18 |
| A.5/ Homologie avec les apolipoprotéines(a) | 19 |
| A.5.1/ Constitution des lipoprotéines(a) | 19 |
| A.5.2/ Lien avec l'HPg | 19 |
| A.5.3/ Rôle athérogène des lp(a) | 20 |
| A.6/ Purification du plasminogène et de ses fragments | 20 |
| A.7/ Dosage du plasminogène et mesure de son activité dans le sang | 21 |
| A.7.1/ Immunodosages | 21 |
| A.7.2/ Mesure de l'activité | 21 |
| B/ Fibrinogène et fibrine, substrats physiologiques du Pg | 22 |
| B.1/ Le fibrinogène | 22 |
| B.2/ La fibrine | 23 |
| C/ Les activateurs du plasminogène | 24 |
| C.1/ Activateurs de la voie endogène | 24 |
| C.1.1/ Voie extrinsèque | 24 |
| C.1.1.1/ L'activateur tissulaire du Pg | 24 |
| C.1.1.2/ L'Urokinase et la Pro-Urokinase | 26 |
| C.1.2/ Voie intrinsèque | 27 |
| C.2/ Activateurs de la voie exogène | 28 |
| C.2.1/ La Streptokinase | 28 |
| C.2.2/ La Staphylokinase | 29 |
| C.3/ Activateurs du plasminogène d'origine leucocytaire | 30 |
| D/ LES Inhibiteurs de la fibrinolyse | 30 |
| D.1/ Inhibiteurs de la plasmine | 30 |
| D.1.1/ L' α 2 AntiPlasmine | 30 |
| D.1.2/ L' α 2 Macroglobuline | 32 |
| D.1.3/ L' α 1 Antitrypsine | 33 |

| | |
|--|----|
| F.1.3/ Fibrinolyse et maladies hématologiques | 42 |
| F.1.4/ Les thérapeutiques fibrinolytiques | 42 |
| F.2/ Fibrinolyse et cancers | 43 |
| F.3/ Autres pathologies | 46 |
| F.3.1/ Activation locale du plasminogène | 46 |
| F.3.2/ Hépathopathies | 47 |
| F.3.3/ Plasminogène et fertilité | 47 |
| F.3.4/ Autres pathologies | 47 |
| G/ Conclusion | 48 |
| III/ LE SYSTEME CASEINOLYTIQUE DU LAIT | 48 |
| A/ Introduction : le lait, source de vie | 48 |
| B/ Les enzymes du lait | 49 |
| C/ La protéase alcaline du lait | 50 |
| C.1/ Caractères généraux et répartition dans les laits | 50 |
| C.2/ Structure moléculaire | 50 |
| C.3/ Teneurs et facteurs de variations | 51 |
| C.4/ Association aux caséines | 53 |
| C.5/ Propriétés de la protéase alcaline bovine | 53 |
| C.6/ Conséquence de la protéolyse sur le lait | 54 |
| C.7/ Purification de la protéase alcaline du lait | 55 |
| C.8/ Dosage du BPg dans le lait | 55 |
| C.8.1/ Immunodosage | 55 |
| C.8.2/ Dosage de l'activité de l'enzyme | 55 |
| D/ Les activateurs du BPg | 56 |
| D.1/ Activateurs endogènes | 56 |
| D.2/ Activateurs exogènes | 56 |
| E/ Les inhibiteurs du BPg | 57 |
| E.1/ Inhibiteurs endogènes | 57 |

| | |
|--|----|
| E.2/ Inhibiteurs exogènes | 57 |
| F/ Les caséines, substrats naturels de la plasmine | 58 |
| F.1/ Caséine α S1 | 59 |
| F.2/ Caséine α S2 | 59 |
| F.3/ Caséine β | 60 |
| F.4/ Caséines γ et protéose-peptones | 60 |
| F.5/ Caséine κ | 61 |
| F.6/ Les micelles de caséine | 62 |
| F.6.1/ Association de caséines | 62 |
| F.6.2/ Composition des micelles | 62 |
| F.6.3/ Modèles de structure micellaire | 63 |
| F.6.4/ Coagulation des micelles | 65 |
| F.6.4.1/ Coagulation par acidification | 65 |
| F.6.4.2/ Coagulation par les enzymes | 65 |
| F.7/ Teneurs et facteurs de variations | 66 |
| F.8/ Techniques d'analyse des caséines | 68 |
| F.8.1/ Techniques électrophorétiques | 68 |
| F.8.2/ Techniques chromatographiques | 68 |
| F.8.3/ Techniques spectrométriques | 69 |
| F.8.4/ Techniques immunologiques | 69 |
| F.8.5/ Autres techniques | 70 |
| G/ La protéolyse dans le lait | 70 |
| G.1/ Activation du BPg | 70 |
| G.2/ Action de la plasmine sur les caséines | 71 |
| G.2.1/ Action sur la caséine α S1 | 71 |
| G.2.2/ Action sur la caséine α S2 | 71 |
| G.2.3/ Action sur la caséine β | 71 |

| | |
|--------------------------------|----|
| G.2.4/ Action sur la caséine κ | 72 |
| H/ Conclusions | 72 |
| IV/ OBJECTIFS | 73 |

2ème PARTIE : MATERIEL ET METHODES

| | |
|--------------|----|
| Introduction | 74 |
|--------------|----|

CHAPITRE 1 : MATERIEL

| | |
|---------------------------|----|
| I/ Réactifs | 75 |
| II/ Echantillons de lait | 77 |
| III/ Principaux appareils | 77 |

CHAPITRE 2 : METHODES

| | |
|---|----|
| I/ LA NEPHELEMETRIE | 78 |
| A/ Dispersion de la lumière et Néphélémétrie | 78 |
| A.1/ Loi de RAYLEIGH | 78 |
| A.2/ Lois de DEBYE et de MIE | 79 |
| B/ L'immunonéphélémétrie | 80 |
| B.1/ L'immunonéphélémétrie "classique" | 80 |
| B.1.1/ Principe | 80 |
| B.1.2/ Avantages et limites de la méthode | 80 |
| B.2/ L'immunonéphélémétrie microparticulaire | 81 |
| B.2.1/ Principe | 81 |
| B.2.2/ Avantages | 81 |
| B.2.3/ Modèles réactionnels | 81 |
| B.2.4/ Les supports microparticulaires | 83 |
| C/ Fabrication des réactifs d'INM | 84 |
| C.1/ Synthèse des Ms polyacryliques hydrophiles | 84 |
| C.1.1/ Monomères utilisés | 84 |

| | |
|--|----|
| C.1.2/ Polymérisation | 85 |
| C.2/ Protocole général de couplage d'un antigène sur les Ms | 85 |
| C.2.1/ Première étape: couplage des antigènes | 86 |
| C.2.2/ Deuxième étape: saturation des aldéhydes libres | 86 |
| C.3.3/ Troisième étape: séparation des Ms sensibilisées | 86 |
| C.3/ Protocole général de couplage d'un anticorps | 87 |
| C.3.1/ Première étape: obtention de l'aminodextran | 87 |
| C.3.2/ Deuxième étape: couplage aux Ms | 88 |
| C.3.3/ Troisième étape: couplage de l'anticorps | 89 |
| D/ Appareillage | 90 |
| II/ IMMUNSERUMS | 91 |
| A/ Antisérums anti plasminogène humain | 91 |
| B/ Antisérums anti plasminogène bovin | 91 |
| III/ METHODES DE PURIFICATION ET DE DOSAGE | 91 |
| A/ Méthodes de purification | 91 |
| A.1/ Purification du plasminogène bovin par chromatographie d'affinité | 91 |
| A.1.1/ Principe | 91 |
| A.1.2/ Protocole | 92 |
| A.2/ Purification des IgG d'un sérum | 93 |
| A.2.1/ Principe | 93 |
| A.2.2/ Protocole | 94 |
| B/ Méthodes d'identification et de dosage | 94 |
| B.1/ Méthode électrophorétique | 94 |
| B.1.1/ Principe | 94 |
| B.1.2/ Protocole | 94 |
| B.1.3/ Electrophorèse du plasminogène purifié | 95 |
| B.2/ Dosage de solutions de protéines purifiées | 96 |
| B.2.1/ Principe | 96 |
| B.2.2/ Protocole | 96 |

| | |
|--|-----|
| B.3/ Dosage du Dextran T500 par la méthode à l'orcinoï | 97 |
| B.3.1/ Principe | 97 |
| B.3.2/ Protocole | 97 |
| B.4/ Dosages par Immunonéphélémétrie Microparticulaire | 98 |
| B.4.1/ Caséines | 98 |
| B.4.1.1/ Principe | 98 |
| B.4.1.2/ Protocole | 98 |
| B.4.2/ Immunoglobulines G bovines | 100 |
| B.4.2.1/ Principe | 100 |
| B.4.2.2/ Protocole | 100 |
| B.5/ Dosage du plasminogène humain par Immunonéphélémétrie Classique | 101 |
| B.5.1/ Principe | 101 |
| B.5.2/ Protocole | 101 |
| C/ Méthodes statistiques | 102 |
| C.1/ Fidélité des dosages | 102 |
| C.2/ Exactitude des méthodes | 102 |

3ème PARTIE : RESULTATS

CHAPITRE 1: DOSAGE DE L'HPg SERIQUE PAR IMMUNONEPHELEMETRIE MICROPARTICULAIRE

| | |
|--|-----|
| A/ Mise au point du dosage | 104 |
| A.1/ Couplage des AchP _g sur les MsD _x | 104 |
| A.2/ Réactivité des MsD _x sensibilisées | 105 |
| A.2.1/ Agglutination en présence d'HP _g | 105 |
| A.2.2/ Spécificité de cette agglutination | 105 |
| A.2.3/ Choix du milieu de réaction | 108 |
| A.2.4/ Optimisation des paramètres du protocole | 110 |
| A.2.4.1/ Temps d'incubation de l'étape I | 110 |

| | |
|---|-----|
| A.2.4.2/ Quantité d'AchP _g amplifiants et origine de ces Ac | 113 |
| A.2.4.3/ Temps d'incubation de l'étape II | 115 |
| A.2.5/ Dilution et traitements préalable des échantillons | 117 |
| A.2.6/ Réaction croisée avec les lipoprotéines(a) | 119 |
| A.2.7/ Faisabilité du dosage | 121 |
| A.2.8/ Protocole final de dosage | 123 |
| B/ Validation du dosage | 123 |
| B.1/ Reproductibilité de l'étalonnage | 123 |
| B.2/ Fidélité du dosage | 126 |
| B.2.1/ Fidélité intra-essai | 126 |
| B.2.2/ Fidélité inter-essais | 128 |
| B.3/ Exactitude de la méthode | 128 |
| B.3.1/ Etudes de récupération | 128 |
| B.3.1.1/ Tests de surcharge | 128 |
| B.3.1.2/ Etudes de dilution | 130 |
| B.3.1.3/ Conclusion sur les études de récupération | 132 |
| B.3.2/ Corrélation avec une technique de référence | 132 |
| B.3.2.1/ Résultats | 132 |
| B.3.2.2/ Discussion | 132 |
| C/ Conclusions | 140 |
| <u>CHAPITRE 2: DOSAGE DU PLASMINOGENE BOVIN EN MILIEU SYNTHETIQUE PAR UN SYSTEME INTER-ESPECES D'IMMUNONEPHELEMETRIE MICROPARTICULAIRE</u> | |
| | 141 |
| A/ Introduction | |
| B/ Mise au point du dosage du BP _g par un système inter-espèces | 143 |
| B.1/ Agglutination des MsDxAchP _g par du BP _g | 143 |
| B2/ Quantité optimale d'anticorps amplifiants | 143 |
| B.3/ Concentration optimale de MsDxAchP _g | 146 |
| B.4/ Protocole final et gamme d'étalonnage | 146 |
| C/ Optimisation de la sensibilité du dosage | 146 |

| | |
|--|-----|
| D/ Validation du dosage | 148 |
| E/ Conclusions sur le dosage inter-espèces | 148 |

CHAPITRE 3 : DOSAGE DU PLASMINOGENE BOVIN EN MILIEU
SYNTHETIQUE PAR UN SYSTEME MONO-ESPECE
D'IMMUNONEPHELEMETRIE MICROPARTICULAIRE

| | |
|--|-----|
| A/ Introduction | 151 |
| B/ Mise au point du dosage | 151 |
| B.1/ Purification de l'Antisérum anti BPg | 151 |
| B.2/ Couplage MsDxAcBPg | 151 |
| B.3/ Agglutination des MsDxAcBPg en présence de BPg | 152 |
| B.4/ Optimisation du système | 152 |
| B.4.1/ Variations du pH et du PEG | 152 |
| B.4.2/ Origine de l'As amplifiant | 152 |
| B.5/ Protocole retenu et gamme d'étalonnage | 154 |
| C/ Validation du dosage | 154 |
| C.1/ Tests de surcharge | 154 |
| C.2/ Etudes de répétabilité | 156 |
| D/ Spécificité du dosage vis-à-vis des protéines du lactosérum | 156 |
| E/ Réaction croisée avec la plasmine | 159 |
| F/ Conclusions | 159 |

CHAPITRE 4 : INFLUENCE DU MILIEU LAIT SUR LE COMPORTEMENT
DES Ms POLYACRYLIQUES. ETUDE SUR UN MODELE DE Ms
SENSIBILISEES PAR DES IgG BOVINES

| | |
|--|-----|
| A/ Introduction | 160 |
| B/ Etude de l'influence du lait sur l'agglutination des MslgGb | 161 |
| B.1/ Modèle utilisé | 161 |
| B.2/ Stabilisation des MslgGb en présence de lait | 162 |
| B.3/ Origine du phénomène | 164 |
| B.3.1/ Effet des caséines | 167 |
| B.3.1.1/ Caséine totale | 167 |

| | |
|---|-----|
| B.3.1.2/ Caséines α S, β et κ | 167 |
| B.3.1.3/ Cinétique du phénomène | 167 |
| B.3.1.4/ Effet du Caséinomacroglycopeptide | 171 |
| B.3.2/ Effet du lactosérum | 174 |
| B.3.2.1/ Protéines du lactosérum | 174 |
| B.3.2.2/ Environnement minéral du lait | 174 |
| B.3.3/ Conclusion | 174 |
| C/ Traitement du phénomène de stabilisation | 177 |
| C.1/ Traitement sans séparation de phase: utilisation d'un agent déstabilisant | 177 |
| C.1.1/ Agglutination MslgGb/AclgGb dans le lait de chèvre en présence de sérum de chèvre | 177 |
| C.1.2/ Inhibition du système d'agglutination | 177 |
| C.1.3/ Etude de récupération des IgGb dans un tel système | 179 |
| C.1.4/ Problèmes rencontrés lors de l'étude des conditions expérimentales | 182 |
| C.2/ Traitement par élimination des caséines | 182 |
| C.2.1/ Utilisation de Ms-Ethanolamine | 182 |
| C.2.1.1/ Traitement standard des caséines par des Ms-Eth | 183 |
| C.2.1.2/ Traitement par des quantités croissantes de Ms-Eth | 183 |
| C.2.1.3/ Capacité d'adsorption des Ms-Eth | 185 |
| C.2.1.4/ Particularité de notre modèle | 188 |
| C.2.2/ Précipitation des caséines à leur pHi | 188 |
| C.2.2.1/ Effet d'un tel traitement sur l'élimination des caséines | 188 |
| C.2.2.2/ Remarques concernant ce type de traitement | 190 |
| C.2.2.3/ Particularité de notre modèle | 190 |
| C.2.3/ Coagulation des caséines par la présure | 190 |
| D/ CONCLUSION | 193 |
| <u>CHAPITRE 5 : DOSAGE DU PLASMINOGENE BOVIN DANS DES ECHANTILLONS LAIT</u> | |
| A/ Introduction | 194 |

| | |
|--|-----|
| B/ Traitement de l'échantillon | 194 |
| C/ Etalonnage de ce système | 195 |
| C.1/ Fabrication d'un lactosérum "synthétique" | 195 |
| C.2/ Agglutination des MsDxAcBPg par l'étalon | 196 |
| D/ Dosage d'échantillons traités | 196 |
| D.1/ Influence de l' ϵ AAC sur la réaction | 196 |
| D.2/ Influence du milieu lactosérum peu dilué sur les Ms | 198 |
| D.3/ Influence du reliquat de caséines du surneageant sur les Ms | 198 |
| D.4/ Agglutination d'échantillons traités | 200 |
| D.5/ Effet de traitements thermiques sur le dosage | 200 |
| D.6/ Spécificité du dosage vis-à-vis de la plasmine | 202 |
| E/ Validation du dosage | 202 |
| E.1/ Surcharges d'échantillons laits | 202 |
| E.2/ Tests de répétabilité | 207 |
| E.2.1/ Répétabilité de l'étalonnage | 207 |
| E.2.2/ Reproductibilité de l'extraction | 207 |
| F/ Conclusion | 209 |

CHAPITRE 6 : APPLICATION DU DOSAGE DU PLASMINOGENE BOVIN
PAR IMMUNONEPHELEMETRIE MICROPARTICULAIRE DANS LE CADRE
D'UNE ETUDE DES PARAMETRES DE LA QUALITE DE LAITS DE
TROUPEAU

| | |
|--|-----|
| A/ Introduction | 210 |
| B/ Résultats | 210 |
| B.1/ Etude globale des teneurs en BPg des laits de troupeau | 210 |
| B.2/ Etude globale des teneurs en caséine β des laits de troupeaux | 211 |
| B.3/ Evolution des teneurs en BPg et caséine β des laits de troupeau | 212 |
| B.4/ Comparaison des deux facteurs à d'autres paramètres des laits | 212 |
| B.4.1/ BPg et autres paramètres des laits | 214 |
| B.4.2/ Caséine β et autres paramètres des laits | 214 |
| C/ Conclusion | 216 |

| | |
|--|-----|
| - CONCLUSION GENERALE | 217 |
| - REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES | 221 |
| - ANNEXES | 258 |
| Annexe 1 : composition des tampons | 258 |
| Annexe 2 : protocoles de couplage | 259 |
| Annexe 3 : traitement des échantillons | 261 |
| Annexe 4 : tableaux relatifs au dosage du BPg par INM | 263 |
| Annexe 5 : Tableaux relatifs à l'étude des laits de troupeau | 265 |
| | |
| - PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS REALISEES | |

ABBREVIATIONS

LISTE DES ABREVIATIONS

| | |
|-----------------|---|
| Ac | Anticorps |
| ϵ AAC | Acide ϵ aminocaproïque |
| AcHPg | Anticorps anti plasminogène humain |
| AcIgGb | Anticorps anti immunoglobulines G bovines |
| Ag | Antigène |
| <i>t</i> -AMCHA | Acide <i>trans</i> -4-aminométhyle cyclohexane-1 carboxylique |
| α 2AP | Alpha 2 antiplasmine |
| Apo(A) | Apolipoprotéine (A) |
| Apo(B) | Apolipoprotéine (B) |
| As | Antisérum |
| AsBPg | Antisérum anti plasminogène bovin |
| AsBPg* | Antisérum anti plasminogène bovin traité |
| α 1ACT | Alpha 1 anti chymotrypsine |
| α 2AP | Alpha 2 antiplasmine |
| α 1AT | Alpha 1 antitrypsine |
| ATIII | Antithrombine III |
| BB | Blanc Billes |
| BPg | Plasminogène bovin |
| CLHP | Chromatographie liquide haute performance |
| CMP | Caséinomacroglycopeptide |
| CN | Caséine |
| CNBr | Bromure de cyanogène |
| CV | Coefficient de variation |
| DEAE | Diéthylaminoéthyle |
| DFP | Di-isopropylfluorophosphate |
| Dx | Dextran |
| EDTA | Ethylène-diamino-tétraacétate de sodium |
| ELISA | "Enzyme linked immunosorbent assay" |
| Fact XII | Facteur XII |
| Fact XIIa | Facteur XII activé |
| HEMA | Hydroxyéthyl méthacrylate |
| HPg | Plasminogène humain |
| HRGP | "Histidin rich glycoprotein" |
| IC1 | Inhibiteur du facteur C1 du complément |
| IC1ase | Inhibiteur de la C1 estérase |
| IDR | Immunodiffusion radiale |
| Ig | Immunoglobuline |
| IgG | Immunoglobuline G |
| IgGb | Immunoglobuline G bovine |
| IK | Inhibiteur de Kunitz |
| IMV | Indice moyen de variation |
| INC | Immunonéphélémétrie classique |
| INM | Immunonéphélémétrie microparticulaire |
| ITS | Inhibiteur trypsique du soja |
| KK | Kallikréine |
| KNG | Kininogène |

| | |
|--------------|---|
| α LA | Alpha lactalbumine |
| β LG | Bêta lactoglobuline |
| Lp(a) | Lipoprotéines (a) |
| LS4B | Lysine-Sepharose 4B |
| M | Mole par litre |
| MA | Acide méthacrylique |
| α 2MG | Alpha 2 macroglobuline |
| Ms | Microsphère |
| MsAg | Microsphère sensibilisée par un Ag |
| MsBPg | Microsphère sensibilisée par du plasminogène bovin |
| MsDx | Microsphère-Dextran |
| MsDxAc | Microsphère-Dextran sensibilisée par des anticorps |
| MsDxAcHPg | Microsphère-Dextran sensibilisée par des Ac anti HPg |
| MsDxAcBPg | Microsphère-Dextran sensibilisée par des Ac anti BPg |
| MsEth | Microsphère-Ethanolamine |
| MslgGb | Microsphère sensibilisée par des IgG bovines |
| tPA | Activateur tissulaire du plasminogène |
| PAI-1 | "Plasminogen Activator Inhibitor-1" |
| PAI-2 | "Plasminogen Activator Inhibitor-2" |
| PAI-3 | "Plasminogen Activator Inhibitor-3" |
| PDF | Produits de dégradation de la fibrine |
| PEG | Polyéthylène glycol |
| Pg | Plasminogène |
| Pm | Plasmine |
| PN | Protéase-nexine |
| PréKK | Prékallikréine |
| ProUK | Pro-urokinase |
| RIA | "Radio immuno assay" |
| SAL | Site d'affinité lysine |
| SD | Ecart-type |
| SDS | Dodécyl sulfate de sodium |
| SEB | Sérum étalon Behring |
| SK | Streptokinase |
| SPK | Staphylokinase |
| TB | Taux butyrique |
| TCA | Acide trichloroacétique |
| T.E.M.E.D. | N,N,N',N'-tétraméthyl-éthylène diamine |
| TLCK | N- α - tosyl-L lysine chlorométhylcétone |
| TPCK | N- α -tosyl-L phénylalanine chlorométhylcétone |
| Tris | Tris(hydroxyméthyl)aminométhane |
| U.H.T. | Ultra-haute-température |
| UK | Urokinase |
| mV | Millivolts |

N.B.: - Les abréviations des acides aminés sont celles de l'IUB (International Union of Biochemistry).

- D'autres abréviations ont été définies dans le texte.

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Le système protéolytique du plasminogène

Il existe dans la nature de nombreux systèmes protéolytiques, d'origine animale, végétale ou microbienne. Ceux-ci sont divisés en exopeptidases et endopeptidases, selon qu'ils lysent les acides aminés à partir des extrémités ou en divers points de la séquence. Le groupe des protéases à sérine appartient à ces dernières. Dans cette famille, les enzymes sont généralement synthétisées sous forme de zymogène inactif, ce qui permet une régulation fine du système. L'activation révèle un site actif qui est toujours composé de la triade Asp - His - Ser.

Le système plasminogène / plasmine est classé dans cette famille. Le plasminogène est le zymogène de la plasmine, qui est l'enzyme active. Son domaine d'activité est vaste et les conséquences de son action sont très différentes selon le milieu dans lequel elle intervient. Nous n'en prendrons pour exemple que le sang et le lait.

Dans le sang, la plasmine est l'enzyme-clé du système fibrinolytique. Ce système est intimement lié à la coagulation, dont il complète le fonctionnement au cours de l'hémostase. Pourtant, comparée à la coagulation, la notion de fibrinolyse apparaît relativement récente, puisqu'elle ne fut créée qu'à la fin du siècle dernier par Albert DASTRE (1893). Il est vrai que l'action de ce processus est plus lente et moins spectaculaire que celle de la coagulation. Lors de la lésion d'un vaisseau sanguin, cette dernière permet son occlusion en 5 à 10 minutes, grâce à la formation d'un thrombus, mélange de globules rouges, de globules blanc et de plaquettes agglomérés par des filaments de fibrine. La fibrinolyse n'intervient qu'au bout de 24 heures pour dégrader la fibrine du caillot, de façon à éliminer cette occlusion devenue indésirable.

A l'état physiologique, la régulation du système fibrinolytique assure un bon équilibre entre la production et la dégradation du thrombus. Cette régulation est rendue possible par l'existence d'activateurs et d'inhibiteurs du plasminogène et toute anomalie de l'un des constituants entraînera un déséquilibre du système. Mais les affections du système fibrinolytique sont peu nombreuses et peu répandues.

Cependant, on s'est aperçu ces dernières années que l'enzyme intervenait dans de nombreux autres phénomènes physiologiques ou pathologiques. Parmi ceux-

ci, on trouve la réaction inflammatoire, la fonction phagocytaire des macrophages, l'ovulation et le processus d'invasion tumorale. Dans ce dernier cas, les protéines responsables de la lyse de la fibrine (le plasminogène et ses activateurs) sont impliquées dans la dissémination des cellules tumorales.

Le même système se retrouve dans le lait, après migration via la glande mammaire, sous la dénomination de "protéase alcaline". Dans le cas du lait de vache, les conséquences de son action sont tout à fait néfastes. En effet, ses substrats majeurs sont la caséine β et, dans une moindre mesure, la caséine α S2. Ces protéines ont, dans le lait, une importance considérable. Principalement regroupées en micelles, elles constituent dans ce milieu fort complexe une phase non soluble, en partie responsable de la turbidité du milieu. Mais surtout, elles représentent les protéines "fromageables" du lait, d'où leur importance du point de vue industriel.

Leur dégradation par la plasmine modifiera les caractères rhéologiques et organoleptiques des laits et réduira les rendements fromagers.

La protéase alcaline est donc un élément important de la qualité des laits et des productions fromagères. Or, actuellement, le paiement du lait est basé sur sa composition en matière grasse et matière protéique d'une part, sur sa qualité hygiénique et biologique d'autre part, mais peu sur sa qualité protéique.

Depuis 1975, date à laquelle il y avait sur le territoire français 780 000 exploitations possédant 7.5 millions de vaches laitières, le nombre d'exploitations et de vaches n'a cessé de diminuer, et il est prévu pour l'an 2000 environ 100 000 exploitations pour 5 millions de vaches laitières. Malgré ces diminutions, le volume de lait collecté continue d'augmenter au fil des ans. Cette augmentation du volume du lait fourni par vache s'est traduite par une baisse progressive de son taux protéique, impliquant une chute du rendement fromager, et de ses qualités organoleptiques.

De nombreux facteurs sont capables d'influencer la composition protéique des laits de vache : l'alimentation, la saison, le stade de lactation, la race, etc... Les progrès réalisés en génétique et en zootechnique, par exemple l'amélioration sanitaire des troupeaux, une meilleure alimentation, une amélioration des techniques d'élevage (habitat, traites, etc...) doivent permettre une augmentation de la qualité protéique des laits de vache. De même, la protéase alcaline, par son action sur les caséines, a un retentissement sur la qualité du lait, mais son implication n'est pas toujours bien cernée.

Il existe donc pour un même système enzymatique des conséquences très diverses de son action, selon le milieu biologique dans lequel il se trouve et selon ses substrats : un effet bénéfique de la fibrinolyse dans le sang (dégradation du

thrombus), des effets néfastes du même système dans les tissus (facilitation de l'invasion tumorale) et dans les laits (dégradation des caséines, économiquement dommageable).

Pour étudier ce système, il fallait se munir d'outils performants et présentant un certain nombre d'avantages. Nous avons choisi l'immunonéphélémétrie microparticulaire, telle qu'elle a été développée dans notre laboratoire.

En effet, c'est au début des années 80 que les chercheurs du laboratoire d'immunologie de la Faculté de Médecine de Nancy jetèrent les bases d'une technique originale et novatrice d'immunonéphélémétrie, en utilisant des microparticules de leur conception.

Celles-ci permettaient un couplage covalent et stable de molécules très variées et autorisaient des dosages jusqu'alors irréalisables par cette méthode dans certains liquides biologiques. De plus, la facilité de mise en oeuvre des protocoles de dosage, alliée à une grande sensibilité et une rapidité d'obtention des résultats sont autant d'atouts en faveur de cette méthode.

A l'heure actuelle, l'immunonéphélémétrie microparticulaire s'est développée dans le domaine de l'analyse biologique en clinique humaine (sous la gamme NEPHELIA®, Diagnostics Pasteur). De nombreux dosages de protéines aussi diverses que l'hormone gonadotrophine chorionique humaine, les hormones thyroïdiennes (triiodothyronine), la protéine C réactive, l'haptoglobine, l'orosomucoïde, l' α 1 antitrypsine, la transferrine, l' α 2 macroglobuline, la ceruloplasmine, ont été réalisés dans ce laboratoire.

Un certain nombre de protocoles expérimentaux ont été mis au point pour le dosage des protéines dans le lait, où la sensibilité de la méthode autorise l'utilisation directe de laits crus sans aucun pré-traitement, notamment dans le cas des caséines. Ainsi, le fait de disposer de la même technique de dosage pour évaluer les liens entre le plasminogène et la caséine β sera un avantage supplémentaire.

Objectifs du travail

Le but de ce travail est de disposer d'une méthode de dosage par immunonéphélémétrie microparticulaire du plasminogène qui permette son étude et celle de ses effets principaux sur ses substrats dans le lait bovin.

Dans un premier temps, nous détaillerons la mise au point du dosage du plasminogène dans le sang humain. Celle-ci bénéficiera de réactifs du commerce (antisérums, sérum calibré), de qualité contrôlée.

Après validation, ce système nous servira, dans un deuxième temps, de modèle pour mettre au point le dosage du plasminogène bovin dans le lait.

Tout d'abord, en nous fondant sur la forte homologie du plasminogène entre l'espèce humaine et l'espèce bovine, nous l'utiliserons directement pour évaluer le plasminogène bovin en milieu synthétique.

Nous élaborerons ensuite un système mono-espèce, totalement bovin, plus performant, dans lequel chaque réactif aura été purifié par nos soins. Ce système sera validé en milieu synthétique et servira de base au dosage d'échantillons de lait.

Puis nous étudierons l'effet de faibles dilutions de lait sur les réactifs microparticulaires, de façon à s'enquérir d'éventuelles influences du milieu sur le comportement de ces particules. En effet, les teneurs du plasminogène dans le lait, variant autour de 2 mg/L, n'autorisent pas, au vu de la sensibilité maximale de tels systèmes, de hautes dilutions des échantillons. Nous savons, pour avoir été décrit dans le sang, que des milieux biologiques peu dilués peuvent interférer sur l'agglutination spécifique des microsphères. Cette éventuelle influence sera évaluée sur un modèle de Ms sensibilisées par des IgG bovines.

Après avoir effectué cette étude, nous pourrions conclure le dosage par sa validation en milieu lait.

Dans un troisième temps, nous appliquerons le dosage par immunonéphélémétrie microparticulaire du plasminogène bovin du lait, ainsi que celui de son substrat principal, la caséine β , dans le cadre d'une étude de la qualité de laits de troupeaux. Ceux-ci seront sélectionnés en fonction de leur race et de leur teneur moyenne en matière protéique. Cette étude nous permettra d'évaluer la force des liens statistiques existants entre les deux paramètres.

Puis, nous tirerons les conclusions de ce travail et nous exposerons les perspectives qu'il laisse entrevoir dans le domaine de l'étude de la qualité des laits, notamment des marqueurs de cette qualité.

INTRODUCTION : LE PLASMINOGENE

DOSAGE Pg SÉRIQUE HUMAIN



DOSAGE Pg BOVIN
Système inter-espèces



DOSAGE Pg BOVIN
Système mono-espèce



INTERFERENCES
MILIEU LAIT



DOSAGE Pg LAIT BOVIN



APPLICATION A LA QUALITE DES LAITS
Pg lait
Caséine bêta

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

PREMIERE PARTIE

**LE SYSTEME
PROTEOLYTIQUE DU
PLASMINOGENE**

LE SYSTEME PROTEOLYTIQUE DU PLASMINOGENE

I/ INTRODUCTION : LES PROTÉASES À SÉRINE

Les protéases, enzymes très répandues dans la nature, sont d'origine animale, végétale ou microbienne. Elles hydrolysent les chaînes polypeptidiques des protéines.

Elles sont subdivisées en quatre types, dont les protéases à sérine, qui possèdent un résidu sérine au niveau de leur site actif et sont inhibées spécifiquement par le di-isopropylfluorophosphate (DFP) et d'autres dérivés organophosphorés (MIHALYI, 1972).

Le mécanisme d'action des protéases à sérine procède en deux étapes:

Dans la première étape, il y a formation d'une liaison covalente entre un carbonyle du substrat et le groupe hydroxyle de la sérine du centre actif de l'enzyme. On obtient un état de transition où le carbone du substrat est dans un état "tétraédrique", car lié à quatre groupes. La liaison peptidique C-N est alors coupée et on obtient un intermédiaire acyl-enzyme (figure 1.1) :

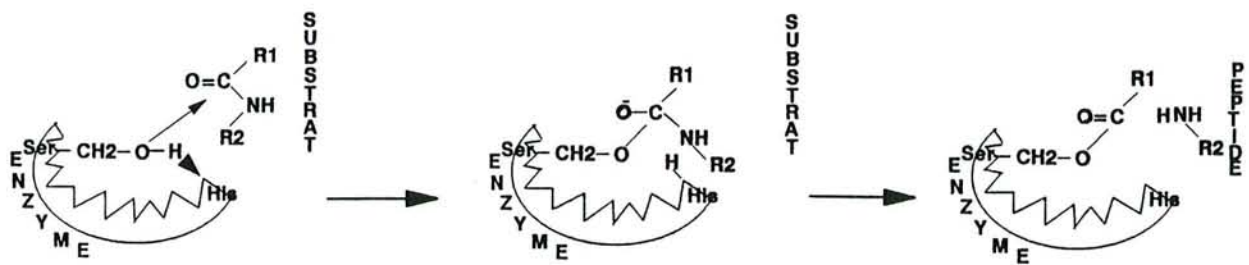


Figure 1.1: Mécanisme d'action des protéases à sérine: première étape (d'après BRANDEN et TOOGE, 1991)

Dans la deuxième étape, cet intermédiaire est hydrolysé par une molécule d'eau. Cette déacylation passe aussi par un état de transition "tétraédrique", avant la libération du second produit d'hydrolyse et la restauration de l'hydroxyle de la sérine (figure 1.2) :

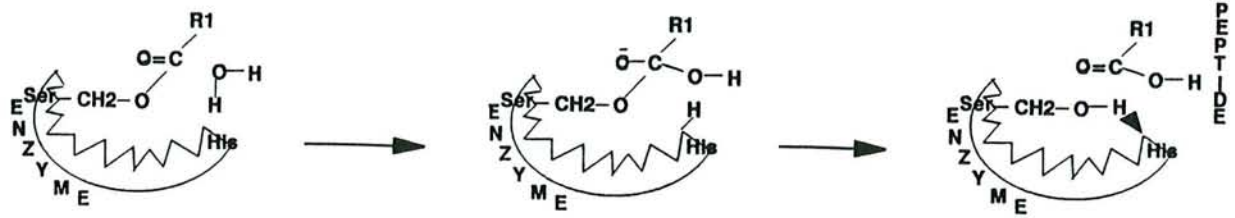


Figure 1.2: Mécanisme d'action des protéases à sérine: deuxième étape
(d'après BRANDEN et TOOGE, 1991)

Le site actif est en fait composé de trois résidus: une sérine, dont le rôle vient d'être cité, une histidine, qui est l'accepteur de proton du groupe hydroxyle de la sérine et une asparagine. Ces trois résidus peuvent être éloignés dans la séquence polypeptidique de l'enzyme, mais ils sont toujours proches les uns des autres dans l'espace.

III/ LE SYSTEME FIBRINOLYTIQUE HUMAIN

A/ Le plasminogène humain

A.1/ Caractères généraux

Le plasminogène (Pg) est le précurseur de la plasmine. C'est une glycoprotéine contenant environ 2% de copule glucidique, qui migre à l'électrophorèse avec les alpha2 globulines.

Le plasminogène est codé par un locus situé sur le bras long du chromosome 6 (région 6q26-q27)(MURRAY et al, 1987). Il est synthétisé principalement dans le foie (85%)(OWENS et CIMINO, 1985), bien qu'il existe une production locale dans les tubes séminifères (SAKSELA et VIHKO, 1986), les éosinophiles (BARNHART et RIDDLE 1963) et le rein (HIGHSMITH et KLINE, 1971). Sa demi-vie est de 2 jours à 2 jours 1/2 (COLLEN et VERSTRAETE, 1975).

La concentration plasmatique varie, suivant les auteurs, de 120 à 200 mg/L chez

l'adulte (LEIPNITZ et al, 1988; MIYASHITA et al, 1988). Aucune différence notable n'est enregistrée selon le sexe, ni au cours du rythme circadien (LEIPNITZ et al, 1988); cependant on note une diminution de son activité avec l'âge (TAKADA et TAKADA, 1988).

La production de plasminogène est observée dès la 10^{ème} semaine de vie foetale (SCHLEGEL et al, 1986), avec une concentration plus basse chez le nouveau-né (entre 28 et 50% de la valeur adulte), mais les molécules sont identiques et d'activité comparable (SUMMARIA, 1989). Les taux adultes sont atteints en 13 semaines.

Le plasminogène circule dans le plasma sous forme libre (20%) ou sous forme liée, principalement à l' Histidin Rich GlycoProtein (HRGP, 50%) qui agit alors comme un inhibiteur de la fibrinolyse. Il est à noter que, chez le nouveau-né, l'HRGP a des taux plus bas que le plasminogène, comparativement aux valeurs de l'âge adulte, ce qui contrebalancerait l'état hypofibrinolytique souvent observé à la naissance (CORRIGAN et JETER, 1990). Outre l'HRGP, le plasminogène se lie à bon nombre de molécules, notamment le fibrinogène (15%) et l' α_2 antiplasmine.

On note une augmentation des taux du plasminogène au cours des états inflammatoires et une diminution dans les atteintes hépatiques et au cours des traitements thrombolytiques.

A.2/ Structure du plasminogène humain

Le plasminogène est composé d'une chaîne de 790 acides aminés, stabilisée par 24 ponts disulfures, cinq structures en boucles ou "kringles" et un domaine d'activité des protéase à sérine (figure 1.3) :

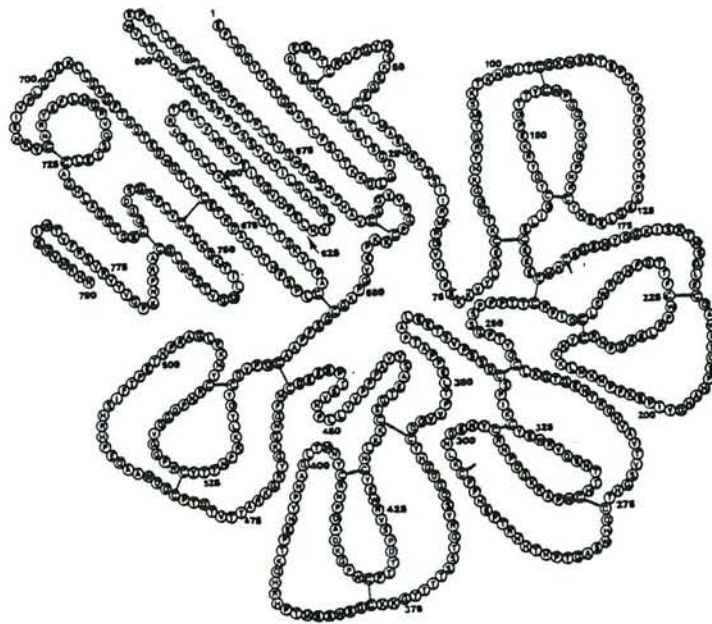


Figure 1.3: Structure du plasminogène humain
(SOTTRUP-JENSEN et al, 1978)

Il a une structure secondaire faite principalement d'enroulements aléatoires (80%) mais aussi de feuillets β (20%) (SJOHOLM et al, 1973). Sa structure spatiale est en forme de filament, d'un diamètre de 2.2 à 2.4 nm, d'une longueur de 22 à 24 nm (figure 1.4) :

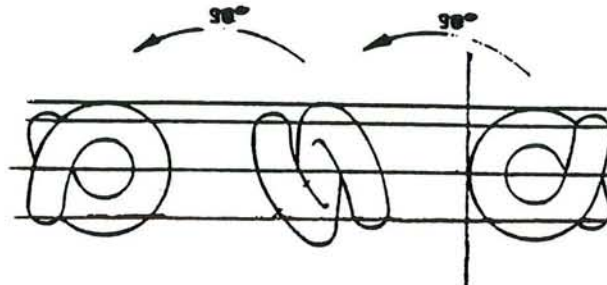


Figure 1.4: Représentation spatiale du plasminogène humain
(TRANQUI et al, 1979)

En solution, c'est une molécule compacte (distance intramoléculaire maximale: 9.1 +/- 0.3 nm) qui serait en spirale droite (PONTING et al, 1992).

Dans le plasminogène natif, le résidu C terminal est l'asparagine et le N terminal est l'acide glutamique; on le note Glu-Pg. Soumis à l'action de la plasmine, le Glu-Pg

devient le Lys-Pg par clivage de la liaison Lys76 - Lys77 qui libère le peptide d'activation (CLAEYS et al, 1973).

Chaque forme a deux variants qui diffèrent suivant le degré de glycosylation: le variant I est N-glycosylé en Asn288 et O-glycosylé en Thr345, alors que le variant II est uniquement O-glycosylé en Thr345 (HAYES et al, 1979 a et b). Chaque variant diffère suivant sa composition en acide sialique; on note alors six formes possibles pour chacun, distinctes par leur point isoélectrique (de 6.1 à 6.6 pour le Glu-Pg et de 7.2 à 8.3 pour le Lys-Pg) (WALLEN et WIMAN, 1970; SIEFRING et CASTELLINO, 1974).

Une désialylation de l'oligosaccharide lié à la Thr345 provoque l'apparition d'une activité amidolytique et fibrinolytique spontanée chez le variant II du plasminogène (STACK et al, 1992a). La composition de la copule glucidique influence donc les propriétés biologiques du plasminogène, ce que confirment GONZALEZ-GRONOW et al (1990), ainsi que DAVIDSON et CASTELLINO (1993) sur des plasminogènes humains recombinants: leur activation à l'urokinase et leur affinité aux acides aminocarboxyliques sont modifiées selon la nature des oligosaccharides liés au plasminogène.

Glu et Lys-Pg, de par des conformations différentes, ont des propriétés fonctionnelles différentes: une demi-vie trois fois plus grande pour le premier, mais une activation en plasmine (Pm) plus rapide pour le second (ROBBINS et al, 1973).

A partir du plasminogène natif d'autres formes de masse moléculaire inférieure peuvent être obtenues par digestion protéolytique; leur dénomination est basée sur l'acide aminé terminal. Ainsi, le plasminogène, soumis à l'action d'une protéolyse limitée par l'élastase, peut donner le miniplasminogène (Leu449-Pg) ou le néoplasminogène (Val442-Pg) (SOTTRUP-JENSEN et al, 1978); suite à une incubation avec de l'urokinase exempte de plasmine, on obtient du microplasminogène (SHI et WU, 1988). Les différents plasminogènes et leurs fragments sont reportés dans le tableau 1.1 :

Tableau 1.1 : Séquences des différents fragments du plasminogène humain

| <u>Séquence peptidique</u> | <u>Masse molaire (Da)</u> |
|----------------------------|---------------------------|
| Glu-Pg variant I | 91 500 |
| Glu-Pg variant II | 89 300 |
| Met69-Pg > | 85 000 |
| Lys77-Pg > | à |
| Val78-Pg > | 83 000 |
| Chaîne lourde A | 60 000 |
| Val354-Pg | 50 000 |
| Val442-Pg (néoPg) | 38 000 |
| Leu449-Pg (miniPg) | 37 000 |
| Lys530-Pg (microPg) | 28 600 |
| Chaîne légère B | 25 000 |
| Peptide d'activation | 7 000 |

La chaîne lourde du plasminogène (ou chaîne A) contient 560 résidus (Glu₁ à Arg₅₆₀), pour une masse molaire de 60 000 Da. Elle est composée, outre du peptide d'activation en position 1 à 76, de cinq kringles, notés de 1 à 5, formant chacun une structure en boucle de par la présence de trois ponts disulfures. Chaque kringle a une masse molaire d'environ 10 000 Da, pour 80 résidus.

Ce type de structure se retrouve dans la prothrombine, le facteur XII, l'urokinase et l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA) (CASTELLINO, 1987); quant à l'apolipoprotéine(a), elle comprend dans sa structure une répétition de certains kringles, en particulier 37 fois le kringle 4 (Mac LEAN et al, 1987).

Les kringles renferment des sites d'affinité à la lysine (SAL), sur lesquels se fixent de façon spécifique: la lysine, l' ϵ AAC, et l'acide tranexamique. Les SAL permettent

au plasminogène de se lier à la fibrine pour la fibrinolyse et à de nombreuses autres molécules du sang.

La chaîne légère du plasminogène (ou chaîne B) contient 230 résidus (de Val561 à Asn790) pour une masse molaire de 25 000 Da. Elle contient le site actif composé de la triade: His en position 602, Asp en 645 et Ser en 740. L'activation en plasmine provoque, outre la coupure du peptide d'activation, une coupure entre l'Arg560 et la Val561; il en résulte la formation d'une molécule composée de deux chaînes reliées par un pont disulfure et dont le site actif est accessible pour le substrat.

A.3/ Sites de fixation

A.3.1/ Fixation à la lysine

A.3.1.1/ Les sites d'affinité à la lysine

Le plasminogène, dans sa forme native, contient des sites d'affinité à la lysine, qui sont responsables de la formation de complexes avec les acides aminocarboxyliques (ϵ AAC, Lys).

Ces sites sont situés sur la chaîne lourde A, au niveau du kringle 1 pour le site de haute affinité et au niveau des quatre premiers kringles pour les sites d'affinité plus faible (SOTTRUP-JENSEN et al, 1978). VALI et PATTHY (1982) proposent un deuxième site de haute affinité qui serait localisé sur le kringle 4 du Glu-Pg, mais non accessible; mais selon MILES et PLOW (1986), des anticorps dirigés contre le SAL de haute affinité du kringle 1 ne reconnaissent pas le kringle 4 seul.

Bien que le mini plasminogène ne soit pas retenu par la Lysine-Sepharose, le kringle 5 isolé se lie à la fibrine et aux acides aminocarboxyliques par un SAL de nature particulière (THEWES et al, 1990).

L'affinité à la lysine peut être diminuée par photo-oxydation des résidus histidine (perte de 90% après cinq minutes) ou de façon réversible par blocage de ceux-ci par du diethyl-pyrocarbonate (LERCH et RICKLI, 1980). La réduction et l'alkylation des ponts disulfures des kringles provoquent une perte complète de l'affinité des kringles 1 et 4 pour la lysine par effondrement de leurs structures spatiales.

Pour les kringles 1 et 4 isolés, l'histidine en position 31 et l'asparagine en 54, avec leurs chaînes acido/basiques, semblent être impliquées dans ce phénomène par des interactions électrostatiques avec les acides aminocarboxyliques: l'imidazole de l'histidine interagirait avec le groupement carboxylique de ceux-ci alors que leur fonction epsilon aminée interagirait avec un groupement carboxylique, préférentiellement celui de l'asparagine (figure 1.5) :

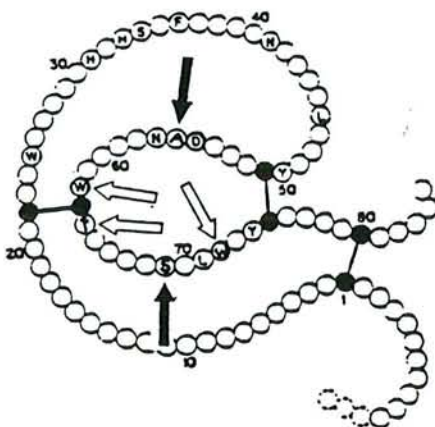


Figure 1.5: Résidus des kringles 1-4 impliqués dans les SAL
(LERCH et RICKLI, 1980)

D'autres auteurs citent l'Asp56 et l'Arg69 comme résidus impliqués dans l'affinité du kringle 4 avec l' ϵ AAC (TREXLER et al, 1982). Plus récemment, des modèles de SAL furent proposés pour le kringle 4 impliquant, en plus de ceux déjà cités, des résidus aromatiques de la boucle intérieure du kringle: Phe64, Trp62 et Trp72, agissant par des interactions hydrophobes avec le squelette hydrocarboné des acides aminocarboxyliques (figure 1.6) :

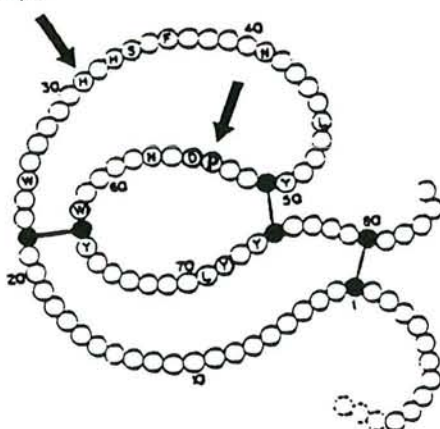


Figure 1.6 : Résidus du kringle 4 impliqués dans les SAL
(RAMESH et al, 1987)

Un modèle similaire fut proposé pour le kringle 1, avec toutefois un résidu extérieur à la boucle centrale: Trp62, Trp72 et Phe36 (MOTTA et al, 1987).

Il est essentiel pour les SAL que la structure en boucle du kringle soit conservée par les trois ponts disulfures, en particulier celui formant la boucle intérieure (Cys51-Cys75).

La présence de lysine sur ces sites provoque un changement de la conformation du plasminogène d'une forme relativement compacte à une forme plus ouverte (SJOHOLM et al, 1973).

Dans la conformation native compacte et spiralée du plasminogène, les kringles se trouvent relativement proches du domaine protéase à sérine, grâce à une interaction entre le peptide d'activation et le site d'affinité aux résidus 6-amino hexane (site 6AH) du kringle 5. La liaison d'une lysine, d' ϵ AAC ou de benzamidine au kringle 5 provoque une rupture de cette interaction et le passage à une forme ouverte du plasminogène, dans laquelle le site actif serait accessible (PONTING et al, 1992):

Selon CHRISTENSEN et MOLGAARD (1992), ce sont deux SAL qui gouvernent le changement conformationnel du plasminogène: un sur le kringle 4 et un sur le 5. Le site amino-hexane du kringle 5 serait de plus responsable de la fixation à la fibrine.

TAKADA et al (1993) estiment que les SAL responsables de la liaison au peptide d'activation sont situés sur les kringles 1 ou 4, mais en aucun cas sur le kringle 5. De plus, ils situent la partie du peptide responsable de la liaison autour de la lysine en position 50.

Lors de l'hydrolyse du fibrinogène par la plasmine, ce sont les SAL autres que ceux de la région kringle 1-3 qui sont d'importance primordiale: la réponse est la même que l'on utilise le Lys-Pg ou le Val-Pg (MORRIS et CASTELLINO, 1983).

A.3.1.2/ Les molécules affines

A.3.1.2.a/ Fibrinogène-Fibrine

Le plasminogène natif se lie à la fibrine et au fibrinogène; la forme Lys-Pg (K_d 0.32 μ M) a une plus grande affinité que la forme Glu-Pg (K_d 38 μ M) et que certains fragments isolés (LUCAS et al, 1983).

Le Glu-Pg, en se liant à la fibrine, implique deux sites de faible affinité dont un sera augmenté par un changement de conformation de la molécule; le Lys-Pg n'a qu'un site, mais de forte affinité. Seul le fragment E des produits de dégradation du fibrinogène se lie au plasminogène. De plus, en se liant à la fibrine, le plasminogène est protégé contre les inhibiteurs de protéase (WIMAN et COLLEN, 1978).

A.3.1.2.b/ Acide ϵ amino caproïque

Le plasminogène se lie à l' ϵ AAC avec un kd de 9 μ M pour le site de haute affinité et de 5mM pour les cinq autres. A des faibles concentrations (1 μ M à 0.1mM), l' ϵ AAC diminue l'activation du plasminogène par l'urokinase par saturation du site de forte affinité; il joue donc un rôle antifibrinolytique. A des concentrations plus élevées (0.1 à 1 mM), l'activation du plasminogène est amplifiée: la saturation des sites secondaires a provoqué l'ouverture de la molécule de plasminogène (MARKUS et al, 1978).

Le plasminogène se lie plus facilement à l' ϵ AAC qu'à la lysine (Kd: 0.45mM contre 68mM pour la lysine et 43 mM pour la Lysine -Sepharose), mais moins qu'à l'acide trans-4-aminométhyle cyclohexane-1 carboxylique (t-AMCHA) (kd de 80 μ M) (BROCKWAY et CASTELLINO, 1972; BOK et MANGEL, 1985).

A.3.1.2.c/ α 2 Antiplasmine

L' α 2 Antiplasmine (α 2AP), qui est l'inhibiteur physiologique principal du plasminogène dans le plasma, se lie à ce dernier par un SAL, selon un mécanisme qui implique le résidu amine de la Lys₁₀ et le résidu carboxyle de la Lys₂₆, situées dans la partie C-terminale de l'inhibiteur (SUGIYAMA et al, 1988).

A.3.1.2.d/ Histidin Rich GlycoProtein

L'HRGP se lie au plasminogène par des SAL (LIJNEN et al, 1980).

A.3.2.1.e/ Protéines d'adhésion

Une protéine d'adhésion, la thrombospondine, se lie spécifiquement au plasminogène et à la partie non enzymatique de la plasmine, par un site indépendant des SAL des kringles, mais influencé par eux. Ce site se trouverait sur le kringle 5. La

thrombospondine pourrait former un complexe trimoléculaire avec le plasminogène et l'HRGP (DePOLI et al, 1989).

La vitronectine, autre molécule d'adhésion, se lie aussi spécifiquement au plasminogène avec un kd de 0.4 μ M (PREISSNER, 1990).

Le collagène de type IV, composant de la matrice extra cellulaire, se lie aux SAL du plasminogène (kd 11.5nM), de même que la gélatine (kd 12.7nM) (STACK et al, 1992b).

A.3.2.1.f/ Immunoglobulines

Le plasminogène se lie aux immunoglobulines par le résidu lysine C-terminal de leur Fab. Lors de réactions inflammatoires, les IgG localisées dans le tissu extravasculaire sous forme de complexes Ag/Ac retiennent du plasminogène. Celui-ci, s'activant en plasmine, permettrait la formation de médiateurs de l'inflammation ou au contraire augmenterait la protéolyse du tissu (HARPEL et al, 1989). Ainsi, les IgG , protéines non-adhésives, pourraient concentrer le plasminogène à la surface cellulaire.

A.3.2.1.g/ Cellules sanguines

De nombreuses cellules du sang sont capables de se lier au plasminogène via des récepteurs qui sont des sites de fixation au Glu-Pg (MILES et al, 1988a). L'affinité est de type SAL (principalement sur les kringles 1,2,3).

Les premiers récepteurs furent identifiés sur les plaquettes, avec un kd d'environ 2 μ M (MILES et PLOW, 1985). Depuis, on en a décrit sur les lymphocytes , les granulocytes (MILES et PLOW, 1987) et sur les monocytes et les macrophages (SILVERSTEIN et al, 1988), ce qui pourrait être une voie physiologique importante de l'activité protéolytique à la surface des cellules inflammatoires.

La plasmine, en dehors de son rôle dans la fibrinolyse, a souvent été mise en cause dans des processus de migration cellulaire comme la réponse inflammatoire ou l'invasion tumorale.

Des récepteurs furent décrits sur des cultures cellulaires de fibroblastes (PLOW

et al, 1986) et de cellules endothéliales (HAJJAR et al, 1986; MILES et al, 1988b).

Les hépatocytes de rat se lient non seulement au plasminogène de rat, mais aussi aux plasminogènes bovin, ovin, porcine et canin, ce qui indique une conservation de la structure des SAL entre les espèces (HALL et al, 1989).

Le plasminogène se lie à la paroi de certaines bactéries Gram négatives (ULLBERG et al, 1990); activé, il pourrait jouer un rôle dans la virulence bactérienne (ULLBERG et al, 1992).

Il est intéressant de noter que des récepteurs du plasminogène se trouvent présents sur de nombreuses cellules tumorales (BURTIN et FONDANECHÉ, 1988) et que des récepteurs de l'urokinase leur sont souvent associés sur les mêmes cellules (PLOW et al, 1986).

A.3.2/ Fixation de la benzamidine

Le plasminogène a une affinité pour la para-aminobenzamidine. Le site principal de fixation se trouve sur le kringle 5. Il existe un site secondaire sur la chaîne légère. (VARADI et PATTHY, 1981). Le site principal est composé des Trp522 et Tyr532 (THEWES et al, 1987).

A.3.3/ Fixation de l'héparine

Le site de liaison à l'héparine est situé sur la chaîne légère, dont un ou deux résidus lysine sont essentiels pour sa fixation (SOEDA et al, 1989).

Le sulfate d'héparine peut former un complexe avec le plasminogène en phase liquide et stimule son activation en le rendant plus accessible au tPA (ANDRADE-GORDON et STRICKLAND, 1986).

L'héparine forme avec le plasminogène et son activateur tissulaire un complexe trimoléculaire par leurs chaînes B respectives, qui serait responsable de l'accessibilité de l'enzyme pour son effecteur (SOEDA et al, 1987).

L'héparan sulfate, proche de l'héparine, se trouve sur de nombreuses surfaces cellulaires. Il semble qu'il participe à l'adhésion cellule-substrat en liant la cellule aux composants de la matrice extra-cellulaire tels la fibronectine et la laminine. Or, la

plasmine, se fixant à l'héparan sulfate, pourrait dégrader fibronectine et laminine et participer au processus d'invasion tumorale (GALLAGHER et al, 1986).

Ces sites de fixation à l'héparine peuvent donc renforcer le contact entre les composés fibrinolytiques et la matrice extra-cellulaire.

A.3.4/ Autres

Le plasminogène s'adsorbe fortement à des surfaces artificielles telles que le verre et les matières plastiques (SUENSON et THORSEN, 1981). Tout contact prolongé avec ces matériaux nécessitera donc une saturation préalable des parois.

A.4/ Le plasminogène dans les espèces animales

Par rapport au plasminogène humain, le plasminogène bovin (786 résidus d'acides aminés) subit 5 délétions (Val447, Val448, Leu449, Pro539, Thr574) et une insertion (Pro65).

L'homologie entre les deux est de 84% pour la chaîne lourde (kringle 1: 75%, kringles 4: 90%) et de 80% pour la chaîne légère (de 71 à 90% dans le domaine protéase à sérine et 65% pour la partie N-terminale)(SCHALLER et al, 1985). Le mini plasminogène porcine a lui une homologie de 83% avec l'humain (MARTI et al, 1985).

L'architecture moléculaire reste la même quelles que soient les espèces, avec cinq kringles et un domaine enzymatique et, malgré des différences sur certains acides aminés, les rôles biologiques sont conservés.

Les plasminogènes humain, félin et simien sont activés par la streptokinase; les plasminogènes canin et léporin sont activés par de grandes quantités de streptokinase; quant aux plasminogènes bovin, porcine, ovin et murin, ils ne sont pas activables par celle-ci. A noter que le plasminogène de poussin est le seul qui possède un N-Glycane lié à l'Asn34, les autres l'ayant au niveau de l'Asn 288/289. (SCHALLER et RICKLI, 1988).

A.5/ Homologie avec les apolipoprotéines(a)

A.5.1/ Constitution des lipoprotéines(a)

Les lipoprotéines(a) ou lp(a) sont proches des lipoprotéines de faible densité (LDL) de par leur composition lipidique et la présence d'apolipoprotéine B100; elles s'en distinguent par la présence d'une protéine additionnelle : l'apolipoprotéine(A) ou apo(A). Mais la lp(a) n'est pas un produit du métabolisme des LDL (KREMPLE et al, 1979).

La masse moléculaire des apo(A) est de 280 000 à 500 000 Da, suivant les différentes isoformes; elles sont liées par des ponts disulfures aux apo(B). La concentration des lp(a) est variable, de 10 à 1000 mg/L, mais on estime qu'au dessus de 250 mg/L, le risque d'athérosclérose et d'infarctus myocardique s'élève (BERG et al, 1974).

A.5.2/ Lien avec l'HPg

Les apo(a) présentent la particularité d'avoir une similitude de séquence avec le plasminogène. En effet, on retrouve des régions qui ont une homologie de séquence avec le kringle 4 (de 77 à 100%) et le début du kringle 5 (EATON et al, 1987).

La lp(a) se lie à une colonne de Lysine-Sepharose, et en est éluée de façon identique au plasminogène, mais avec une affinité plus faible; elle est aussi reconnue par des antisérums anti-plasminogène (KARADI et al, 1988).

De plus, l'apo(A) contient un domaine protéase complet, mais où l'Arg du site actif est remplacée par une Ser, ce qui semblerait aller de pair avec le fait qu'il ne soit activable ni par le tPA, ni par l'urokinase ou la streptokinase (EATON et al, 1987).

Les apo(A) pourraient alors exercer leur activité athérogène en se liant au caillot de fibrine à la place du plasminogène et en empêchant celui-ci d'agir.

L'étude des gènes des apo(A) confirme l'homologie de séquence du domaine sérine protéase et du kringle 4, qui est répété 37 fois. Le gène des apo(A) viendrait d'une duplication de celui du plasminogène lors de l'évolution des espèces chez les

mammifères, et la similitude de leurs séquences est plus grande que celle observée entre les séquences des plasminogènes humain et bovin (Mac LEAN et al, 1987).

Selon Van der HOEK et al (1993), les lp(a) présentent des variants isoformes qui diffèrent dans le nombre de répétitions du kringle 4 et dans l'homologie à ce kringle.

A.5.3/ Rôle athérogène des lp(a)

Bien que les lp(a) ne se lient pas à la fibrine en solution, elle se lient à une protéine d'adhésion, la tétranectine, avec une affinité supérieure à celle du plasminogène, ce qui pourrait expliquer leur propriété athérogène (KLUFT et al, 1989).

Récemment, EDELBERG et PIZZO (1992) ont démontré que les lp(a) déplacent la plasmine de sa liaison avec le fibrinogène, la rendant plus exposée à l'inhibition par l' α 2 antiplasmine.

Les lp(a) semblent même entrer en compétition avec le plasminogène pour les récepteurs cellulaires de ce dernier (MILES et al, 1989), mais sont absentes des récepteurs situés à la surface de cellules tumorales, restant localisées dans le flux sanguin (CORREC et al, 1990).

A.6/ Purification du plasminogène et de ses fragments

La méthode la plus utilisée est la chromatographie d'affinité sur Lysine-Sepharose, dont on sait qu'elle retient et élue sélectivement le plasminogène sanguin (DEUTSCH et MERTZ, 1970). L'interaction avec certains colorants pour textiles immobilisés sur des billes d'agarose a aussi été utilisée (BERTRAND, 1986).

Une digestion du plasminogène par de l'élastase sépare les kringles 1 à 4 du miniplasminogène (MARTI et al, 1985), alors qu'une coupure autocatalytique par de la plasmine donne le microplasminogène (WU et al, 1987; SHI et WU, 1988).

Le clivage par du bromure de cyanogène (CNBr) et la fragmentation par la protéase de *Staphylococcus aureus* V8, l'élastase ou la trypsine permettent d'isoler de plus petits fragments (SOTTRUP-JENSSEN et al, 1978).

A.7/ Dosage du plasminogène et mesure de son activité dans le sang

A.7.1/ Immunodosages

Le dosage du plasminogène peut être basé sur son antigénicité. Des dosages par immunodiffusion radiale (RIFE et al, 1963) sont proposés, mais présentent l'inconvénient d'être longs (24 heures). L'immunoélectrophorèse (LAURELL, 1966) ou l'immunonéphélométrie laser (PARVEZ et al, 1979) sont des méthodes plus sensibles (de l'ordre du $\mu\text{g/mL}$) et rapides (2 heures).

La technique radioimmunologique (RIA) est une méthode beaucoup plus sensible (sensibilité inférieure au nanogramme), mais qui nécessite un appareillage spécifique et des conditions d'utilisation contraignantes (FELBER, 1978).

Une méthode rapide et automatisable d'immunodosage basée sur le comptage de particules de latex sensibilisées par les anticorps spécifiques de la molécule à doser a été décrite pour le plasminogène (BORQUE et al, 1989).

A.7.2/ Mesure de l'activité

L'activité du plasminogène peut être déterminée par différents types de tests :

Les premiers utilisent son activité fibrinolytique: l'action de la plasmine sur le caillot peut être mesurée par le temps de lyse du caillot (BERG et al, 1966), mais ceci présente plusieurs inconvénients:

- Il faut détruire l' α_2 antiplasmine qui inhibe rapidement la plasmine (soit par acidification du plasma, soit par précipitation des euglobulines) ou bien diluer fortement l'échantillon (> 1:75) pour éviter son action.
- Il faut activer le plasminogène (par de la streptokinase ou de l'urokinase) et ajouter au milieu de la thrombine pour la formation du caillot et du fibrinogène en cas de forte dilution. Ces tests présentent l'avantage d'être semi-automatisables.

D'autres tests utilisent l'activité caséinolytique du plasminogène (HEDNER et NILSSON, 1965).

Mais depuis quelques années, l'introduction de substrats synthétiques a

considérablement amélioré ce type dosage: le substrat le plus couramment utilisé est le S-2251 (Kabi diagnostic, Suède) qui libère de la p-nitroaniline. (FRIBERGER et KNOS, 1979; KULSETH et HELGELAND, 1992).

Un test utilisant un substrat fluorescent (l'ester diméthylé de l'acide D-val-leu-lys-5-amidoisophtalique) a aussi été décrit (POCHRON et al, 1978).

Tous ces tests nécessitent une standardisation pour pouvoir être comparés (GAFFNEY, 1988) et utilisés de façon automatisable (BAS et al, 1987).

B/ FIBRINOGENÈ ET FIBRINE, SUBSTRATS PHYSIOLOGIQUES DU PLASMINOGENÈ

B.1/ Le fibrinogène

C'est une molécule d'une masse moléculaire de 340 000 Da, composée de trois chaînes polypeptidiques: A α (610 résidus), B β (461 résidus) et γ (410 résidus). Ces chaînes sont enroulées les unes aux autres et reliées par des ponts disulfures. Le tout est lié à une molécule identique de façon symétrique pour former un dimère, dont la partie centrale forme le domaine E et les deux extrémités le domaine D (figure 1.7) :

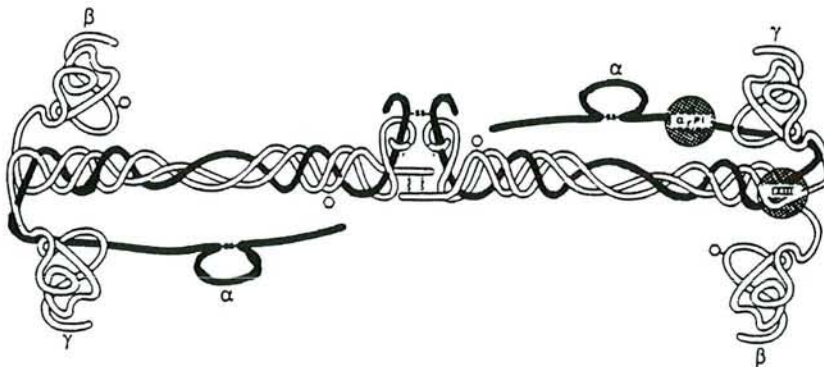


Figure 1.7: Représentation de la structure spatiale du Fibrinogène (HENKIN et al, 1991)

A l'état physiologique, il n'y a pratiquement pas de fibrinogénolyse; en effet, le substrat naturel de la plasmine est la fibrine et non le fibrinogène.

B.2/ La fibrine

C'est la thrombine qui permet la conversion de fibrinogène en fibrine. Celle-ci clive un peptide de 16 acides aminés de la partie N-terminale de la chaîne A α , puis un peptide de 14 acides aminés de la même partie de la chaîne B β . La partie centrale ainsi découverte peut s'associer avec deux domaines D de deux autres fibrinogènes, en se chevauchant à moitié et se polymériser avec d'autres monomères pour former une protofibrille.

La consolidation du réseau de fibrine se fait par le Facteur XIIIa, qui est une transamidase plasmatique. Celui-ci catalyse la formation de liaisons covalentes entre des Lys et des Glu situés sur la partie C-terminale des chaîne γ de deux monomères: c'est le phénomène de "crosslink" γ - γ . Le facteur XIIIa effectue ensuite une transamidation entre les Lys et Glu de la partie C-terminale de la chaîne α ; c'est le "crosslink" α (figure 1.8) :

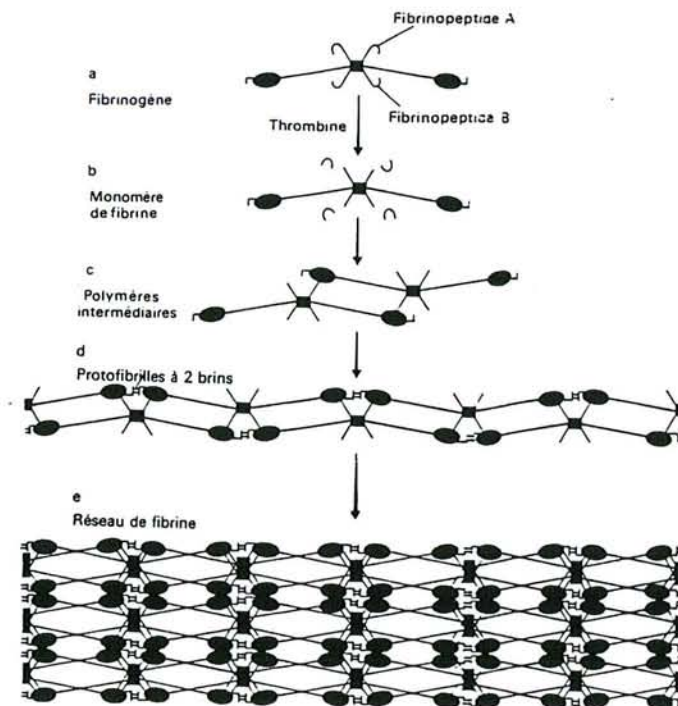


Figure 1.8 : Formation du réseau de Fibrine: phénomène du "Crosslink α "
(FRANCIS et MARDER, 1982)

Ces dernières liaisons ne sont pas coupées par la plasmine. Les produits de dégradation du fibrinogène et de la fibrine seront donc différents. (BACHMANN, 1986).

C/ LES ACTIVATEURS DU PLASMINOGÈNE

Les activateurs sont répertoriés en deux groupes, selon qu'ils existent sous forme de précurseurs dans l'organisme (sang ou tissus): voie endogène, ou qu'ils y sont apportés à visée thérapeutique: voie exogène (REBOUD-RAVAUX, 1985).

La figure 1.18, en fin de chapitre II, résume les principaux mécanismes entrant en jeu lors de la fibrinolyse.

C.1/ Activateurs de la voie endogène

C.1.1/ Voie extrinsèque

Dans cette voie, ce sont les cellules qui libèrent l'activateur dans le sang, pour permettre à la plasmine d'agir sur le caillot de fibrine.

Les dépôts de fibrine situés en dehors du flux sanguin peuvent être éliminés car tous les canaux étroits (canaux lacrymaux, voies biliaires, cordon spermatique, canaux galactophores) et le canal urinaire contiennent un activateur du plasminogène capable de dissoudre le caillot.

C.1.1.1/ L'activateur tissulaire du plasminogène

Il est essentiellement synthétisé et libéré dans le flux sanguin par les cellules endothéliales vasculaires (veines et capillaires), à une concentration de 7 à 15 µg/L (dont un tiers seulement constitue le tPA actif, le reste étant complexé à son inhibiteur), avec une demi-vie brève (cinq minutes)(KORNINGER et al, 1981).

Les taux sanguins sont influencés par l'âge et le sexe de la personne (ELIASSON et al, 1993): le tPA augmente avec l'âge et est plus élevé chez l'homme que chez la femme, sauf dans la classe d'âge supérieure.

Il existe une synthèse locale puisqu'on en retrouve dans les larmes (TERVO et al, 1989) et dans le sperme (MAIER et al, 1991).

C'est une sérine protéase d'une masse moléculaire de 68 000 Da, composée d'une seule chaîne polypeptidique de 527 acides aminés, qui, en présence de plasmine, est coupée en Arg275-Val276, conduisant à la formation de deux chaînes liées par un pont disulfure (figure 1.9) :

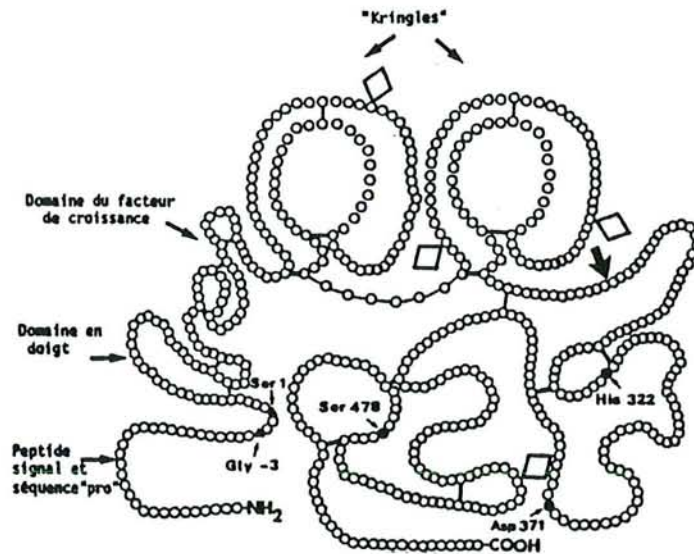


Figure 1.9 : Structure de l'activateur tissulaire du Plasminogène (tPA)
(SAMAMA, 1990a)

La chaîne A (N-terminale, 40 000 Da) possède deux kringles (proches des kringles 4 et 5 du plasminogène), un domaine ressemblant au facteur de croissance épithélial humain (53-90) et un domaine homologue aux structures "en doigt" de la fibronectine (PENNICA et al, 1983). Ce dernier domaine est responsable de la fixation à la fibrine (BANYAI et al, 1983).

La chaîne B (C-terminale, 30 000 Da), quant à elle, contient le centre actif avec la triade: Asp371, His322, Ser478. Il est à noter que la forme monocaténaire présente une activité comparable à la forme double chaîne (RIJKEN et al, 1982).

La molécule de tPA présente deux variants caractérisés par des masses moléculaires différentes dues à une glycosylation différente (POHL et al, 1984). Le tPA présente une forte affinité pour la fibrine avec un Kd de 150nM (THORSEN, 1975); en présence de celle-ci, qu'il soit mono ou double chaîne, son activité est identique (RANBY, 1982).

En présence de Glu-Pg, l'affinité du tPA pour la fibrine est très augmentée et l'activation du plasminogène est facilitée par alignement de l'enzyme et de son substrat, formant avec la fibrine un complexe ternaire (HOYLAERTS et al, 1982).

Le tPA peut être isolé par chromatographie d'affinité sur Lysine-Sepharose à partir de sérum humain après un exercice physique (RADCLIFFE et HEINZE, 1978) ou sur Héparine-Sepharose à partir de coeur porcine (SOEDA et al, 1986).

Il peut être produit par de nombreuses lignées cellulaires malignes, en particulier les cellules du mélanome de Bowes, puis purifié par chromatographie d'immunoabsorption (EINARSSON et al, 1985).

La fabrication de tPA recombinant par génie génétique s'est beaucoup développée ces dernières années, notamment dans l'industrie pharmaceutique (WALDENSTROM et al, 1991).

Le tPA est libéré de l'endothélium vasculaire par des stimuli comme la stase veineuse, l'exercice physique (WIMAN et al, 1983), le stress et certaines substances telles que l'histamine, la thrombine ou la bradykinine. Ainsi, lors de la formation d'un thrombus, certains de ces stimuli sont présents et provoquent la libération de tPA dans le flux veineux. De plus, un exercice physique intense diminue le fibrinogène et l'activité d'un des inhibiteurs du tPA, le PAI-1 (STRATTON et al, 1991).

La production élevée de tPA par certaines cellules tumorales a conduit à l'étudier comme marqueur de pathologies cancéreuses (KWAAN et KEER, 1990).

C.1.1.2/ L'Urokinase et la Pro-Urokinase

L'urokinase (UK) a été découverte il y a quarante ans dans l'urine, dont on observait l'activité fibrinolytique. Elle est synthétisée principalement dans le rein et les poumons, mais aussi dans de nombreux autres tissus et dans des lignées cellulaires tumorales (DUFFY, 1990).

Son zymogène, la pro-urokinase (pro-UK), d'une masse moléculaire de 54 000 Da, est composé de 411 acides aminés et n'a aucune activité protéolytique (DeMUNK et RIJKEN, 1990). Par protéolyse limitée de la liaison Lys¹⁵⁸-Ile¹⁵⁹, elle se transforme en

une urokinase bicaténaire de haut poids moléculaire (HMW UK), capable d'activer le plasminogène en plasmine.

Elle est constituée de deux chaînes. La chaîne A (22 000 Da) comporte un domaine homologue au facteur de croissance de l'épiderme humain et une structure en kringle (qui ne contient pas de SAL et ne permet pas à l'enzyme de se lier à la fibrine). La chaîne B (32 000 Da) porte le site actif avec la triade catalytique His204, Asp255 et Ser356 (KASAI et al, 1985). Sa structure primaire est la suivante (figure 1.10) :

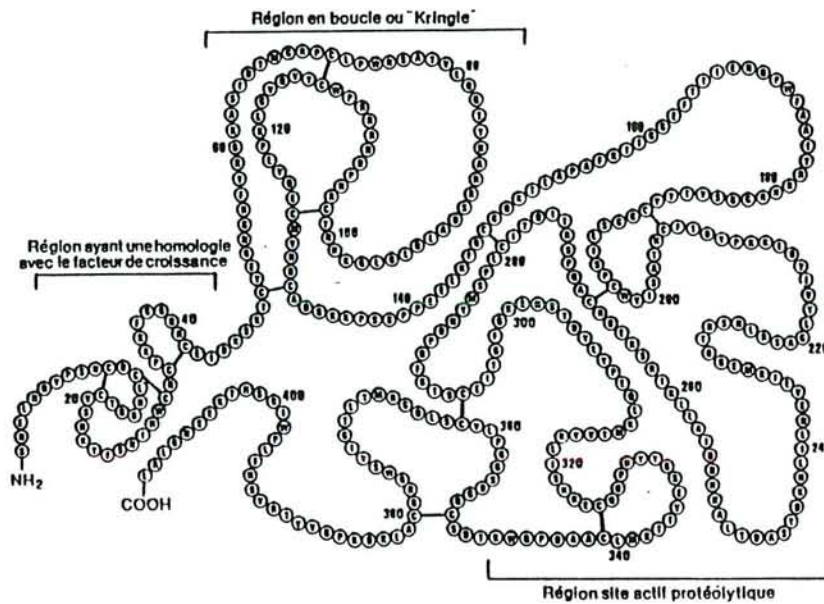


Figure 1.10: Structure de l'urokinase
(De MUNK et RIJKEN, 1990, adapté de HOLMES et al, 1985)

Par clivage supplémentaire de la liaison Lys135-Lys136, on obtient l'urokinase de bas poids moléculaire (LMW UK) dont la chaîne B isolée reste active.

L'urokinase scinde la liaison peptidique Arg560-Val561 du Glu ou du Lys-Pg pour produire la plasmine. Elle possède de plus des activités estérolytique et amidolytique.

C.1.2/ Voie intrinsèque

C'est la voie dite "du facteur contact", dans laquelle seules les substances normalement présentes dans le sang interviennent. Cette voie est à l'heure actuelle encore très controversée quant aux mécanismes mis en oeuvre.

Lors d'un contact, le facteur XII serait activé en facteur XIIa en présence de kininogène de haute masse moléculaire et de prékallikréine. Le facteur XIIa se complexerait avec un cofacteur pour activer le plasminogène (SAMAMA, 1990a). Mais la kallikréine libérée est aussi un activateur du plasminogène (KLUFT et al, 1979).

C.2/ Activateurs de la voie exogène

Elle correspond à l'activation du plasminogène par des substances extérieures à l'organisme, injectées à des fins thérapeutiques.

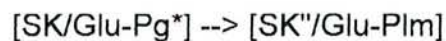
C.2.1/ La Streptokinase

D'origine bactérienne (c'est le produit d'un streptocoque β hémolytique), la streptokinase (SK) est une protéine d'une masse moléculaire de 47 000 Da qui ne contient ni copule glucidique, ni cystéine et ne possède pas les domaines communs qu'on retrouve chez les autres activateurs. Elle n'est donc pas capable de cliver la liaison Arg560-Val561 nécessaire à l'activation du plasminogène.

Son mode d'activation est tout autre (SCHICK et CASTELLINO, 1973): elle forme avec le Glu-Pg un complexe équimoléculaire qui subit un changement de conformation, dévoilant le site actif (*) de la chaîne B :



Puis, le Pg subit une activation autocatalytique en plasmine qui attaque la streptokinase. La streptokinase dégradée (SK'') a alors une masse moléculaire de 36 000 Da) :



Ce complexe est un activateur puissant du plasminogène. A noter qu'en présence de plasmine, on obtient un complexe [SK''/Lys-Pg].

Les principaux produits de fragmentation de la streptokinase apparus au cours de ce processus sont au nombre de cinq; certains d'entre eux sont capables d'activer le plasminogène, mais plus lentement que la streptokinase (SIEFRING et CASTELLINO,

1976).

Ce processus est stimulé par la fibrine, le fibrinogène et ses produits de dégradation, réalisant une sorte de feed-back positif en présence d'un thrombus (TAKADA et TAKADA, 1990).

Dans le caillot sanguin, il y a formation d'un complexe trimoléculaire entre streptokinase, plasminogène et fibrinogène (figure 1.11) :

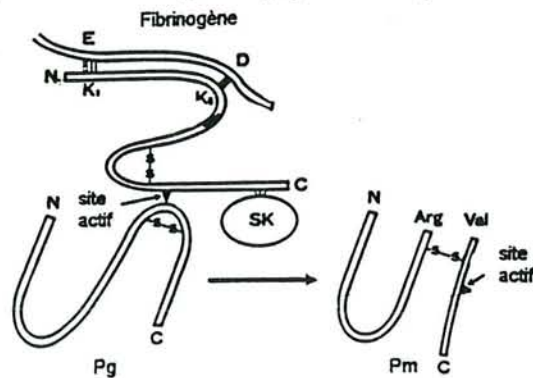


Figure 1.11 : Interaction Plasminogène, Streptokinase et Fibrinogène (d'après TAKADA et TAKADA, 1990)

L'ion chlore inhibe la réaction, mais n'a que peu d'influence sur le complexe (CASTELLINO et al, 1988).

La streptokinase est spécifique de certaines espèces, notamment humaines et canines (REDDY, 1976). Elle est totalement inactive sur le plasminogène bovin.

C.2.2/ La staphylokinase

C'est un activateur peu puissant du plasminogène, extrait de filtrats de culture de staphylocoques. Elle est moins spécifique d'espèces que la streptokinase. De plus, son mécanisme d'activation est différent: elle se lie au plasminogène pour donner un complexe inactif qui se transformera en staphylokinase/plasmine dans une étape activée par le tPA ou l'urokinase (COLLEN et al, 1993).

Les SAL des kringles 1-4 du plasminogène n'interviennent pas dans la formation de ce complexe (LIJNEN et al, 1993). Par contre, elles ont un rôle dans l'inhibition du complexe par l' α 2 antiplasmine (LIJNEN et al, 1992).

C.3/ Activateurs du plasminogène d'origine leucocytaire

Les leucocytes sanguins présentent dans leurs inclusions lysosomiales de l'élastase et de la cathepsine G, protéases douées d'une activité fibrinolytique (LINDMARK et al, 1990).

D/ LES INHIBITEURS DE LA FIBRINOLYSE

Ce sont des inhibiteurs de sérine protéases qui peuvent agir soit sur l'activation du plasminogène soit sur son adsorption à la fibrine ou encore inhiber la plasmine formée.

D.1/ Inhibiteurs de la plasmine

D.1.1/ L' α 2 AntiPlasmine

L' α 2 AntiPlasmine (α 2AP) est l'inhibiteur principal de la plasmine. Elle est synthétisée dans le foie sous forme d'une glycoprotéine monocaténaire de 67 000 Da contenant 14% de glucides (WIMAN et COLLEN, 1977). Sa demi-vie est de 3,3 jours.

Sa principale caractéristique est d'inhiber très rapidement la plasmine, par une réaction en deux étapes:

- Tout d'abord, elle forme avec la plasmine un complexe de très haute affinité (Kd de 0.2 nM). Il semble que ce soit un site proche de la partie C-terminale de l' α 2AP qui interagisse avec le site du kringle 1 de la plasmine (HORTIN et al, 1988).

- Dans un deuxième temps, la sérine du site actif de la plasmine interagit avec une liaison Leu-Met de l' α 2AP. Cette liaison est rompue et libère un fragment de 8 000 Da correspondant à la partie C-terminale de l' α 2AP. La sérine du site actif peut alors former une liaison covalente avec la nouvelle extrémité C-terminale et le complexe obtenu est irréversible (figure 1.12) :

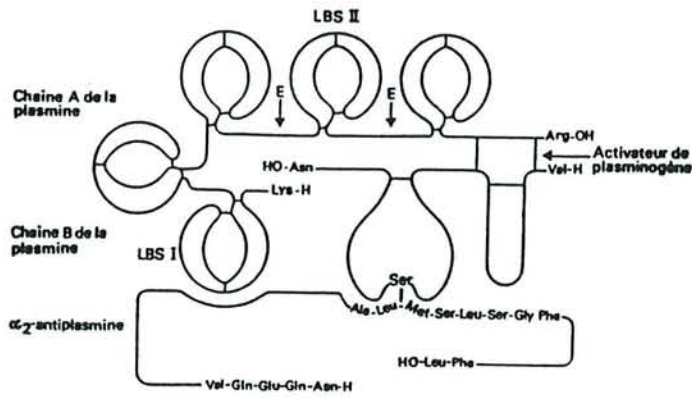


Figure 1.12 : Formation du complexe Plasmine - α 2 AP
(BACHMANN, 1986)

Le premier temps est très rapide (demi-vie d'environ 0,1 seconde) et le deuxième est plus lent (WIMAN et COLLEN, 1978). La demi-vie du complexe plasmine/ α 2AP est d'environ douze heures (COLLEN et WIMAN, 1979).

Il est à noter qu'il existe deux inhibiteurs de la formation de ce complexe: un tannin végétal, le phlorofucofuroeckol A (FUKUYAMA et al, 1990) et la "pregnancy zone" protéine (POULSEN et HAU, 1988).

De plus, la fibrine (mais pas le fibrinogène) réduit l'inhibition du plasminogène par compétition avec l' α 2AP pour les SAL des kringles 1-4 (LIJNEN et al, 1992).

Lors de la formation du caillot de fibrine, des liaisons covalentes -CO-NH- s'établissent entre le résidu glutamine en position 2 de l' α 2AP et une lysine de la partie C-terminale de la chaîne α de la fibrine, sous l'influence du facteur XIIIa. C'est un phénomène de "crosslinking" (figure 1.13) :

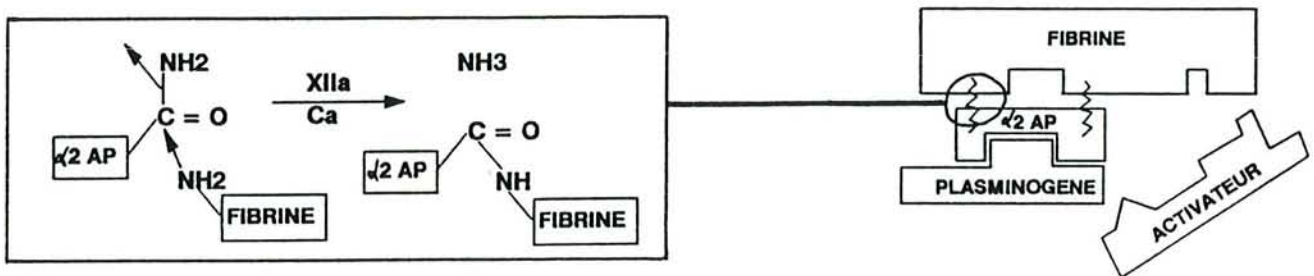


Figure 1.13 : Phénomène de crosslinking entre l' α 2AP et la fibrine
(AOKI et HARPEL, 1984)

On trouve donc de l' α 2AP liée directement au caillot et ce dans des proportions d'environ 20% de la quantité totale d' α 2AP circulante. Cette α 2AP augmente donc la fixation indirecte de plasminogène et de plasmine sur la fibrine. De plus, elle inhibe de façon compétitive la fixation du plasminogène sur la fibrine (figure 1.14) :

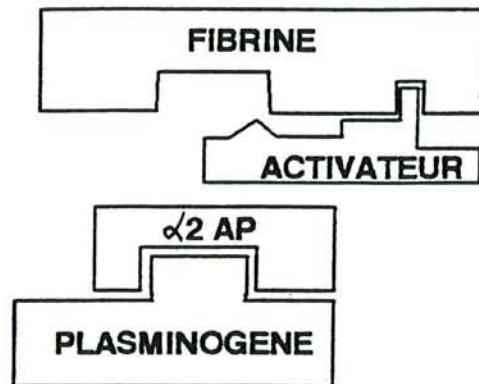


Figure 1.14: Inhibition de la fixation du Plasminogène sur la Fibrine par l' α 2AP (AOKI et HARPEL, 1984)

L' α 2AP fixée à la surface n'empêche pas l'activation du plasminogène, mais elle inhibe la formation de récepteurs au plasminogène sur la fibrine et diminue donc la fibrinolyse (ANGLES-CANO et al, 1992).

L' α 2AP se lie plus facilement au Lys-Pg qu'au Glu-Pg, du fait d'une moindre accessibilité du SAL du kringle 1 dans le premier (WIMAN et al, 1979).

Dans des conditions physiologiques, la plasmine est donc très rapidement inhibée par l' α 2AP. Mais la plasmine liée à de la fibrine est beaucoup moins sensible à l'action de l' α 2AP.

D.1.2/ L' α 2 Macroglobuline

L' α 2 Macroglobuline (α 2MG) est composée de quatre chaînes polypeptidiques identiques d'une masse moléculaire de 185 000 Da.

Elle intervient après l'action de l' α 2AP et forme des complexes covalents avec la plasmine après une modification conformationnelle majeure lui permettant d'englober

l'enzyme (CUMMINGS et CASTELLINO, 1984).

C'est une molécule qui réagit avec tous les types de protéases qui, en général, gardent une certaine activité une fois complexées.

D.1.3/ L' α 1 Antitrypsine

L' α 1 Antitrypsine (α 1AT) est un inhibiteur lent, mais d'action irréversible, qui agit en se combinant au site actif des protéases. Son rôle est minime, in vivo, sur la plasmine.

D.1.4/ L'antiThrombine III

En se liant à la plasmine, l'antiThrombine III (AT III) joue le rôle d'un inhibiteur. Cette activité antiplasmine est très faible (SAMAMA, 1990a).

D.1.5/ La Protéase-Nexine

Elle est sécrétée par certains fibroblastes humains ou les cellules endothéliales du rein de singe. La protéase-nexine (PN, masse moléculaire de 43 000 Da) n'inhibe que certaines sérines protéases, dont la plasmine, l'urokinase et le tPA (SCOTT et al, 1985).

Les enzymes liées à la protéase-nexine sont dégradées par internalisation dans des cellules possédant des récepteurs à la nexine (LOW et al, 1981).

D.1.6/ Autres

On retrouve dans le sang quelques protéines circulantes qui ont une activité inhibitrice sur la plasmine, comme l'inhibiteur de la C1-estérase (IC1ase) ou l' α 1 antichymotrypsine (α 1ACT).

Parmi les antiplasmines non physiologiques, citons le Trasylo[®], antiplasmine extraite des poumons de boeuf (SULTAN Y, 1986). L'inhibiteur de Kunitz (Aprotinine) est utilisé en thérapeutique humaine dans les fibrinolyse aigues (Iniprol[®]); il est extrait de nombreux organes de bovins (masse moléculaire 6 500 Da) et inhibe la plasmine selon un processus en deux étapes, cent fois moins rapide si celle-ci est complexée à la streptokinase (WIMAN, 1980).

Des inhibiteurs dirigés contre le site actif de la plasmine ont été synthétisés par voie chimique depuis ces cinq dernières années, modélés de façon à interagir au maximum sur celui-ci (TENO et al, 1993).

D.2/ Les inhibiteurs de la fixation à la fibrine

L'HRGP, que nous avons déjà évoquée (paragraphe A.3.1.2.d), se lie au SAL de forte affinité du plasminogène. Lors de la formation du caillot de fibrine, le plasminogène ainsi complexé n'est pas disponible pour la fibrinolyse.

D.3/ Les inhibiteurs des activateurs

D.3.1/ Les inhibiteurs de la voie extrinsèque

D.3.1.1/ Le Plasminogen Activator Inhibitor-1(PAI-1)

Cette glycoprotéine de 379 acides aminés, d'une masse moléculaire de 54 000 Da, est une "serine protease inhibitor" ou serpine (Van MOURIK et al, 1984).

Elle est synthétisée dans les cellules endothéliales, mais aussi dans le foie et se trouve dans le plasma, complexée à la vitronectine, à une concentration de 10 à 30 µg/L, avec des variations circadiennes importantes, le maximum se situant le matin et le minimum en début d'après-midi (AILLAUD, 1993).

Son site actif se trouve à l'extrémité C-terminale de la molécule (Arg358-Met359).

Elle se lie au tPA (mais aussi à l'urokinase) de façon irréversible, par dégradation de la molécule.

Le PAI-1 est le régulateur principal du tPA (ELIASON et al, 1993).

Il est à noter qu'on en trouve dans les plaquettes, qui la libèrent lors de leur activation.

Les taux de PAI-1 sont augmentés au cours des syndrômes inflammatoires et lors de certains troubles métaboliques (hypertension artérielle, hyperinsulinémie,

hypertriglycémie) (ARNDT et al, 1992).

D.3.1.2/ Le Plasminogen Activator inhibitor-2 (PAI-2)

C'est une glycoprotéine de 47 000 Da, qui est présente à l'état de traces dans un plasma humain normal, mais qu'on trouve en quantité importante chez la femme enceinte, notamment au cours du troisième trimestre de la grossesse, jusqu'à 90 mg/L (SAMAMA, 1990a).

Elle a aussi été détectée dans les macrophages (CHAPMAN et STONE, 1985) et les leucocytes (KOPITAR et al, 1985).

Elle forme des complexes avec le tPA et l'urokinase, avec une affinité plus grande pour cette dernière (WUN, 1988).

D.3.1.3/ Autres

L'inhibiteur de la protéine C activée (ou PAI-3) inhibe spécifiquement l'urokinase. Cette action est augmentée en présence d'héparine.

La protéase-nexine 1, du groupe des protéases-nexines, décrite comme une antiplasmine, a aussi une action affectant le tPA et l'urokinase (WUN, 1988).

D.3.2/ Inhibiteurs de la voie intrinsèque

Le C1-inhibiteur (IC1, masse moléculaire 105 000 Da) inhibe la kallikréine et le facteur XIIa qui en sont les éléments essentiels. L'activateur présumé de cette voie serait aussi inhibé spécifiquement par le C1-inhibiteur (KLUFT et al, 1979).

E/ PHYSIOLOGIE DE LA FIBRINOLYSE

E.1/ Activation du plasminogène

Sous l'influence d'un activateur, comme l'urokinase ou le tPA, le Glu-Pg se transforme en Glu-Pm, par rupture de la liaison Arg560- Val561. Puis, sous l'action autocatalytique de la plasmine, il y a libération du peptide d'activation (correspondant aux 76 acides aminés N-terminaux) et formation de Lys-Pm (CASTELLINO, 1981).

Le Glu-Pg peut aussi se transformer en Lys-Pg en présence de traces de plasmine, puis en Lys-Pm, en présence d'activateur (figure 1.15) :

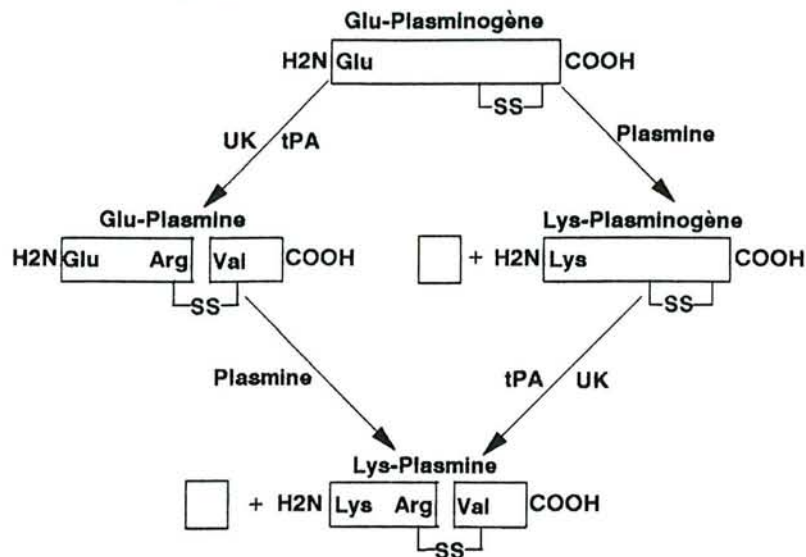


Figure 1.15 : Voies d'activation du Plasminogène (d'après VIOLAND et CASTELLINO 1976)

Cette deuxième voie semble la voie prépondérante, car le Lys-Pg est un meilleur substrat pour le tPA et l'activation y est vingt fois plus rapide (LUCAS et al, 1983). Ceci peut s'expliquer par la conformation en spirale du Glu-Pg qui peut être défavorable à l'ancrage du site actif de l'activateur, la liaison Arg560-Val561 du plasminogène étant difficile d'accès dans ce cas, alors que dans la conformation ouverte Lys-Pg la liaison 560-561 est plus accessible donc facilement clivable par l'activateur (PONTING et al, 1992).

Le clivage rend le site actif accessible aux substrats (cf. le paragraphe A pour le mécanisme de protéolyse). Récemment, TEUTEN et al (1993) ont émis l'hypothèse qu'une autre région du domaine protéase à sérine serait impliquée dans la protéolyse; cette région ne serait structurée qu'en présence de substrat lié à l'enzyme et aurait un rôle coopératif avec la triade catalytique.

Il est intéressant de noter que les caséines humaines ou bovines, par interaction avec le Glu-Pg, provoquent un changement de sa conformation en celle du Lys-Pg, accélérant son activation en plasmine (MARKUS et al, 1993).

Lors d'une fibrinolyse, la formation de Lys-Pg sur le caillot réalise un "feed-back"

positif qui stimule l'activation du plasminogène par le tPA (FREDENBURGH et NESHEIM, 1992).

Cette réaction peut être bloquée en présence de certains anions monovalents, comme l'ion chlore Cl^- à des concentrations physiologiques, qui stabilisent la conformation "fermée" du Glu-Pg (URANO et al, 1987).

L'activation est inhibée par des anticorps monoclonaux dirigés contre des domaines du miniplasminogène (kringle 5 plus chaîne B), ce qui indique un rôle important de cette région lors de l'activation par la streptokinase, l'urokinase ou le tPA (CHURCH et MESSIER, 1991).

Une différence notable existe entre les activateurs physiologiques du plasminogène: contrairement à l'urokinase, le tPA a une forte affinité pour la fibrine (THORSEN, 1975) et cette affinité est augmentée en présence de Glu-Pg. Il a été montré que le tPA se liait le premier à la fibrine, par un site du kringle 2 (ICHINOSE et al, 1986), suivi par le plasminogène; l'affinité du tPA pour ce dernier augmente alors d'environ 1000 fois (HOYLAERTS et al, 1982).

De plus, un second site de liaison au plasminogène situé sur la chaîne B et qui pourrait participer à ce complexe, a été décelé (WALLEN et al, 1990).

Cette efficacité "ciblée" du tPA, limitée à la fibrine, constitue un niveau de régulation de la fibrinolyse physiologique, celui-ci étant beaucoup moins actif en solution.

E.2/ Action de la plasmine sur le fibrinogène et le caillot de fibrine

Dans les conditions physiologiques, il n'y a pas de dégradation du fibrinogène par la plasmine, l'affinité de cette dernière pour l' α_2 antiplasmine étant supérieure.

Cependant, dans certaines pathologies où la synthèse de plasmine est très augmentée, l'antiplasmine est saturée et le fibrinogène peut être attaqué. Cette attaque commence à l'extrémité C-terminale de la chaîne α et à l'extrémité N-terminale de la chaîne β . Il en résulte le fragment X; celui-ci se transforme ensuite en D et Y, puis en E (figure 1.16) :

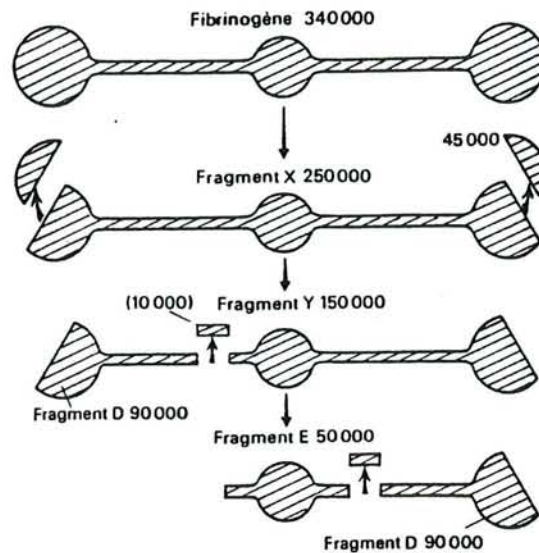


Figure 1.16 : Dégradation du fibrinogène par la plasmine
(SAMAMA, 1990b)

L'attaque de la fibrine ne donne pas les mêmes produits de dégradation, puisque certaines liaisons, notamment les "crosslinks" γ - γ , ne sont pas rompues par la plasmine. Ces produits sont donc de plus grande taille; on trouve: DD, YY, DDE, DXD, DYYD ou E isolé (FRANCIS et MARDER, 1982).

Le fragment X est le seul coagulable; les fragments D et E sont des produits tardifs de la dégradation. La présence de calcium protège l'extrémité C-terminale de la chaîne γ d'une dégradation trop poussée. Ces fragments inhibent la transformation du fibrinogène en fibrine (X, Y, D sont des antipolymérase et E inhibe l'action de la thrombine) et stimulent l'activité du tPA (TORR et al, 1992).

F/ PATHOLOGIES ET PLASMINOGÈNE

F.1/ Pathologies de la fibrinolyse

De nombreuses maladies sont liées à la formation dans un vaisseau sanguin d'un caillot ou thrombus, composé d'érythrocytes, de leucocytes et de plaquettes, agglomérés par des filaments de fibrine.

Les thromboses artérielles peuvent provoquer des dommages très importants lorsqu'elles touchent des organes vitaux tels les reins (infarctus rénal), les poumons (embolie pulmonaire), le cerveau (accident vasculaire cérébral) ou le coeur (infarctus du myocarde). Ce dernier touche le plus souvent une artère coronaire, qui irrigue le muscle cardiaque. La zone en aval du thrombus se nécrose et meurt si aucun traitement n'est entrepris dans les heures qui suivent l'infarctissement. L'infarctus du myocarde est responsable de vingt-cinq mille décès par an en France.

Le système fibrinolytique est capable de façon physiologique de revasculariser un vaisseau sanguin obstrué, cela sans traitement extérieur, et tout déséquilibre de ce système peut conduire soit à un thrombus, soit au contraire à un syndrome hémorragique.

F.1.1/ Hypofibrinolyse

Les hypofibrinolyse sont dues à un défaut dans l'équilibre entre l'activation et l'inhibition de la fibrinolyse, soit par une anomalie dans la production de la plasmine, soit par une anomalie du caillot vis-à-vis des enzymes fibrinolytiques, avec pour conséquence la prédisposition à une thrombose veineuse récidivante.

F.1.1.1/ Production défectueuse de plasmine

F.1.1.1.a/ Anomalies du plasminogène

Il peut s'agir d'un défaut de synthèse de plasminogène (moins de 50% des valeurs normales selon HEDNER et TENGBORN, 1988), que l'on retrouve dans certaines pathologies familiales héréditaires (SORIA et al, 1986) ou dans les atteintes hépatiques (OLIVER et al, 1991), ou bien de la production d'un plasminogène anormal dépourvu de sites enzymatiques actifs (AOKI et al, 1977).

F.1.1.1.b/ Diminution des activateurs du plasminogène

Sous l'influence de divers stimuli, comme l'anoxie, il peut se produire une diminution de la synthèse ou de la libération du tPA par les cellules endothéliales et donc une augmentation du risque de thrombose (JORGENSEN et al, 1982). Par contre, les déficits en pro-urokinase ne sont pas encore connus.

Un déficit en facteur XII (voie endogène de la fibrinolyse) peut provoquer des maladies thrombo-emboliques (DYERBERG et STOFFERSEN, 1980).

F.1.1.1.c/ Augmentation des inhibiteur de la fibrinolyse

Une augmentation d'inhibiteur du tPA provoque une neutralisation excessive de l'enzyme et une diminution de son action (NILSSON et TENGBORN, 1984). Il n'a jamais été démontré qu'une augmentation en α 2AP ou en HRGP puisse provoquer une thrombose.

F.1.1.2/ Défaut du caillot vis-à-vis des enzymes fibrinolytiques

Certaines anomalies de structure du caillot rendent celui-ci beaucoup moins accessible qu'un caillot normal à l'action du tPA et du plasminogène (SORIA et al, 1983). Il s'agit dans ce cas d'anomalies congénitales dont la plus connue est le syndrome Dusard.

F.1.2/ Hyperfibrinolyse

La régulation du système fibrinolytique peut être perturbée par deux types de mécanismes capables d'activer anormalement le système.

L'hyperfibrinolyse entraînera la production anormale de produits de dégradation du fibrinogène qui induiront un dysfonctionnement plaquettaire avec un syndrome hémorragique.

La plasmine joue aussi un rôle dans la genèse des phénomènes inflammatoires en activant la prékallikréine en kallikréine et le complément C1(qrs) en C1 estérase; de plus, les produits de dégradation du fibrinogène (PDF) D et E favorisent le syndrome inflammatoire (SAMAMA, 1990b).

F.1.2.1/ Augmentation du plasminogène

C'est surtout l'augmentation du plasminogène fixé sur la fibrine qui peut jouer un rôle important dans l'accélération de la lyse. Une telle variation s'observe surtout dans

les réactions inflammatoires (POTRON, 1986).

F.1.2.2/ Diminution de l' α 2 antiplasmine

Une diminution de l' α 2AP laisse libre une plus grande quantité de plasmine, pouvant provoquer des hémorragies, localisées au niveau des zones d'hémostase; d'autres inhibiteurs, comme l' α 2 MG, prennent ensuite le relais dans la circulation sanguine.

Les déficits en α 2AP sont soit des maladies héréditaires (KOIE et al, 1978), soit des déficits acquis secondaires à des atteintes hépatiques (MARONGIU et al, 1985).

F.1.2.3/ Augmentation de l'activation de la fibrinolyse

F.1.2.3.a/ Augmentation du tPA ou de l'urokinase circulants

Lors de pathologies hépatiques, la clairance du tPA et de l'urokinase est diminuée et leurs concentrations plasmatiques augmentent alors (BOOTH et al, 1984).

L'injection intraveineuse des activateurs comme traitement thrombolytique provoque une fibrinolyse, limitée au thrombus pour le tPA et plus systémique pour l'urokinase.

L'exercice physique provoque une libération de tPA qui reste inactif en l'absence de fibrine.

Certaines tumeurs sont capables de sécréter du tPA ou de l'urokinase, qui n'entraînent que très rarement une réponse fibrinolytique primitive (KWAAN et KEER, 1990).

F.1.2.3.b/ Activation anormale du système de la coagulation

Une hyperfibrinolyse secondaire à une coagulation intravasculaire disséminée peut apparaître, les activateurs étant libérés par le mécanisme inducteur de la coagulation.

F.1.3/ Fibrinolyse et maladies hématologiques

Au cours des affections hématologiques, la fibrinolyse peut être augmentée soit de façon isolée, soit secondairement à une coagulation intravasculaire disséminée.

Parmi ces affections, certaines leucémies aiguës (notamment promyélocytaire ou monoblastique) ou chroniques, les anémies hémolytiques, les thrombopénies induites par l'héparine et certains déficits immunitaires congénitaux agissent soit directement sur la fibrinolyse, soit par l'intermédiaire de la cascade de la coagulation (BELLUCCI, 1986).

F.1.4/ Les thérapeutiques fibrinolytiques

Les premières thérapeutiques fibrinolytiques utilisées furent la streptokinase et l'urokinase dans les années 1960. Leur inconvénient majeur était le peu de spécificité qu'elles manifestaient vis-à-vis de la fibrine, à savoir qu'elles activaient le plasminogène circulant autant que celui associé au thrombus, la plasmine produite dégradant non seulement la fibrine, mais aussi le fibrinogène circulant et certains facteurs de la coagulation, ce qui avait pour conséquence un état d'incoagulabilité du sang. De plus, la streptokinase, de par son origine non humaine, provoquait l'apparition d'anticorps. Elle reste utilisée mais souvent en association à l'aspirine, qui évite une nouvelle agrégation des plaquettes du thrombus (ISIS-2, 1988).

Les fibrinolytiques de la deuxième génération ont une action beaucoup plus spécifique sur le thrombus. Ce sont le tPA et la pro-urokinase (bien qu'il semble que la pro-urokinase dégrade aussi le fibrinogène circulant, mais en petite quantité), fabriqués par génie génétique, et le complexe streptokinase-plasminogène acylé (le plasminogène permettant la fixation du complexe sur le caillot) (Van de WERF, 1991).

Cependant, la supériorité de ces fibrinolytiques sur la streptokinase n'est pas admise par tous, et les résultats du dernier essai clinique à grande échelle (ISIS-3, 1992)

semblent nuancer leurs différences. En effet, selon ce rapport, le taux de mortalité est le même, quel que soit le thrombolytique (Streptokinase, tPA ou Streptokinase + Plasminogène); les effets secondaires seraient même inférieurs avec la streptokinase. Par contre, le tPA entraînerait moins de récurrences.

Le tPA réduit de 27% la mortalité à un mois de l'infarctus du myocarde s'il est administré moins de cinq heures après l'apparition des symptômes (WILCOX et al, 1988), d'où l'importance de la précocité du diagnostic et du traitement. Cependant, la posologie doit (ou devrait) être adaptée en fonction des risques hémorragiques et du taux de PAI sanguin qui varient considérablement d'un sujet à l'autre (HARPEL, 1983). Il existe à l'heure actuelle des tests très sensibles capables de détecter dans des sérums des quantités de l'ordre de 0.1 nanogramme d'activateur ou d'inhibiteur du plasminogène (DECLERCK, 1993). Cependant, aucun dosage proposé ne peut s'effectuer en moins de 30 minutes; une telle rapidité serait bien utile pour suivre l'efficacité d'un traitement et en éviter les effets secondaires dans les heures qui suivent l'infarctus (JUHAN-VAGUE et al, 1986).

Des thrombolytiques de troisième génération sont à l'étude actuellement, comme des conjugués tPA et anticorps antifibrine (région N-terminale de la chaîne B β) ou antiplaquette (glycoprotéine IIb/IIIa de membrane) (COLLEN et LIJNEN, 1991), pour une plus grande spécificité envers la fibrine, des hybrides tPA/urokinase ou des mutants de tPA, ayant une demi-vie allongée et une activité plus importante (DESNOYERS et al, 1988).

Un activateur exogène du plasminogène est actuellement à l'essai: il s'agit d'un activateur du plasminogène salivaire du vampire *Desmodus rotundus*, dont le potentiel et la spécificité vis-à-vis du caillot sont supérieurs à ceux du tPA (MUSCHICK et al, 1993).

F.2/ Fibrinolyse et cancers

Il y a vingt ans, UNKELESS et al. (1974) observèrent que des fibroblastes étaient capables de produire des activateurs du plasminogène après transformation par un virus oncogène. Depuis, de nombreuses études furent entreprises pour élucider le rôle de la fibrinolyse dans le processus tumoral. Il est maintenant acquis que des enzymes protéolytiques interviennent dans la destruction de la membrane basale des tissus sains, composée de collagène et de glycoprotéines, avant l'invasion par des

cellules tumorales (MOSCATELLI et al, 1980). En fait, celles-ci sécrètent une procollagénase qui est activée en collagénase par différentes enzymes protéolytiques dont la plasmine (GAVRILOVIC et MURPHY, 1989). Le rôle de la plasmine a été mis en évidence dans la dégradation de la fibrine du stroma de carcinomes par une étude de ses produits de dégradation. (WILHELM et al, 1990).

Par ailleurs, la laminine, glycoprotéine de la membrane basale, est responsable de la fixation des cellules tumorales au collagène de type IV. Sa dégradation par la plasmine pourrait faciliter le passage de cellules à travers la membrane basale et participer à l'invasion tissulaire (LIOTTA et al, 1981).

Il est aussi possible que l'absence de matrice contenant de la fibronectine sur les cellules tumorales soit le fait des enzymes protéolytiques (VAHERI et al, 1980).

La plasmine pourrait aussi avoir un rôle dans la dissémination des métastases en participant au détachement des cellules tumorales fixées sur une matrice ou en favorisant leur pénétration au travers des vaisseaux (DOSQUET-BERNARD et CAMEZ, 1986).

Les cellules ont à leur surface des récepteurs spécifiques du plasminogène qui, une fois fixé, s'active en plasmine sous l'influence d'activateurs présents à la surface cellulaire. Cette plasmine active à son tour une pro-urokinase dont la forme activée augmente la fixation du plasminogène sur la cellule (BURTIN et FONDANECHÉ, 1988). Il y a donc à la surface de la cellule tumorale tout un arsenal capable de détruire les structures péri-tumorales pour faciliter l'invasion cancéreuse.

Tous ces phénomènes s'accompagnent d'une élévation de la production des activateurs du plasminogène (tPA et urokinase) par les cellules cancéreuses par rapport à des cellules saines (De BRUIN et al, 1987).

Mais il semble que la présence d'urokinase soit associée à un pronostic plus défavorable que celle de tPA (KIRCHHEIMER et al, 1985).

Selon MIRA-Y-LOPEZ et al, (1986), une protéine d'origine hypophysaire, le facteur de croissance des fibroblastes basiques (ou bFGF), est responsable de la stimulation des activateurs du plasminogène.

De plus, des récepteurs spécifiques du tPA et de l'urokinase sont présents sur les cellules cancéreuses (BLASI et al, 1987; MARKUS, 1988). Ces activateurs joueraient aussi un rôle dans la formation des métastases, où ils sont présents en grande quantité (KIRCHHEIMER et al, 1985).

Par contre, la résistance de certains tissus à l'invasion tumorale a été liée à la présence de grandes quantités d'inhibiteurs de protéinases (YUEN et KWAAN, 1983), en particulier le PAI-1 (KWAAN et al, 1991). Celui-ci se lie avec l'urokinase à la surface cellulaire en un complexe qui est internalisé et dégradé par les lysosomes.

La figure suivante résume le rôle de la fibrinolyse dans l'invasion tumorale (figure 1.17) :

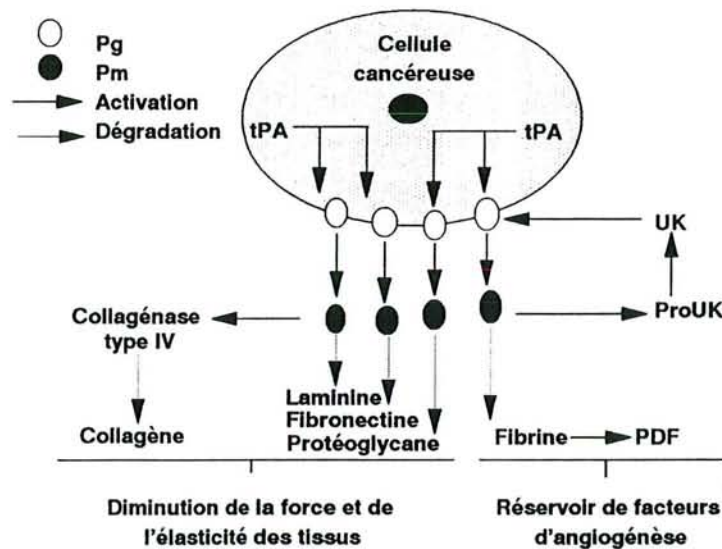


Figure 1.17: Rôle de la fibrinolyse dans le processus d'invasion tumorale

Depuis quelques années, les activateurs du plasminogène sont devenus le centre d'intérêt de nombreuses recherches pour leur rôle en thérapeutique et surtout comme marqueurs biologiques du cancer. Les marqueurs du cancer sont utiles pour le dépistage, le diagnostic et la surveillance de l'évolution des tumeurs. Or l'intérêt des activateurs réside dans la précocité de leur apparition et dans leur corrélation avec l'évolution de la maladie. Mais des taux normaux d'urokinase ou de tPA n'excluent pas la possibilité d'une tumeur.

Ainsi, l'urokinase a été proposée comme marqueur de cancers ovariens

(NIKLISSON et al, 1981), mammaires (indicateur de pronostic) (GRONDAHL-HANSEN et al, 1987), coliques (MARKUS et al, 1980), hépatiques primaires (HUBER et al, 1992) et bien d'autres. L'activateur tissulaire présente un intérêt plus faible, mais a été proposé comme marqueur d'un pronostic favorable dans les cancers du sein (DUFFY et al, 1988).

Les taux urinaires des activateurs du plasminogène peuvent permettre de suivre d'une façon non traumatique l'évolution de cancers de la vessie (GORELIK et al, 1990).

Enfin, une élévation de l'urokinase liée aux macrophages associés aux tumeurs serait un marqueur de leur stimulation (MUSSONI et BENEDETTA, 1988).

F.3/ Autres pathologies

F.3.1/ Activation locale du plasminogène

Dans de nombreuses pathologies, l'activation au niveau local de tPA ou d'urokinase conduit à la formation de plasmine active qui joue son rôle d'enzyme protéolytique.

Il existe, par exemple, une activation locale dans le rein, soit par le tPA au niveau glomérulaire, soit par l'urokinase au niveau tubulaire, qui préviendrait l'apparition d'une occlusion des tubules lors d'une infection rénale (MUELLBACHER et al, 1989).

On retrouve cette activation dans de nombreuses pathologies cutanées (JENSEN et al, 1988). En particulier dans les pathologies à dominante auto-immune: pemphigus vulgaire (REINARTZ et al, 1993), à dominante allergique: lésions cutanées des vascularites allergiques (TOKI et al, 1982), ou à déterminisme génétique: psoriasis (JUSTUS et al, 1987).

Il y a activation du plasminogène dans le tissu conjonctif, lors de polyarthrite rhumatoïde (KIKUCHI et al, 1987).

Dans certaines pathologies oculaires comme les kératites, il y a une activation de la plasmine (TRIPATHI et al, 1988; TERVO et al, 1989).

F.3.2/ Hépathopathies

Dans les pathologies hépatiques, comme la cirrhose, les taux sanguins du plasminogène, synthétisé par les hépatocytes, diminuent de façon précoce alors que les taux de tPA, dont la clairance hépatique est diminuée, augmentent de façon nette. Si le malade n'a pas un taux de PAI suffisant pour contrer la montée du tPA, il se produira une fibrinolyse accélérée (HERSCH et al, 1987).

Le plasminogène a été proposé comme marqueur de l'hépatite virale (BOYADJIAN, 1991): l'activité du plasminogène est diminuée chez des patients atteints d'hépatite virale et de façon proportionnelle à la sévérité de la pathologie. Ce critère permet de différencier les malades à haut risque de coma hépatique (par exemple lors d'hépatite fulminante), ce que ne permet pas la bilirubine, marqueur usuel de l'hépatite. De même, lors d'ictères cholestatiques, le plasminogène est un bon indicateur de l'évolution (RODZYNEK et al, 1984).

F.3.3/ Plasminogène et fertilité

Il se produit une augmentation des activateurs du plasminogène et de leurs inhibiteurs lors d'oligo-asthénio-tératozoospermies (ou syndrome OAT), sans qu'une corrélation nette puisse être établie avec l'infertilité (MAIER et al, 1991). D'autres études confirment cette absence de corrélation (Mac GREGOR et al, 1987).

Le plasminogène a été aussi proposé comme indicateur d'ovulation, sa concentration dans le fluide péritonéal augmentant de façon significative après l'ovulation (PADILLA et al, 1986).

F.3.4/ Autres pathologies

D'une façon générale, lors de processus inflammatoires, il se produit une activation du plasminogène par libération de ses activateurs, par exemple lors de pathologies inflammatoires pulmonaires (ROBINSON, 1988).

Une seule pathologie présente de façon inexplicée une diminution du taux de ses activateurs au niveau sanguin: la polyneuropathie amyloïde familiale (OLOFSSON et NILSSON, 1990).

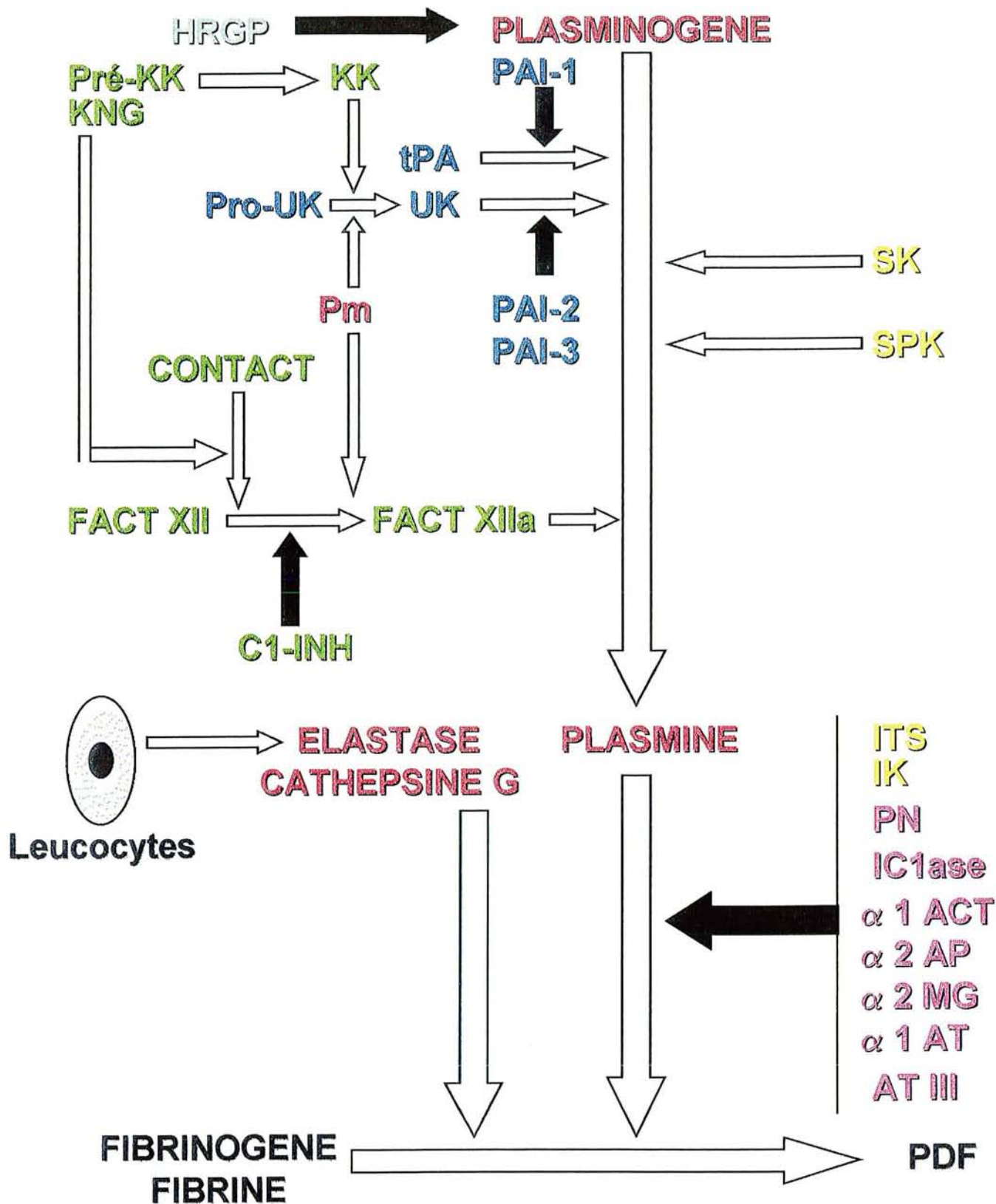


Figure 1.18 : Schéma simplifié de la fibrinolyse



Voie extrinsèque
 Voie intrinsèque
 Voie exogène
 Inhibiteurs de la fixation à la fibrine
 Inhibiteurs endogènes de la Pm
 Enzyme

G/ Conclusion

Le système plasminogène/plasmine du sang est surtout connu pour son activité lytique vis-à-vis du caillot de fibrine et autres thrombi; il est d'ailleurs communément appelé système fibrinolytique. Mais depuis quelques années, on se rend mieux compte de l'importance de son rôle protéolytique dans d'autres systèmes comme l'invasion tumorale ou, d'une façon plus générale, dans tous les processus inflammatoires. Gageons que dans quelques années, cette liste sera plus longue encore, tant l'action d'une telle enzyme touche des domaines nombreux et variés.

III/ LE SYSTEME CASEINOLYTIQUE DU LAIT

A/ Introduction : le lait, source de vie

La composition du lait en fait un aliment irremplaçable pour les êtres humains. Le lait de la mère d'abord, aliment unique du nouveau-né, qui apporte en outre ce qu'aucun autre d'origine animale ou végétale ne peut amener: des anticorps, source protectrice pour le nouveau-né et le nourrisson. Le lait de vache ou de chèvre ensuite, dont les teneurs en protéines, vitamines (B1, B2, B3, B12 et surtout A) et en calcium en font une source indispensable de nutriments.

Le lait bovin est composé d'une phase aqueuse (ou lactosérum) comprenant les protéines, sels minéraux, glucides et vitamines et d'une phase lipidique, constituée de globules gras. Un litre de lait contient 30 à 35 grammes de protéines.

Les caséines représentent 80% de ces protéines, soit de 24 à 28 grammes au litre. On en dénombre quatre types principaux: caséines α S1, α S2, β et κ , auxquels on peut ajouter des produits d'hydrolyse telles les caséines γ provenant de la caséine β . Elles forment entre elles, en présence de sels de calcium, des grosses unités sphériques qu'on appelle des micelles, dont le diamètre est de quelques dizaines de nanomètres. Ces micelles sont en suspension dans le lactosérum. Leur coagulation est à l'origine de la formation du caillé.

Le lactosérum contient des protéines qui lui sont spécifiques: α Lactalbumine, β Lactoglobuline, Albumine sérique bovine, mais aussi des Immunoglobulines en provenance soit du sang, soit du tissu lymphoïde sécrétoire annexé à la mamelle, des

enzymes en grand nombre, d'autres produits de dégradation des caséines (protéose-
peptones des caséines β), des sels minéraux et des vitamines.

Le lait a un pH d'environ 6,7 et une densité de 1,03 g/mL.

La figure 1.19 résume les principaux constituants du lait et leurs teneurs respectives :

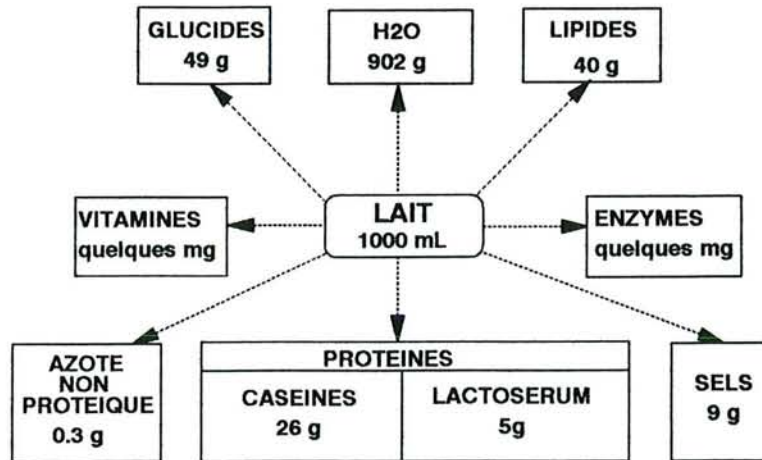


Figure 1.19: Le lait et ses principaux constituants

B/ Les enzymes du lait

Plus de 60 enzymes différentes ont été dénombrées dans le lait (BLANC, 1982). Seul un petit nombre a été purifié et identifié.

La majorité de ces enzymes sont présentes à des concentrations inférieures à 1 mg par litre. Un certain nombre de facteurs inhérents à l'animal influencent les activités enzymatiques dans le lait: la race, l'âge, la nutrition, l'état sanitaire et le nombre de lactations (ANDREWS, 1993).

Les enzymes peuvent être regroupées suivant leur type d'activité. Ainsi, on trouvera des protéinases, lipases, phosphatases, amylases, la lactoperoxydase et des lysozymes. Parmi les protéinases, la plus importante est la protéase alcaline du lait. On note aussi la présence de la protéase acide du lait, de type cathepsine D (KAMINOGAWA et YAMAUCHI, 1972), d'un analogue de la thrombine (REIMERDES, 1983) et d'une protéase de type neutre (SNOEREN et Van RIEL, 1979). Enfin, certains

microorganismes psychrotrophes présents dans le lait cru, comme l'espèce *Pseudomonas fluorescens*, sont capables de sécréter des enzymes protéolytiques (LAW, 1979).

C/ La protéase alcaline du lait

C.1/ Caractères généraux et répartition dans les laits

Elle a été identifiée comme étant le système plasminogène-plasmine du sang (EIGEL et al, 1979; HUMBERT et al, 1990), celui-ci migrant dans le lait au travers des cellules épithéliales de la glande mammaire. Nous ne décrivons dans ce chapitre que les particularités du plasminogène bovin (BPg), le plasminogène humain ayant été étudié en détail dans la première partie.

Plus de 90% de l'enzyme se trouve sous la forme d'un zymogène, le plasminogène. Dans le lait, le plasminogène se trouve principalement associé aux micelles de caséines (KORYCKA-DAHL et al, 1983; POLITIS et al, 1992), le reste étant libre dans le lactosérum. Une fraction de l'enzyme a été retrouvée liée à la membrane des globules gras (HOFMANN et al, 1979); récemment, POLITIS et al (1992) ont émis l'hypothèse que sa présence sur ces globules était liée à celle des caséines.

C.2/ Structure moléculaire

Le plasminogène bovin est une molécule de 786 acides aminés, pour une masse molaire de 88 092 Da. Sa séquence est bien connue (SCHALLER et al, 1985). Elle diffère de celle du plasminogène humain par cinq délétions (Val447, Val448, Leu449, Pro539, Thr574) et une insertion (Pro65); l'homologie des deux séquences est de 80% (SCHALLER et al, 1985).

L'acide aminé en position 1 est l'Asp; la forme native du plasminogène bovin est donc dénommée Asp-Pg. L'activation en plasmine provoque, par le clivage de la liaison Arg577-Ile578, la coupure de la chaîne lourde A (AA1 à 577) et de la chaîne légère B (AA 578 à 786).

De plus, la plasmine coupe la liaison Lys77-Arg78, libérant le peptide d'activation.

C.3/ Teneurs et facteurs de variations

Les concentrations dans le lait sont très variables selon les auteurs et les méthodes d'investigation:

Par dosage pondéral après purification, les teneurs en BPg sont aux alentours de 0,3 mg/L. Les concentrations de BPg estimées par mesure de son activité enzymatique s'étendent de 0,4 à 3 mg/L; les valeurs pour la plasmine seraient 10 fois inférieures.

Le tableau 1.2, proposé par HUMBERT (1991), résume les valeurs obtenues par différents auteurs pour le plasminogène et la plasmine.

Par dosage immunochimique (ELISA) avec des anticorps ne différenciant pas la plasmine du plasminogène, la teneur moyenne des laits individuels est de 3,7 mg/L, avec une plage de variation assez restreinte (de 2,6 à 4,8 mg/L) (COLLIN et al, 1988); le dosage de l'activité enzymatique des mêmes laits donne une moyenne de 1,3 mg/L; cette sous-estimation d'un facteur de 2,5 pourrait être due à l'occupation de certains sites actifs par des inhibiteurs.

Indépendamment de la méthode de dosage, un certain nombre de facteurs sont responsables de variations importantes de la concentration du plasminogène ou de son activité.

L'âge de la vache et le stade de lactation sont des facteurs qui influent sur le taux de BPg (SCHAAR, 1985). De même pour la race, puisqu'il a été rapporté que les vaches de race Frisonne ont deux fois plus d'activité plasmine que celles de race Jersey (RICHARDSON, 1983a). Par contre, elles sont plus pauvres en enzyme que les vaches de race Montbéliarde (BENSLIMANE et al, 1990).

Une étude menée à long terme a montré des variations saisonnières de l'activité plasmine, avec un maximum en été, contrastant avec une relative stabilité des taux de plasminogène (I.T.G., 1985 et 1986, cité par HUMBERT, 1986).

L'état sanitaire de la vache peut intervenir, en particulier lors de mammites où les teneurs en plasminogène et plasmine peuvent être augmentées (KAARTINEN et al, 1988).

Tableau 1.2 : Teneurs en BPg de différents types de laits

| <u>Type de lait</u> | <u>Auteurs</u> | <u>Teneur</u> | | <u>Méthode de dosage</u> |
|---------------------------------|---------------------------|---------------|-------------|---|
| | | <u>BPg</u> | <u>BPm</u> | |
| <u>Crus entiers individuels</u> | ROLLEMA et al 1981 | 0,3 | | dosage pondéral |
| | ROLLEMA et al 1983 | 0,7 à 2,4 | | dosage enzymatique |
| | KORYCKA-DAHL et al 1983 | 0,5 à 0,9 | 0,1 | dosage enzymatique |
| | SCHAAR 1985 | 0,4 | | dosage enzymatique |
| | POLITIS et al 1989 | 0,94 | 0,21 | dosage enzymatique |
| <u>Troupeaux</u> | BENSLIMANE et al 1990 | 0,17 à 1,82 | 0,17 à 0,42 | dosage enzymatique |
| <u>Crus entiers de mélange</u> | HALPAAP et al 1977 | 0,3 | | dosage pondéral |
| | De RHAM et ANDREW 1982 | 3,6 | 1,4 | dosage au TNBS |
| | RICHARDSON 1983b | 1,43 à 3 | 0,15 à 0,37 | dosage enzymatique |
| | SCHAAR 1985 | 0,4 | | dosage enzymatique |
| | | | | |
| <u>Crus entiers de mélange</u> | ITG 1985-1986 | 4,8 | 0,9 | dosage enzymatique |
| | BENSLIMANE et al 1990 | 0,83 à 1,59 | 0,15 à 0,32 | dosage enzymatique |
| <u>Entier pasteurisé</u> | RICHARDSON et PEARCE 1981 | 0,55 à 2,75 | 0,14 à 0,73 | dosage enzymatique |
| <u>Mammiteux</u> | KAARTINEN et al 1988 | 0,15 à 12,5 | | dosage de la caséolyse en gel d'agarose |

L'inflammation provoque une augmentation de la perméabilité des capillaires sanguins, avec un passage en plus grande quantité de plasminogène, mais aussi de ses activateurs, vers le lait (WESTERMAIR, 1984 cité par HUMBERT, 1986).

Certains traitements médicamenteux (comme la Somatotropine) peuvent provoquer une chute transitoire de la plasmine dans le lait des vaches traitées, cédant à l'arrêt de la médication (POLITIS et al, 1990).

POLITIS et KWAI HANG (1989) ont noté une augmentation de l'activation du plasminogène bovin en plasmine au cours de la lactation.

Peu d'études existent quant à l'influence de l'alimentation sur les teneurs en protéase alcaline des laits; en fait, il semble que celle-ci soit minime. BENSLIMANE et al (1990) observe des laits légèrement plus riches en enzyme chez des vaches nourries au régime ensilage ou foin par rapport à des vaches nourries au régime foin et betterave.

C.4/ Association aux caséines

L'association du BPg aux micelles de caséine se fait par l'intermédiaire de sites de liaison lysine, de la même manière qu'entre le plasminogène humain et le fibrinogène. En effet, le BPg est dissocié des micelles par de l'acide epsilon amino caproïque (ϵ AAC) ou de la lysine 0,1M (RICHARDSON, 1983a). Le BPg se dissocie aussi en présence de NaCl 1M (GRUFFERTY et FOX, 1988a) ou à pH inférieur à 4.6 (GRUFFERTY, 1986).

Le Kd de l'affinité plasminogène humain/fibrine est de 10^{-6} M à 10^{-7} M suivant la forme de l'HPg. (LUCAS et al, 1983). Les constantes de l'affinité BPg/caséines n'ont jamais été citées dans la littérature. Toutefois, d'une étude que nous menons actuellement, hors du cadre de cette thèse, il ressort que les constantes de dissociation du BPg pour les différentes caséines sont plus fortes, de l'ordre de 10^{-8} M (HAISSAT, 1993). De plus, une augmentation de la température (de $+4^{\circ}\text{C}$ à $+37^{\circ}\text{C}$) favorise l'association BPg/caséines, alors que celle de la concentration en NaCl a un effet inverse (HAISSAT, 1993).

C.5/ Propriétés de la protéase alcaline bovine

C'est une enzyme de type trypsique, qui possède la triade catalytique Asp-His-Ser et qui coupe ses substrats de façon spécifique sur des liaisons Lys-X

(WEINSTEIN et DOOLITTLE, 1972, cité par HUMBERT, 1986); certaines liaisons Arg-X sont aussi clivées, mais beaucoup plus lentement.

Son activité est optimale à des pH légèrement alcalins (7,2-7,5 et 8) (IGARASHI, 1989) et à 37 °C (MANJI et KAKUDA, 1986). HUMBERT et LINDEN (1987) ont démontré qu'à pH 5,5, l'enzyme conserve 20% de l'activité qu'elle développe au pH du lait.

L'enzyme conserve son activité après chauffage à 70°C pendant 10 minutes (RICHARDSON, 1983a); cette activité est même augmentée après pasteurisation (75°C, 15 secondes), ce qui serait peut-être dû à une inactivation d'un inhibiteur de l'enzyme (NOOMEN, 1975) ou d'un activateur de l'inhibiteur (RICHARDSON, 1983a).

C.6/ Conséquence de la protéolyse sur le lait

La formation de produits de dégradation des caséines dans le lait peut provoquer l'apparition de peptides amers (Mac KELLAR, 1981), dont le plus courant correspond aux 14 résidus C-terminaux de la caséine β , une modification de la viscosité, et parfois une gélification (laits U.H.T.) (DRIESSEN et al, 1981).

La protéolyse peut aussi intervenir lors de l'affinage des fromages, où une activité plasmine s'exerce sur les caséines, avec apparition de caséines γ (OKIGBO

et al, 1985) et même d'acides aminés libres dans certains types de fromages (REITER et al, 1969). Le haut degré d'humidité retrouvé dans des fromages provenant d'une lactation tardive en est aussi une conséquence (DONNELLY et al, 1984).

Selon VOIRIN (1991), l'attaque des caséines par la plasmine accélère la cinétique de la coagulation par la présure. Le gel est ainsi obtenu plus rapidement et présente une meilleure fermeté.

GRUFFERTY et FOX (1988b) lient l'augmentation du temps de prise à celle de la plasmine au cours de la lactation. PEARCE et al (1986) attribuent ces changements à des variations du pH et de certains sels lors de la lactation.

C.7/ Purification de la protéase alcaline du lait

De nombreuses méthodes ont été décrites; elles ont en commun une première phase d'acidification des caséines à pH 4,6 suivie d'une précipitation au sulfate d'ammonium. Puis l'enzyme est isolée par chromatographie: filtration sur gel de dextran (KAMINOGAWA et al, 1971), échange d'ions sur colonne de DEAE- et CM-cellulose (CHEN et LEDFORD, 1971) ou affinité. Cette dernière méthode est la plus enrichissante en BPg à partir des caséines (environ 90 fois); le liant peut être de la Lysine-Sepharose ou un immunoadsorbant (HUMBERT et al, 1990).

C.8/ Dosage du BPg dans le lait

C.8.1/ Immunodosage

Les dosages immunochimiques donnent un reflet fidèle de la concentration moléculaire de la protéase alcaline dans le lait. Plusieurs dosages de type ELISA ont été décrits: soit par utilisation d'anticorps polyclonaux anti plasminogène/plasmine bovin fixés sur les puits (COLLIN et al, 1988), soit en se basant sur un fort croisement avec l'espèce humaine, impliquant des anticorps anti plasminogène humain en réaction avec les échantillons fixés dans les cupules de microtitration (POLITIS et al, 1993).

Une analyse par western blot permet une estimation moléculaire qualitative de la protéase alcaline du lait (POLITIS et al, 1993).

C.8.2/ Dosage de l'activité de l'enzyme

Les tests mis au point pour le lait dérivent de ceux utilisés en clinique humaine, grâce à la similitude des deux molécules. Pour la détermination de l'activité de l'enzyme, les substrats synthétiques sont les plus employés, notamment le S2251 (Kabi Diagnostic, Suède) qui, en présence de l'enzyme, libère de la p-nitroaniline dont l'absorbance est mesurée à 405 nm (AALTONEN et al, 1988). Une évaluation des taux de plasminogène dans le lait est possible par comparaison à un étalonnage après activation à l'urokinase (ROLLEMA et al, 1983).

L'étude des résultats de COLLIN et al (1988) sur des laits individuels montre une corrélation positive ($r = 0,787$, $p < 0,01$) entre activité et concentration moléculaire de la

protéase alcaline, malgré un facteur 2,5 entre les deux dosages; cette sous-estimation par le dosage de l'activité pourrait être due à une occupation de certains sites actifs par des inhibiteurs.

Cette hypothèse a été développée par POLITIS et al (1993), qui estime que les protéines du lactosérum pourraient jouer le rôle des inhibiteurs responsables de la sous-estimation; ils proposent donc une modification du dosage tendant à les éliminer.

D/ Les activateurs du BPg

D.1/ Activateurs endogènes

Pendant longtemps, les activateurs n'ont pu être isolés et déterminés avec certitude. Leur présence était déduite de leur activité sur le plasminogène.

Récemment, POLITIS et al (1991) ont démontré que les macrophages du lait bovin produisaient des activateurs du plasminogène.

Depuis, LU et NIELSEN (1993a et b) ont isolé et caractérisé 5 activateurs du plasminogène, de masse moléculaire 93 000, 57 000, 42 000, 35 000 et 27 000 Da.

Leur activité n'est pas augmentée en présence de fibrine, ce qui indique qu'ils sont plutôt de type urokinase. Par contre, ces activateurs ne croisent pas avec des anticorps anti Urokinase et tPA humains.

Les activateurs sont relativement thermostables, gardant leur propriété activatrice après un chauffage de 10 minutes à 70°C, mais la perdant à 80°C (RICHARDSON, 1983a).

L'activation se ferait en partie dans le lait, en partie dans la mamelle (RICHARDSON, 1983a).

D.2/ Activateurs exogènes

La kallikréine active la plasmine des laits humains (HORIE et al, 1982).

L'urokinase est l'activateur le plus utilisé pour les dosages d'activité. La streptokinase, quant à elle, est sans effet sur le plasminogène bovin (SCHALLER et RICKLI, 1988).

E/ Les inhibiteurs du BPg

E.1/ Inhibiteurs endogènes

Contrairement aux activateurs, les inhibiteurs sont localisés dans la phase soluble. Ils seraient au nombre de trois, de masse molaire variable (13 000, 65 000 et 700 000 Da). Deux correspondraient à l' α 2 antiplasmine et à l' α 2 macroglobuline plasmatiques (HONKANEN-BUZALSKI et SANDHOLM, 1981).

Certains auteurs ont proposé l'existence d'un inhibiteur de l'activateur, dont la thermolabilité serait responsable de l'augmentation de l'activité plasmine dans des laits pasteurisés (RICHARDSON, 1983a).

La β lactoglobuline est connue pour provoquer une perte de l'activation en plasmine (GRUFFERTY, 1986). La β Lactoglobuline native inhibe plus l'action de la plasmine sur les caséines que la β Lactoglobuline dénaturée, au contraire de son action sur un substrat synthétique (BASTIAN et al, 1993).

POLITIS et al (1993) ont montré que l' α lactalbumine et l'albumine sérique bovine possédaient aussi cette propriété, l'effet le plus important revenant à l'albumine sérique bovine.

E.2/ Inhibiteurs exogènes

Le BPg est partiellement inhibé par le magnésium, le calcium, totalement par le cuivre, le zinc, le mercure (GRUFFERTY et FOX, 1988a).

Les inhibiteurs de type trypsique (TLCK, aprotinine, inhibiteur trypsique du soja) et le di-isopropylfluorophosphate (DFP), inhibiteur des protéases à sérine, ont une action sur le BPg (CHEN et LEDFORD, 1971; KAMINOGAWA et al, 1972).

Le chloroforme (1%), le chlorure de sodium (15%) ou l'alcool (1%) inhibent l'activité protéolytique (GED et ALAIS, 1976).

Les activateurs du BPg sont inhibés par le PAI-1, l' α 2 antiplasmine humaine, mais pas par l' α 1 antithrombine humaine (LU et NIELSEN, 1993). Selon les mêmes auteurs, les inhibiteurs de la trypsine (TLCK) et de la chymotrypsine (TPCK) inhibent aussi les activateurs du BPg.

F/ Les caséines, substrats naturels de la plasmine

Il existe trois formes principales de caséine: les caséines α S (subdivisée en α S1 et α S2, produites par deux gènes différents), β et κ .

Chaque type de caséine possède des variants génétiques, présentant des substitutions ou des délétions de un ou deux acides aminés à l'intérieur des chaînes polypeptidiques, qui peuvent impliquer des changements dans leurs propriétés physico-chimiques. De plus, on peut trouver des degrés de phosphorylation et de glycosylation différents sur des résidus sérine et thréonine (dû à des modifications post-traductionnelles) (SWAISGOOD, 1993).

Les principaux produits de dégradation de la caséine β par la plasmine sont les caséines γ : γ 1 ou β -CN f(29-209), γ 2 ou β -CN f(106-209) et γ 3 ou β -CN f(108-209), et certaines protéose-peptones: PP5 ou β -CN f(1-105/7), PP8 lent ou β -CN f(28-105/7) et PP8 rapide ou β -CN f(1-28). Ces dernières se trouvent dans la fraction soluble du lait.

La composition des caséines en acides aminés est assez proche de celle des protéines globulaires classiques et leur hydrophobicité moyenne est à peine plus élevée; elles manifestent de plus une tendance à s'autopolymériser (SWAISGOOD, 1993).

Les caséines, à l'exception de la caséine κ , sont sensibles aux concentrations de cations dans le milieu, notamment de calcium. En effet, la liaison du calcium aux caséines modifie leur charge nette (réduction de la charge négative) et diminue alors les répulsions électrostatiques, laissant le champ libre aux interactions hydrophobes qui augmentent le degré de polymérisation, pouvant aller jusqu'à la précipitation (AOKI et al, 1985). Le calcium se lie principalement aux résidus phosphosérine (ONO et al, 1980), d'une façon dépendante du pH, de la température et de la force ionique du milieu. Il est intéressant de noter que les trois caséines sensibles au calcium proviennent d'une même famille de gènes (BONSING et Mac KINLAY, 1987), alors que la caséine κ a une origine commune avec le fibrinogène gamma (JOLLES et al, 1986).

Les caséines, comme la plupart des sphéroprotéines, peuvent s'associer entre elles sous forme de polymères; ce sont surtout des interactions hydrophobes qui sont responsables de ces interactions.

La structure des caséines présente une grande flexibilité, ce qui les rend plus

accessibles aux protéases (SWAISGOOD, 1989); cette structure lâche permet aussi leur imbrication lors de la formation des micelles. La structure tri-dimensionnelle des caséines a récemment été étudiée par FARRELL et al (1993) grâce à des programmes de modélisation moléculaire.

F.1/ Caséine α S1

La caséine α S1 est composée de 199 résidus pour une masse molaire de 23 600 Da. Ses parties N- et C-terminales sont hydrophobes, alors que la partie des AA 40 à 80 représente un domaine hydrophile phosphoré (cf. tableau récapitulatif en fin de chapitre).

La structure secondaire n'est pas connue avec précision, mais on estime qu'au moins la moitié des résidus se trouve dans des structures en hélice α ou en feuillet β (HOLT et SAWYER, 1988). La partie hydrophobe C-terminale possède un motif en coude ou " β turn" double. Cette structure est relativement lâche, de par l'absence de Cys et une présence irrégulière de Pro.

Les caséines α S1 s'associent entre elles pratiquement sous toutes les formes de polymères (dimères, tétramères, hexamères...), selon le pH et la force ionique de la solution, avec un maximum de 24 unités (SCHMIDT, 1970 a et b). Monomères et oligomères peuvent coexister en solution; à une concentration de 1 mg/ml et un pH de 6,6, une force ionique de 0,03 permet de n'avoir que des monomères en solution (SCHMIDT, 1970b). Enfin, les caséines α S1 sont sensibles à l'action du calcium, puisqu'elles précipitent en sa présence (3 à 8 mM de calcium) (AOKI et al, 1985).

F.2/ Caséine α S2

Elle est constituée de 207 acides aminés pour une masse molaire de 25 250 Da. La plus hydrophile de toutes les caséines, elle contient notamment trois domaines de charge nette élevée, due à des résidus phosphosérine et glutamine. Deux séquences hydrophobes se trouvent au centre et à l'extrémité C-terminale de la molécule (AA 90 à 120 et 160 à 207). Cette dernière n'en a pas moins une charge nette positive élevée (+9,5). Si l'on ajoute que la partie N-terminale a une charge de -21, on comprend facilement qu'avec une telle structure amphiphile les caséines α S2 soient les caséines les plus sensibles à la force ionique et au calcium du milieu (cf. tableau en fin

de chapitre).

Leur polymérisation est moins grande que celle des caséines α S1, probablement à cause d'une plus grande répulsion électrostatique et d'une moins grande hydrophobicité. Cette association est maximale pour une force ionique de 0,2-0,3, puis diminue pour des forces ioniques plus élevées, consécutivement à la suppression d'une interaction électrostatique entre les domaines N- et C-terminaux (SNOEREN et al, 1980).

Leur structure secondaire est proche de celle des caséines α S1, faite d'hélices α et de feuillets β sur plus de la moitié des résidus (HOLT et SAWYER, 1988).

F.3/ Caséine β

D'une masse molaire de 24 000 Da, elle comprend 209 résidus. La plus hydrophobe des caséines, elle est composée d'une partie N-terminale polaire très anionique et d'une très grande zone hydrophobe peu ou pas chargée, correspondant aux trois quarts de la molécule (jusqu'à l'extrémité N-terminale). Cette zone joue un rôle essentiel dans la polymérisation de la protéine (cf. le tableau récapitulatif en fin de chapitre).

En raison d'une grande quantité de résidus proline (environ 35 par molécule, soit un résidu sur six), les caséines β ont une structure différente des autres; en effet, ces résidus étant répartis tout au long de la molécule, la caséine β n'a pas de structure secondaire en hélice α .

Les caséines β peuvent se polymériser, de façon variable suivant leur concentration et la force ionique; mais ce sont les seules à se dépolymériser à basse température (0 à 4°C), propriété caractéristique des liaisons hydrophobes endothermiques (PAYENS et Van MARKWIJK, 1963). Ce sont les interactions hydrophobes des extrémités C-terminales qui en sont responsables (EVANS et PHILLIPS, 1979).

F.4/ Caséines γ et protéose-peptones

Ce sont principalement les produits de dégradation de la caséine β par la

plasmine. Les caséines γ correspondent aux fragments C-terminaux, les protéose-peptones, sauf le PP8 lent, aux fragments N-terminaux (figure 1.20) :

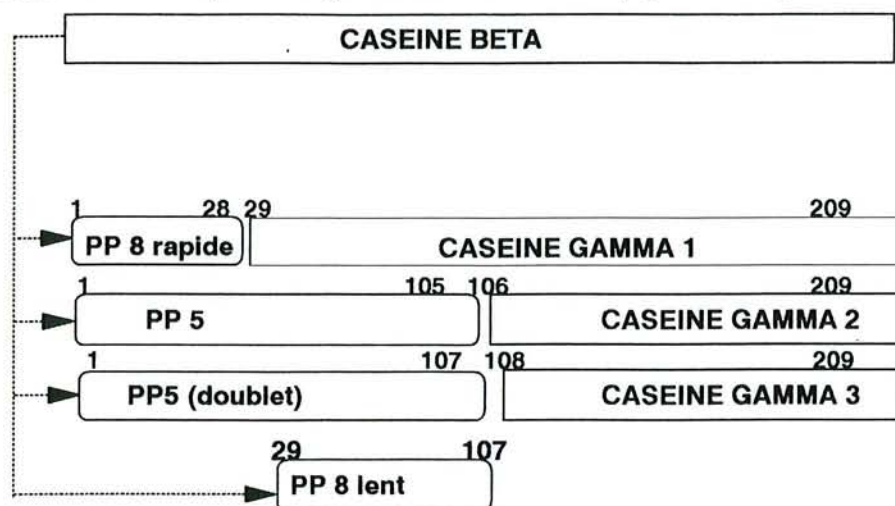


Figure 1.20 : Produits de la protéolyse de la caséine β par la plasmine (d'après ALAIS, 1984)

Les caséines γ précipitent avec les autres caséines à pH 4,6, tandis que les protéose-peptones sont solubles dans le lactosérum.

F.5/ Caséine κ

Ce sont les plus petites des caséines natives, avec un enchaînement de 169 acides aminés. Leur masse molaire est de 19 000 Da.

Elles se révèlent assez différentes des autres, ne serait-ce que par la présence d'un seul résidu phosphosérine, ce qui les rend résistantes vis-à-vis du calcium; ce sont elles qui stabilisent les micelles en présence de calcium.

Elles ont une structure amphipathique, avec une partie N-terminale hydrophobe (résidus 1 à 105) et une partie C-terminale polaire hydrophile chargée négativement (résidus 106 à 169) (cf. tableau récapitulatif).

La chymosine coupe précisément la liaison Phe₁₀₅-Met₁₀₆ par une protéolyse limitée, libérant un gros polypeptide soluble, le caséinomacroglycopeptide, et une partie insoluble, la paracaséine κ

Leur structure secondaire est très ordonnée, faite de longues régions en hélice α , de quelques feuillets β et d'un double coude β centré sur la région Phe₁₀₅-Met₁₀₆, d'où la sensibilité à la chymosine (LORIENT, 1991).

Les caséines κ s'associent en polymères d'une trentaine d'unités, qui sont très peu sensibles aux changements de température ou de force ionique, en partie à cause de la faible charge de la région C-terminale (VREEMAN, 1979).

F.6/ Les micelles de caséine

F.6.1/ Association de caséines

Comme nous l'avons vu précédemment, les caséines isolées en solution sont capables de s'associer en homopolymères sous l'influence d'interactions hydrophobes. Mélangées deux à deux, elles peuvent aussi s'associer entre elles, principalement α_S / β , α_S / κ et β / κ (ROLLEMA, 1993).

L'association des trois caséines en solution, en présence de calcium, donne une structure de type micellaire. En absence de caséine κ , cette structure ne se forme pas car les caséinates précipitent; les caséines κ sont donc indispensables pour stabiliser la micelle. Le calcium, quant à lui, formerait des ponts entre des paires de groupes acides. Ces micelles "synthétiques" ne sont pas identiques à celles du lait, surtout au niveau de leur taille.

F.6.2/ Composition des micelles

Dans le lait, l'environnement ionique est différent: outre du calcium sous forme de phosphate, on trouve dans les micelles du magnésium, du sodium, du potassium et du citrate. Leur diamètre moyen est de 150nm, mais il y a de fortes variations, puisqu'il peut monter jusqu'à 600nm.

Les études par microscopie électronique ou par des techniques immunologiques ont donné des résultats contradictoires quant à la répartition des différentes caséines dans la micelle (SCHMIDT et BOTH, 1982; CARROLL et FARRELL, 1983; HORISBERGER et VAUTHEY, 1984): la caséine κ se trouve-t-elle à la surface, ou est-elle répartie de façon uniforme? L'étude de la variation de la taille des micelles en

fonction de leur composition en caséines permet d'émettre une hypothèse intermédiaire: la surface serait composée des trois caséines, α S et κ en proportion équimoléculaire et β en faible quantité, alors qu'à l'intérieur les caséines α S et β domineraient, la caséine κ n'intervenant qu'en très faible quantité (DALGLEISH et al, 1989).

Au microscope électronique, les micelles n'apparaissent pas homogènes, mais présentent des granulations d'environ 10 nm de diamètre. Ces structures ont été décrites comme des sub-micelles, composées d'une dizaine d'unités de chacune des caséines. Leur existence a été confirmée par d'autres techniques d'investigation (STOTHART, 1989).

F.6.3/ Modèles de structure micellaire

Trois types de modèles co-existent, mais nous ne nous intéresserons qu'aux modèles à sous-unités, les plus satisfaisants à l'heure actuelle.

Les premiers à proposer de tels modèles furent SLATTERY et EVARD (1973). Selon eux, les sub-micelles seraient constituées d'un corps hydrophobe composé de caséines α S et β , responsables de l'association des sub-micelles, et d'une calotte hydrophile formée de caséine κ ; leur croissance s'arrêterait une fois la surface de la micelle entièrement recouverte de la partie hydrophile des caséines κ . Ceci pourrait expliquer l'importance de cette caséine dans la régulation de la taille des micelles (figure 1.21) :

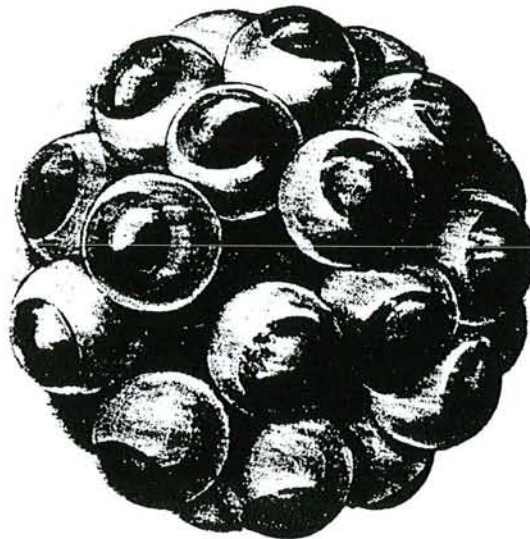


Figure 1.21 : Modèle de micelle d'après SLATTERY et EVARD (1973)

Le modèle de SCHMIDT et BOTH (1982) reprend l'idée des sub-micelles anisotropes de SLATTERY, mais propose un noyau hydrophobe où se trouveraient les parties apolaires de toutes les caséines, entouré d'une couche polaire, composée des parties fortement chargées des caséines $\alpha S1$, $\alpha S2$ et β . La caséine κ occuperait une place à part dans cette enveloppe. De plus, SCHMIDT émet l'hypothèse que les ancrages entre ces sub-micelles seraient dûs à des interactions électrostatiques entre les groupes esters phosphoriques des caséines de la calotte (donc surtout les caséines αS et β) et le phosphate tricalcique $Ca_3(PO_4)_3$ présent dans les micelles. Dans ce cas, l'arrêt de leur croissance résulterait du recouvrement de la surface par la caséine κ , qui, possédant très peu de résidus phosphosérines, ne permet plus la liaison d'autres sub-micelles (figure 1.22) :

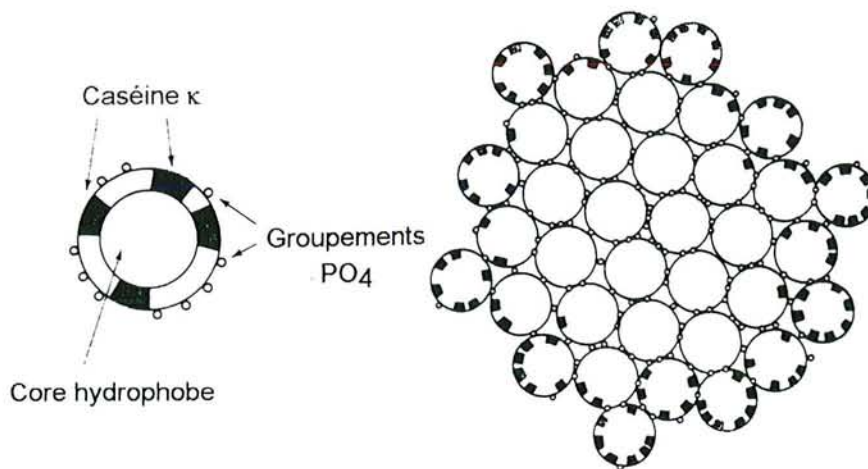


Figure 1.22 : Modèle de micelle d'après SCHMIDT et BOTH (1982)

WALSTRA (1990) décrit une extension du modèle de SCHMIDT dans lequel le domaine C-terminal des caséines κ se trouve à l'extérieur de la surface micellaire, sous forme de "cheveu" (figure 1.23) :

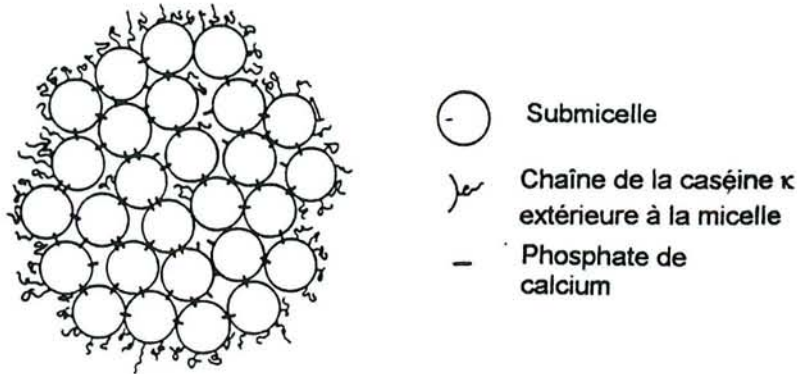


Figure 1.23: Modèle de micelle d'après WALSTRA (1990)

Le modèle le plus proche de la réalité se trouve peut-être dans une combinaison de ces trois propositions, chacune pouvant donner lieu à des objections.

F.6.4/ Coagulation des micelles

F.6.4.1/ Coagulation par acidification

Lorsqu'on abaisse le pH du lait, on diminue l'ionisation des fonctions acides des caséines. Le potentiel de surface est alors réduit, le calcium et le phosphate inorganique se déplaçant de la micelle vers la phase aqueuse. Il y a désagrégation de la micelle; les sous-unités micellaires elles-mêmes auront tendance à se dépolymériser. Au pH isoélectrique de 4,6, les caséines ne contiennent plus de calcium et leur charge est neutre, provoquant leur précipitation (ALAIS, 1984).

F.6.4.2/ Coagulation par les enzymes.

L'enzyme la plus utilisée est la présure, mélange de chymosine (80%) et de pepsine (20%). Ce type de coagulation comporte au moins deux phases (ALAIS, 1984):

Une phase primaire, au cours de laquelle la présure hydrolyse la liaison Phe105-Met106 des caséines κ , libérant la paracaséine κ (basique et hydrophobe), qui reste intégrée à la micelle, et le caséinomacroglycopeptide (acide et hydrophile), qui rejoint le sérum.

Une phase secondaire (ou phase de coagulation), qui correspond à la formation du gel par association des micelles ainsi modifiées. La nature des liaisons qui président à cette ré-association n'est pas connue avec précision. Il pourrait s'agir de liaisons hydrophobes ou de ponts disulfures entre les paracaséines kappa, de liaisons salines (calcium et phosphate de calcium) entre les caséines α S et β . Le réseau formé serait plus lâche que dans la micelle initiale, emprisonnant alors la totalité de la phase aqueuse.

SCHER (1988) décrit le processus de coagulation en quatre étapes: une phase enzymatique (correspondant à la phase primaire), une phase d'agrégation, une phase de transition sol-gel et une phase de gélification et de raffermissement du gel.

La coagulation enzymatique est sous la dépendance de la concentration en présure, mais aussi du pH (le temps de coagulation est plus court à pH 6 qu'au pH du lait), de la température du milieu (la vitesse de coagulation est optimale vers 40°C) et du calcium.

Ultérieurement, il se produit une protéolyse générale des caséines coagulées par la chymosine, puis le phénomène de synérèse, c'est à dire une rétraction du coagulum avec expulsion du lactosérum.

F.7/ Teneurs et facteurs de variations

Le tableau suivant montre les teneurs des différentes caséines dans le lait de vache en fonction de la méthode d'évaluation (d'après HUMBERT et al, 1991, complété par nos soins):

Tableau 1.3: Teneur en caséines des laits selon différents auteurs

| <u>Caseines</u> | <u>Teneur (g/L)</u> | <u>Méthode</u> | <u>Référence</u> |
|-----------------|---------------------|----------------|-----------------------------|
| α S | 13.3-15.6 | Electrophorèse | HAENLEIN et al (1973) |
| α S1 | 8.3-10.1 | Electrophorèse | Mac LEAN et al (1984) |
| α S2 | 2.9-4.1 | Electrophorèse | Mac LEAN et al (1984) |
| α S1 | 9.7-10.8 | DEAE cellulose | DAVIES et LAW (1980) |
| α S2 | 2.5-2.9 | DEAE cellulose | DAVIES et LAW (1980) |
| α S1 | 10.0 | Kjeldahl | KARMAN et Van BOEKEL (1986) |
| α S2 | 2.6 | Kjeldahl | KARMAN et Van BOEKEL (1986) |
| α S | 9.3-11.9 | INM | COLLARD-BOVY et al (1991) |
| β | 10.8 | Electrophorèse | Mac LEAN et al (1984) |
| β | 9.5 | DEAE-cellulose | DAVIES et LAW (1977) |
| κ | 2.7-3.9 | Electrophorèse | Mac LEAN et al (1984) |
| κ | 3.1-3.8 | DEAE-cellulose | DAVIES et LAW (1980) |
| κ | 3.3 | Kjeldahl | KARMAN et Van BOEKEL (1986) |
| κ | 2.2-3.4 | INM | COLLARD-BOVY et al (1991) |

De nombreux facteurs influencent les taux de caséine dans les laits.

A l'heure actuelle, il est possible d'expliquer environ 50% des variations du taux protéique par des facteurs alimentaires, génétiques ou par la tenue du troupeau (COLIN, 1990).

Il est maintenant bien établi que certaines variations de la composition de la ration alimentaire influencent directement les taux de protéines et en particulier des caséines (LAURENT et al, 1991).

La race de la vache influence aussi les teneurs en caséine. Les variants génétiques A et B de la caséine κ , qui se répartissent différemment suivant les races, donnent des laits de fromageabilité très inégale: les homozygotes BB, prépondérants dans la race Normande, auront un lait plus riche en caséines que les homozygotes AA, fréquemment observés dans les races Holstein ou Montbéliarde (DUPLAN, 1991).

F.8/ Techniques d'analyse des caséines

F.8.1/ Techniques électrophorétiques

L'électrophorèse est la technique la plus utilisée pour déterminer qualitativement les caséines. Elle trouve son utilité notamment dans le phénotypage des laits (variants génétiques) (GRAPPIN et RIBADEAU-DUMAS, 1993) et la recherche d'adultérations. Pour quantifier les caséines, une analyse densitométrique des bandes d'électrophorèse est nécessaire (BASCH et al, 1985). Ce type d'analyse présente cependant l'inconvénient d'avoir une exactitude limitée (fixation du colorant variable, bruits de fond, etc...).

L'isoélectrofocalisation sépare les caséines en fonction de leur pH isoélectrique, ce qui permet d'obtenir une résolution supérieure à l'électrophorèse classique, en particulier pour le typage des variants (VEGARUD et al, 1989). De plus, un grand nombre d'échantillons peut être traité en un temps inférieur à 1 heure (SEIBERT et al, 1985).

L'électrophorèse bidimensionnelle, qui combine une électrofocalisation à une électrophorèse en SDS-PAGE, permet d'obtenir une bonne résolution pour les caséines, en particulier dans des hydrolysats complexes des protéines du lait. La technique a aussi été utilisée pour suivre l'affinage du fromage (MIRANDA, 1983).

F.8.2/ Techniques chromatographiques

La filtration sur gel est peu utilisée pour séparer les différentes caséines et offre une résolution trop faible pour pouvoir les quantifier avec précision (GUPTA, 1983). Cette technique est surtout réservée aux protéines du lactosérum.

La chromatographie d'échange d'ions est plus employée pour purifier les caséines, à partir de caséine entière. L'échange d'anions sur DEAE-cellulose (MERCIER et al, 1968) ou sur colonne mono-Q (GUILLOU et al, 1987; HOLLAR et al, 1991) est couramment utilisé. L'échange de cations sur mono-S permet d'éluer les caséines dans l'ordre suivant: caséines β , κ et γ , α (St-MARTIN et PAQUIN, 1990).

Une fois séparées, les caséines peuvent être quantifiées par une micro-méthode

colorimétrique telle que la réaction du biuret (DAVIES et LAW, 1977) ou de BRADFORD (1976).

Les CLHP d'interaction hydrophobe et en phase inverse sont plus performantes. A partir de caséine entière, l'élution permet de séparer dans l'ordre les caséines α S1, α S2, β et κ (CARLES et RIBADEAU-DUMAS, 1986; SANOGO et al, 1989). La résolution de tels systèmes permet de séparer des variants génétiques de caséine β ne se différenciant que par une substitution (Pro \rightarrow Leu).

La chromatographie d'affinité sur hydroxyapatite est utilisée pour les caséines, dont l'élution se fait suivant le nombre de groupements phosphate (dans l'ordre: caséine κ , β et α S) (VISSER et al, 1986).

STRANGE et al (1992) ont présenté une synthèse des différentes méthodes chromatographiques utilisées pour caractériser et quantifier les caséines.

F.8.3/ Techniques spectrométriques

La spectrométrie infrarouge a connu un développement récent dans ce domaine, avec le dosage des protéines précipitables (CASADO CIMIANO et al, 1990).

F.8.4/ Techniques immunologiques

Il est possible d'appliquer aux caséines la plupart des techniques immunologiques couramment employées en biologie humaine.

Ainsi, l'immunoprécipitation en milieu liquide ou l'immunoélectrophorèse permettent à une détermination qualitative des caséines (CHTOUROU et al, 1985).

L'électroimmunodiffusion est aussi largement utilisée, notamment pour quantifier les caséines dans certains produits alimentaires (DRIOU et al, 1984).

Ces techniques, malgré leur manque de sensibilité, permettent, dans un temps relativement court, l'analyse de petites séries d'échantillons, avec un appareillage peu onéreux.

Les techniques de type immunoenzymatique ou immunonéphélométrique apportent une grande sensibilité au dosage des caséines, bien que nécessitant un appareillage plus onéreux, un personnel plus qualifié et parfois des contraintes d'utilisation.

L'ELISA connaît actuellement de nombreuses applications dans le domaine des caséines. Cette technique permet de doser non seulement les caséines, mais aussi des parties de celles-ci, notamment des séquences spécifiques d'espèce (ROLLAND et al, 1993).

Plus rapide, l'immunonéphélométrie permet le dosage des trois caséines (El HAMOUI et al, 1982). Cette thèse fait partie d'une série de travaux qui ont permis le dosage par immunonéphélométrie microparticulaire de protéines du lactosérum (MARCHAL et al, 1991), des IgG bovines (MONTAGNE et al, 1991) et des trois caséines (COLLARD-BOVY et al, 1991; El BARI et al, 1991).

F.8.5/ Autres techniques

Le dosage de l'azote caséinique, après précipitation de celles-ci et redissolution, est souvent utilisé en contrôle. La méthode de Kjeldahl est la plus employée, mais d'autres méthodes existent, notamment par digestion au peroxyde d'hydrogène et à l'acide sulfurique (MEHNERT et HUDEC, 1989).

GALAUP (1991) cite un dosage colorimétrique par la méthode au Noir Amido, après coagulation à la présure.

La DIE (Direct Injection Enthalpimetry) consiste à mesurer la chaleur dégagée lors de la précipitation des caséines au pH_i. Cette quantité est proportionnelle à la quantité de caséines (BARK et HADIPRANOTO, 1991).

G/ La protéolyse dans le lait

G.1/ Activation du BPg

Le principe est le même que pour l'activation de l'HPg. La molécule est activée par de faibles quantités de plasmine qui coupe la liaison Lys77-Arg78 et par l'activateur du BPg qui clive la liaison Arg577 - Val578.

Si on se réfère au sang, la voie:

Asp-Pg ---> Arg-Pg ---> Arg-Pm
est prépondérante (LUCAS et al, 1983).

Les caséines, en se liant au plasminogène, provoquent un changement de conformation de celui-ci en une forme ouverte, qui facilite l'activation en plasmine (MARKUS et al, 1993).

G.2/ Action de la plasmine sur les caséines

L'activité protéolytique de la plasmine s'exerce préférentiellement sur les caséines β et $\alpha S2$ (VOIRIN, 1991), à des vitesses sensiblement identiques (SNOEREN et Van RIEL, 1979). La caséine $\alpha S1$ est hydrolysée trois fois plus lentement (NOOMEN, 1975) et la caséine κ ne l'est que très peu (EIGEL, 1977).

G.2.1/ Action sur la caséine $\alpha S1$

On observe l'apparition de produits de dégradation, qui n'ont pas été identifiés; deux d'entre eux possèdent des résidus phosphorés et trois autres ont des masses molaires de 20 500, 12 300 et 10 300 Da (ANDREWS, 1983)

Deux peptides d'hydrolyse, de masse molaire 5 500 et 6 000 Da, ont été identifiés comme étant la caséine λ , fraction mineure de la caséine entière (AIMUTIS et EIGEL, 1982).

G.2.2/ Action sur la caséine $\alpha S2$

Les produits de l'hydrolyse de la caséine $\alpha S2$ par la plasmine correspondent à des peptides anioniques à haute mobilité électrophorétique à pH 9 (plus rapide que la caséine elle même) et d'autres à migration cationique (LE BARS et GRIPON, 1989).

G.2.3/ Action sur la caséine β

La dégradation protéolytique de la caséine β conduit aux caséines gamma et à certaines protéose-peptones.

Selon ANDREWS (1978 a et b), le PP5 est le mélange de deux peptides correspondant aux séquences 1-105 et 1-107 et le PP8 rapide correspond au peptide 1-28 de la caséine β . Le PP8 lent serait, selon EIGEL et KEENAN (1979), un produit de dégradation plus tardif de la protéine, comprenant les résidus 29 à 105 de la caséine β , ce que contestent ANDREWS et ALICHANIDIS (1983). Les travaux de VOIRIN (1991) semblent confirmer l'origine caséinique du PP8 lent.

La totalité des protéose-peptones représente au moins 38 fragments, dont 25 peuvent être imputés à l'action de la plasmine sur les caséines. SCHAAR (1985) estime que seulement 23% des protéose-peptones formées le sont après excrétion par la mamelle.

GREENBERG et GROVES (1984) notent que, dans le lait humain, la plasmine clive la caséine bêta de façon similaire au lait bovin.

G.2.4/ Action sur la caséine κ

La caséine κ est très résistante à l'action de la protéolyse plasminique et suivant les conditions, elle est peu (ANDREWS, 1983) ou pas (CHEN et LEDFORD, 1971) hydrolysée par l'enzyme.

H/ Conclusions

Le système caséinolytique du lait est très proche du système fibrinolytique sanguin. De par son origine : le plasminogène du lait n'est autre que le plasminogène sanguin ayant migré via la glande mammaire; les caséines κ et le fibrinogène γ présentent une origine génétique commune. De par son fonctionnement: la cascade des activateurs, inhibiteurs et inhibiteurs des activateurs, régule l'activation en plasmine donc la lyse de micelles (de caséines) ou de caillot (de fibrine). Enfin, le plasminogène est très conservé à travers les espèces et l'homologie humain-bovin est importante.

Le rôle prépondérant du plasminogène dans la protéolyse des caséines -et donc dans la qualité des laits et des produits laitiers- rend son dosage indispensable. Comme nous l'avons évoqué dans ce chapitre, les dosages enzymatiques ne peuvent se substituer aux dosages immunologiques pour l'évaluation de la concentration moléculaire du BPg, les deux types de dosage étant tout à fait complémentaire dans l'étude de la

qualité du lait.

IV/ Objectifs

Nous proposons d'utiliser l'immunonéphélométrie microparticulaire pour étudier le système protéolytique du plasminogène. Cette méthode a déjà été validée en milieu sérique et en milieu lait pour d'autres protéines.

La mise au point du dosage du plasminogène sérique humain sera optimisée de façon à éviter tout pré-traitement des échantillons. Cette mise au point sera, dans un premier temps, utilisée pour évaluer le plasminogène bovin en milieu synthétique, grâce à la forte homologie de la molécule entre les deux espèces, puis nous entreprendrons la construction d'un système plus performant, dans l'optique d'un dosage d'échantillons de lait. Toutefois, dans le cas du plasminogène bovin, la faiblesse de sa teneur dans le lait impliquant de faibles dilutions des échantillons, ce fait nécessitera une étude approfondie des influences d'un milieu si complexe sur les réactifs microparticulaires.

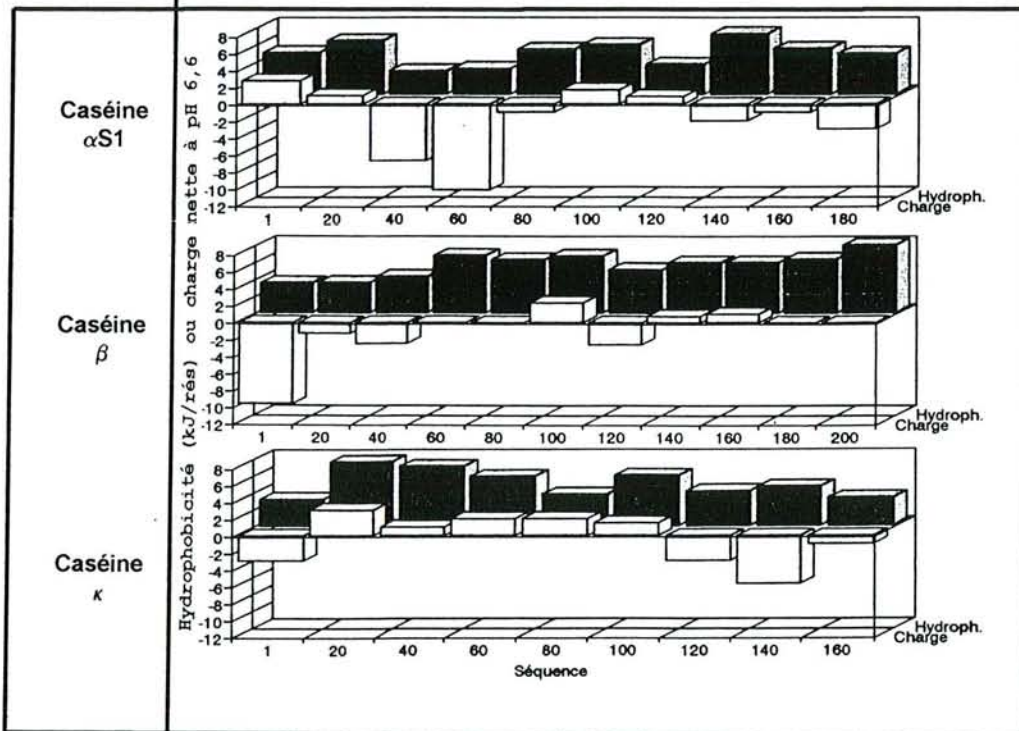
Muni de ces outils, nous étudierons les taux comparés du plasminogène et de son substrat dans les laits provenant d'un cheptel de troupeaux sélectionnés selon des critères particuliers. Ces résultats nous permettront de mieux évaluer les liens entre ces deux paramètres.

Tableau récapitulatif :

Propriétés et caractéristiques des différentes caséines du lait

| | % CN totales | Masse molaire | Acides aminés | Variants génétiques | pHi | Sensibilité au Ca |
|---------------------|--------------|-----------------|---------------|-----------------------|-----|-------------------|
| Caséine α S1 | 36 | 23 600 | 199 | A, B, C, D | 5 | + |
| Caséine α S2 | 10 | 25 520 | 207 | A, B, D | 5.3 | + |
| Caséine β | 34 | 24 000 | 209 | A1, A2, A3 B, C, E | 5.1 | ++ |
| Caséine κ | 13 | 19 000 | 169 | A, B | 5.6 | 0 |
| Caséines γ | 7 | 12 000 à 20 000 | 101 à 181 | A1, A2, A3 B | | |
| Protéose-peptones | | 4 000 à 40 000 | 28 à 107 | | | |

Charge et hydrophobicité



DEUXIEME PARTIE

MATERIEL ET METHODES

INTRODUCTION

Après un premier chapitre où nous détaillerons les produits consommables et matériels utilisés, cette partie regroupe dans un deuxième chapitre les principales méthodes auxquelles nous avons eu recours lors de ce travail. Nous évoquerons en premier lieu l'immunonéphélométrie microparticulaire, en particulier les lois qui régissent la dispersion de la lumière, la fabrication et la sensibilisation de nos réactifs particuliers. Puis, nous détaillerons les immunsérums utilisés (origine, fabrication...). Enfin, nous allons inventorier les méthodes de purification et de dosage nécessaires à l'accomplissement de ce travail.

MATERIEL

I/ REACTIFS

Tous les réactifs chimiques utilisés sont de la catégorie "pour analyses" ou d'une pureté équivalente :

| <u>Réactif</u> | <u>Fournisseur</u> |
|--|--------------------|
| acide Acétique | Prolabo |
| Acrylamide | BDH chem. |
| N,N'méthylène bisAcrylamide | BDH chem. |
| Agarose | Prolabo |
| acide epsilon Aminocaproïque | Aldrich |
| persulfate d'Ammonium | Merck |
| Bleu de Coomassie G-250 | Merck |
| Bleu de Coomassie R-250 | Merck |
| acide Borique | Merck |
| chlorure de Calcium, 2H ₂ O | Merck |
| Dextran T500 | Pharmacia |
| 1,7-Diaminoheptane | Merck |
| EDTA (Tritiplex III) | Merck |
| Ethanol | Merck |
| 2 Mercaptoethanol | Merck |
| Ethanolamine | Prolabo |
| Glycine | Merck |
| Lactose | Merck |
| citrate de Magnésium, H ₂ O | Merck |
| Orcinol | Merck |
| PEG 6000 | Merck |
| acide Phosphorique, 85% | Merck |
| carbonate de Potassium | Merck |
| chlorure de Potassium | Merck |
| citrate de Potassium, 5 H ₂ O | Merck |
| hydrogénophosphate de Potassium | Prolabo |
| sulfate de Potassium | Merck |
| Présure | Boll |

| | |
|--|---------------------|
| Saccharose | Merck |
| azide de Sodium | Merck |
| borohydrure de Sodium | Merck |
| chlorure de Sodium | Prolabo |
| citrate de Sodium, 5 H ₂ O | Merck |
| cyanoborohydrure de Sodium | Merck |
| Sodium dodecyl sulfate | Merck |
| hydrogénophosphate de di Sodium, 12 H ₂ O | Prolabo |
| dihydrogénophosphate de Sodium, 2 H ₂ O | Prolabo |
| hydroxyde de Sodium | Merck |
| periodate de Sodium | Merck |
| T.E.M.E.D. | Eastman Kodak |
| acide Trichloroacétique | Prolabo |
| Tampon pour néphéléométrie (90 090) | Diagnostics Pasteur |
| Trichlorotrifluoroéthane | Merck |
| Tris-HCl | Merck |
| Triton X-100 | Merck |
| Urée | Prolabo |
| Zinc sulfate | Prolabo |

Les gels utilisées dans les colonnes de chromatographie ont les origines suivantes :

| <u>Gel</u> | <u>Fournisseur</u> |
|--------------------------------------|--------------------|
| Lysine-Sepharose 4B | Pharmacia |
| Sephadex G25 | Pharmacia |
| DEAE Bleu Cibacron F3GA (Econo-Pac®) | BIO-RAD |

Les protéines, sérums et antisérums ont les origines suivantes :

| <u>Produit</u> | <u>Origine</u> |
|--------------------------|-----------------------------------|
| Albumine sérique bovine | Sigma |
| Albumine sérique humaine | Sigma |
| BPg, protéine purifiée | Sigma |
| BPg, antisérum | HUMBERT G.(Laboratoire Biochimie) |
| Caséine totale | COLLARD-BOVY C. |
| Caséine α S | COLLARD-BOVY C. |
| Caséine β | COLLARD-BOVY C. |

| | |
|----------------------------------|-------------------------------|
| Caséine κ | COLLARD-BOVY C. |
| <u>Produit</u> | <u>Origine</u> |
| Caséinomacroglycopeptide | Sigma |
| Chèvre, lait | Ferme Neuves-Maisons (M et M) |
| Chèvre, sérum | Diagnostics Pasteur |
| γ Globulines bovines | Sigma |
| HPg, protéine purifiée | Biopool (Interchim) |
| HPg, antisérum, fraction IgG | Behring |
| HPg, antisérum, fraction IgG | Dako |
| HPg, antisérum | Serotec |
| HPg sérum étalon | Behring |
| IgG bovines, protéines purifiées | Sigma |
| IgG bovines, antisérum | Jackson (Interchim) |
| α Lactalbumine | Sigma |
| β Lactoglobuline | Sigma |
| Vache, lait | Ferme Domgermain (M et M) |

II/ ECHANTILLONS DE LAIT

Ce sont des laits de moyen mélange collectés auprès de 14 producteurs d'une coopérative laitière française, sélectionnés sur la moyenne de leurs teneurs en caséine β des 9 mois précédent l'expérimentation et sur la race dominante du troupeau (annexe 5, tableau 1). Chaque échantillon représente 2 à 4 traites successives. L'étude a été menée du 1^{er} Juillet au 31 Octobre 1993.

III/ PRINCIPAUX APPAREILS

- Ultracentrifugeuse: modèle L, Beckman/Spinco
- Rotor: SW 25, Beckman
- Spectrophotomètre: PU 8600 UV/VIS, Philips
- Electrophorèse: cuve 2001 verticale, LKB
- Chromatographie d'affinité: collecteur de fractions
ISCO 328, absorptiomètre UV et enregistreur ISCO UA-5.
- Néphélémètre: prototype industriel Néphélia[®], Diagnostics Pasteur.
- Membranes de dialyse: Spectra/Por[®], Sartorius.
- Concentration de solutions: tubes Centrisar[®] Sartorius.
- Balances de précision Mettler.
- pH mètre Bioblock.

I/ LA NEPHELEMETRIE

A/ Dispersion de la lumière et néphélémétrie

Toute particule se trouvant en suspension dans un milieu liquide ou un gaz, et soumise à un rayonnement lumineux incident, provoque la dispersion d'une partie de ce rayonnement dans tout l'espace. Le champ électrique, associé à l'onde lumineuse incidente, provoque la vibration des électrons des molécules en suspension, ce qui produit un champ électromagnétique de même fréquence que le rayonnement initial. Cette émission constitue la lumière diffusée.

La néphélémétrie est la mesure de cette lumière dispersée. Il existe plusieurs lois de dispersion de la lumière par les corps en suspension, qui s'appliquent suivant la longueur d'onde de la lumière incidente et la taille de la particule dispersante.

A.1/ Loi de RAYLEIGH

Elle s'applique pour les particules dont la taille est nettement inférieure à la longueur d'onde du rayonnement incident (moins de $\lambda/20$), de forme sphérique et peu concentrées, ce qui est le cas des particules colloïdales. RAYLEIGH, en 1871, définit l'intensité lumineuse d'une source non polarisée, dispersée par ce type de particule par l'équation suivante :

$$I(\theta) = 8 \pi^4 \frac{NR^6}{\lambda^4} \left[\frac{(n^2 - 1)}{(n^2 + 1)} \right]^2 (1 + \cos^2 \theta) E_0$$

$I(\theta)$: Intensité lumineuse dispersée à un angle θ

E_0 : Eclairement incident (W/m^2)

λ : Longueur d'onde de la lumière incidente

R : Rayon de la particule

N : Nombre de particules

n : Indice de réfraction de la particule par rapport au milieu.

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

Si l'on projette dans le plan XZ les composantes horizontales et verticales de la lumière polarisée dispersée par une particule située à l'origine, l'enveloppe a la forme suivante (figure 2.1) :

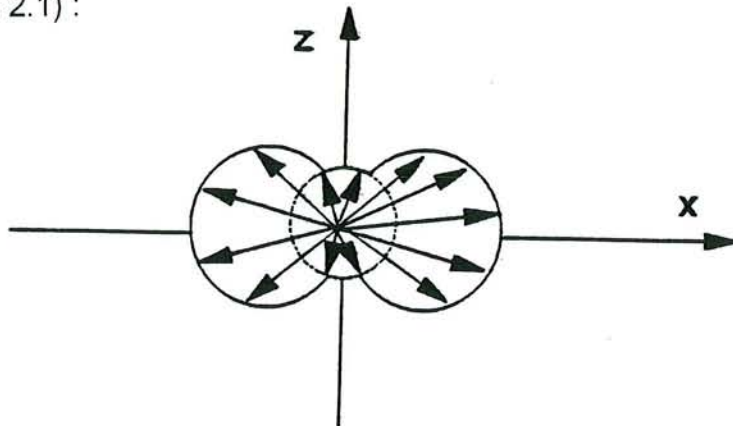


Figure 2.1 : Dispersion de la lumière par une particule sphérique selon la loi de RAYLEIGH (d'après HIEMENZ, 1986)

A.2/ Lois de DEBYE et de MIE

Lorsque les particules ont des dimensions comparables ou supérieures à la longueur d'onde du rayonnement incident, différentes régions de la même particule peuvent se comporter comme des centres autonomes de diffusion de la lumière, ce qui provoquera des interférences entre les rayonnements diffusés. De plus, certaines particules (comme les sels d'or) ont des indices de réfraction très variables.

MIE (1908) et DEBYE (1910) ont établi des modèles pour tenir compte de ces phénomènes. Ils observent que l'intensité lumineuse dispersée, qui est maximale dans le prolongement du rayon incident, décroît rapidement lorsque l'angle augmente. Selon MIE, l'indicatrice de diffusion présente un axe de symétrie avec un maximum vers l'avant, aux petits angles (figure 2.2) :

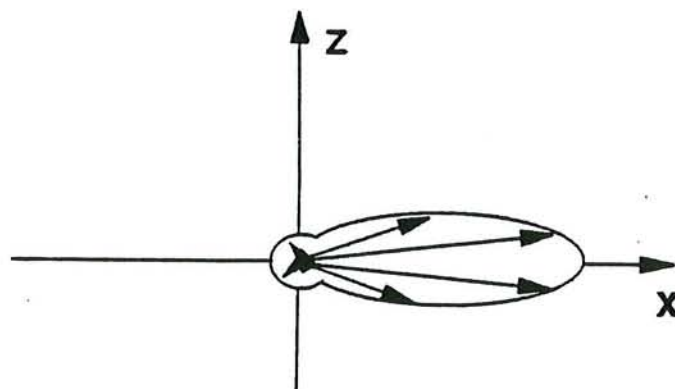


Figure 2.2 : Dispersion de la lumière par une particule sphérique selon la loi de MIE

B/ L'immunonéphélémétrie

B.1/ L'immunonéphélémétrie "classique"

B.1.1/ Principe.

Lorsque les particules diffusantes sont composées de complexes antigène-anticorps en suspension dans un milieu liquide, on parle d'immunonéphélémétrie. Nous l'avons dénommée "classique" par opposition à l'immunonéphélémétrie microparticulaire que nous évoquerons au paragraphe suivant (figure 2.3) :

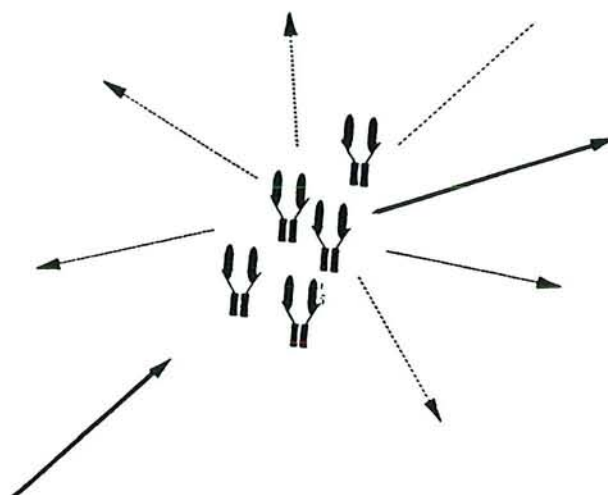


Figure 2.3 : Dispersion de la lumière par des immunocomplexes en milieu liquide

B.1.2/ Avantages et limites de la méthode.

L'immunonéphélémétrie classique (INC) est une des méthodes immunochimiques les plus simples (puisque basée sur la précipitation antigène-anticorps en milieu liquide) et des plus fiables.

Elle présente cependant plusieurs inconvénients :

- Un risque de sous-estimation en excès d'antigène (les courbes de précipitation sont en forme de "cloche").
- Un manque de sensibilité (autour du microgramme par mL), ce qui limite ses applications aux molécules fortement concentrées.
- L'utilisation de milieux biologiques limpides, de façon à ce que aucun trouble n'interfère avec l'immunocomplexe.

- Les antigènes concernés doivent être plurivalents.

B.2/ L'immunonéphélémétrie microparticulaire.

B.2.1/ Principe.

Les particules diffusantes sont composées, en plus du complexe antigène-anticorps, d'une phase microparticulaire agglutinée. Les agrégats ainsi formés amplifient fortement la taille de l'immunocomplexe et provoquent une très forte dispersion du rayonnement incident (figure 2.4) :

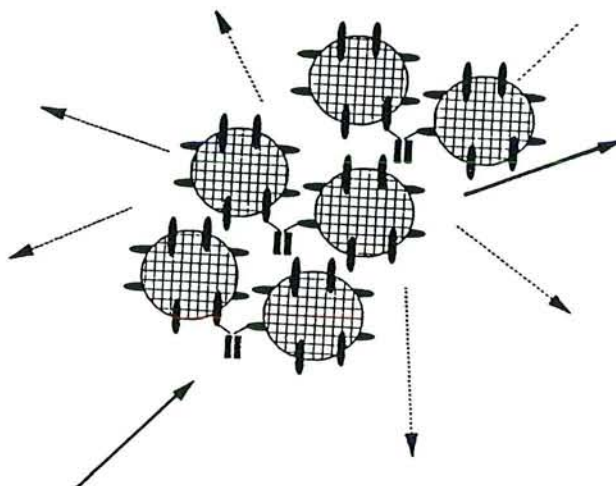


Figure 2.4: Dispersion de la lumière par des agrégats immunocomplexes/microsphères

B.2.2/ Avantages.

L'immunonéphélémétrie microparticulaire (INM) permet d'éliminer les inconvénients qui limitent l'INC:

- Grâce à l'utilisation de microsphères qui augmentent artificiellement le volume de l'agglomérat, le seuil de détection est de l'ordre du nanogramme par mL.
- Cette sensibilité permet de réaliser de hautes dilutions des solutions à tester. Il n'est donc plus nécessaire de traiter les échantillons de certains liquides biologiques troubles (tel le lait).

B.2.3/ Modèles réactionnels.

Selon la nature de la molécule fixée sur le support microparticulaire, deux modèles sont envisagés :

- Si les microparticules sont recouvertes d'un antigène, l'addition des anticorps spécifiques à cet antigène provoque la formation de l'immunocomplexe et l'agglutination des microsphères. La présence dans le milieu de réaction d'un antigène, identique à celui fixé sur les microparticules, inhibe par compétition l'agglutination des microsphères. Cette inhibition se traduit par une diminution du volume et du nombre d'agglutinats, donc de la lumière dispersée par le milieu.

Tout échantillon contenant l'antigène à une concentration inconnue provoquera une inhibition partielle de l'agglutination, qui sera mesurée par référence à une courbe étalon en antigène (figure 2.5) :

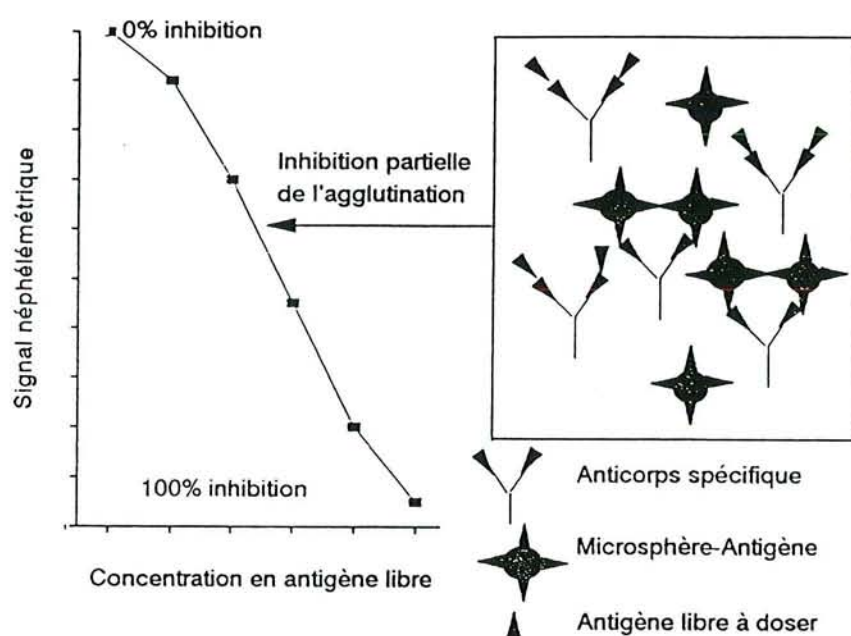


Figure 2.5 : Modèle réactionnel d'inhibition de l'agglutination des microsphères sensibilisées par un antigène

Avec un tel modèle, il n'y a pas de risque de sous-estimation en excès d'antigène, puisqu'à partir d'une certaine concentration, l'antigène inhibe totalement l'agglutination.

- Lorsque les microparticules sont recouvertes d'anticorps, la présence dans le milieu de l'antigène correspondant provoquera l'agglutination de celles-ci (figure 2.6) :

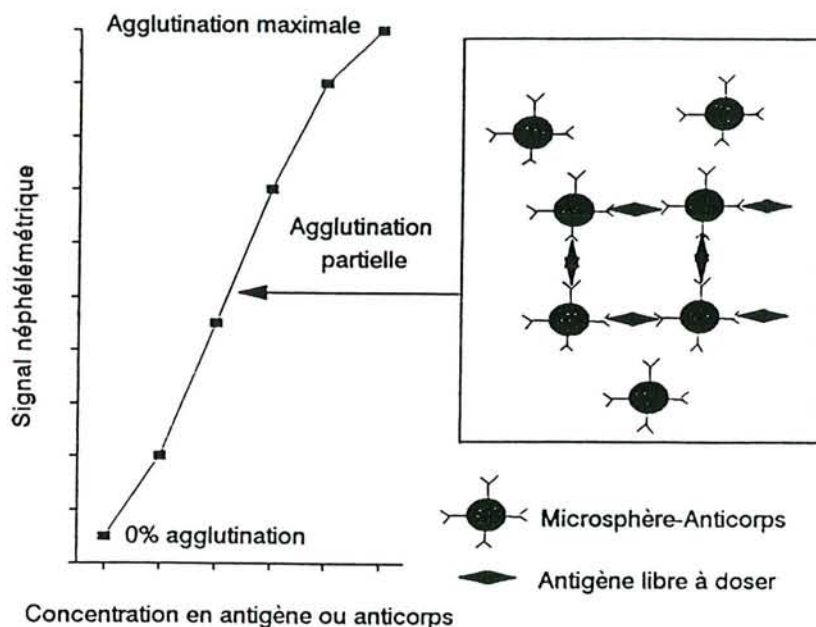


Figure 2.6 : Modèle réactionnel d'agglutination des microsphères sensibilisées par un anticorps

Ce type de modèle dit "d'agglutination directe" présente l'inconvénient de former des courbes en "cloche", de la même façon que pour l'INC, avec le risque de sous-estimation en excès d'antigène.

B.2.4/ Les supports microparticulaires.

Deux types de microsphères (Ms) sont utilisées en INM : des Ms hydrophobes et des Ms hydrophiles.

Les premières équipes de recherche qui travaillèrent sur des supports particulaires employèrent des Ms hydrophobes. C'est le cas de GRANGE et al (1977) et de Von SCHULTHESS et al (1976), qui utilisèrent des Ms de polystyrène. Les supports hydrophobes présentent cependant certains inconvénients dont une cinétique lente (15 à 45 heures) et des phénomènes d'auto-agglutinations spontanées.

C'est pourquoi d'autres équipes s'attachèrent à utiliser des Ms hydrophiles. Parmi elles, l'équipe du Pr DUHEILLE, du laboratoire d'Immunologie de la Faculté de Médecine de Nancy, qui développa, dès 1981, ses propres supports polyacryliques pour la néphélométrie (DUHEILLE et al, 1982). Ces Ms, provenant d'une polymérisation de monomères acryliques en émulsion, présentent de nombreux avantages:

- Une absence d'agglutinations spontanées et une limitation des adsorptions aspécifiques.
- Une sédimentation lente.
- Un couplage covalent simple des antigènes ou des anticorps, d'où une absence de relargage de ceux-ci.

Depuis, de nombreux dosages par INM ont été mis au point par l'équipe du Pr DUHEILLE, tant en clinique humaine (MONTAGNE et al, 1992a et 1992c) que dans le domaine agro-alimentaire (COLLARD-BOVY et al, 1991; MARCHAL et al, 1991).

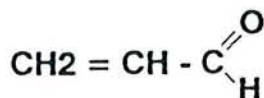
C/ Fabrication des réactifs d'INM

C.1/ Synthèse des MS polyacryliques hydrophiles

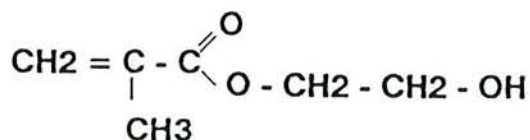
C.1.1/ Monomères utilisés

Ils sont au nombre de 4 :

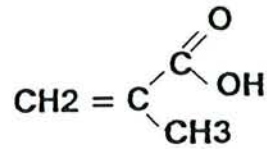
- L'acroléine, qui apporte les groupements aldéhydiques qui seront utilisés pour le couplage covalent des molécules biologiques :



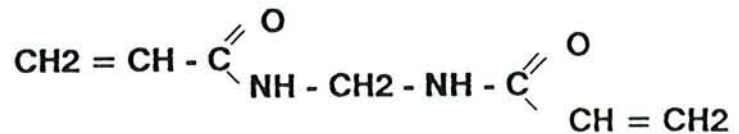
- Le 2-hydroxy éthyl méthacrylate (HEMA), qui apporte des fonctions hydroxyles, assurant l'hydrophilie des Ms :



- L'acide méthacrylique (MA), qui, par sa fonction acide, permet la régulation de la charge électrique des Ms :



- Le NN' méthylène bisacrylamide, agent réticulant, qui réalise des pontages entre les chaînes linéaires des polymères en formation :



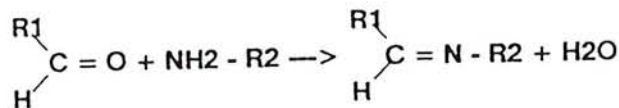
C.1.2/ Polymérisation

La polymérisation est induite par une irradiation au ^{60}Co . Les polymères obtenus sont de taille homogène. La taille, qui peut varier de quelques dizaines à quelques centaines de nanomètres, dépend beaucoup de la concentration en tensio-actif et de la concentration totale en monomère. Les quantités de chaque monomère sont choisies de façon à obtenir des microsphères répondant aux qualités attendues (MARCHAND et al, 1992).

La conservation des polymères se fait à $+4^\circ\text{C}$, en solution aqueuse d'hydroquinone, afin d'éviter une oxydation des fonctions aldéhydes libres.

C.2/ Protocole général de couplage d'un antigène sur les Ms.

Le couplage se fait entre les fonctions aldéhydes des résidus acroléine des microparticules et les fonctions amines primaires des molécules à coupler :



Les molécules possédant naturellement des amines primaires libres, comme les protéines, sont directement couplables aux Ms. D'autres doivent subir des modifications chimiques de façon à apporter l'amine manquante à la molécule.

Les fonctions carboxyles (des résidus MA) et hydroxyles (des résidus HEMA) restent intactes, préservant ainsi l'hydrophilie et la charge de la Ms couplée.

Nous ne ferons ici état que du principe général du couplage, qui comporte trois étapes, car chaque molécule est couplée suivant un protocole qui lui est adapté.

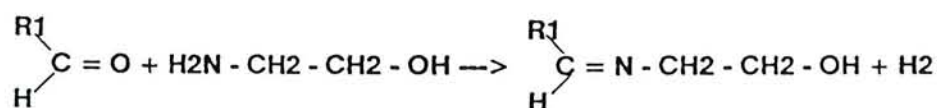
C.2.1/ Première étape : couplage des antigènes

Les Ms natives sont dialysées contre le tampon de couplage (1 mL de Ms pour 1 litre de tampon, dégazé et saturé en Argon), trois fois de suite pendant 4 heures, à +4°C.

Puis les molécules à coupler sont incubées directement avec la suspension de Ms, 2 heures à température ambiante et 18 heures à +4°C. Les concentrations optimales sont de 10 mg de Ms pour $2 \cdot 10^{-8}$ moles de ligand (MONTAGNE, 1992b.).

C.2.2/ Deuxième étape : saturation des aldéhydes libres

Les fonctions aldéhydes des Ms qui n'ont pas réagi avec le ligand sont saturées par une solution d'éthanolamine tamponnée au pH du couplage :



L'éthanolamine apporte en plus une fonction hydroxyle, ce qui renforce l'hydrophilie des Ms.

C.2.3/ Troisième étape: séparation des Ms sensibilisées

Elle consiste en la séparation des Ms sensibilisées et des produits non couplés. Elle est réalisée par centrifugation sur un gradient discontinu de saccharose (20%-80%), pendant 60 minutes à 15000 g.

Elle est complétée par 3 dialyses de 12 heures contre un tampon de conservation, afin d'éliminer le saccharose présent.

Les Ms couplées se conservent plusieurs mois à +4°C ou congelés à -20°C, sans qu'il n'y ait d'auto-agglutination ou de relargage des molécules liées.

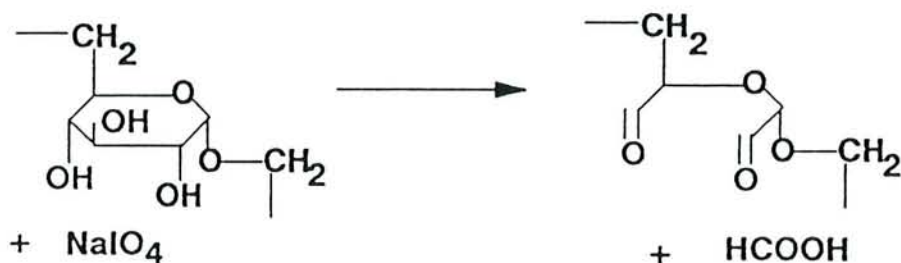
C.3/ Protocole général de couplage d'un anticorps

Le couplage d' Immunoglobulines (Ig) sur les Ms n'est pas possible par la technique décrite ci-dessus, en raison notamment d'un manque de stabilité des réactifs en solution. C'est pourquoi ce type de couplage fait intervenir un "bras espaceur" sur lequel les Ig seront couplées préférentiellement par l'intermédiaire de leurs amines libres du fragment Fc, de façon à laisser au maximum le fragment Fab intact.

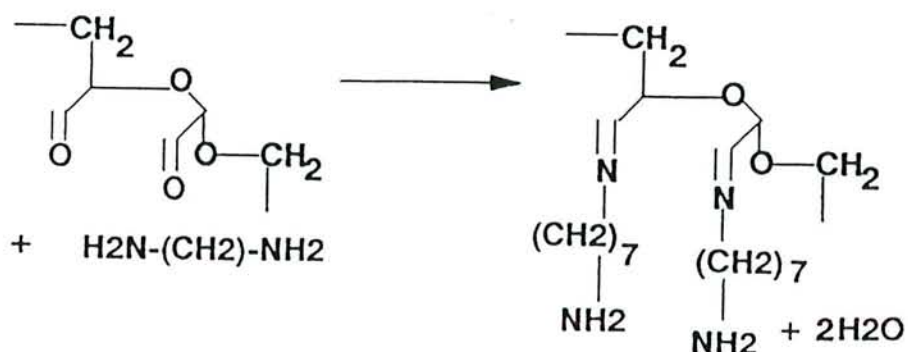
Ce type de couplage a été mis au point par MONTAGNE et al (1992c) en utilisant du dextran T500 (PM 500 000) comme espaceur.

C.3.1/ Première étape : obtention de l'aminodextran

Il s'agit en premier de préparer de l'aminodextran à partir de dextran T500, par oxydation en aldéhydes d'une partie des fonctions alcools du dextran. L'acide périodique est utilisé pour cette oxydation suivant la réaction de Malaprade (10 moles de NaIO₄ pour 1 mole de dextran, 1 heure à température ambiante) :

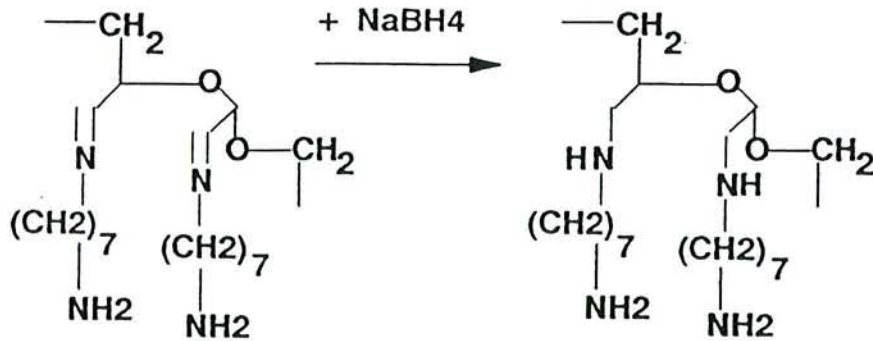


Il s'agit ensuite de greffer des fonctions amines libres sur le dextran, ce qui est réalisé avec du 1-7 diamino heptane en excès, dont l'une des fonctions amines réagit avec l'aldéhyde résultant de l'oxydation et dont l'autre reste libre :



Cette opération se fait sous agitation rotative lente, pendant 18 heures à température ambiante.

Puis l'addition de borohydrure de sodium pendant 30 minutes, à 0°C et sous agitation magnétique, permet une réduction des liaisons imines :



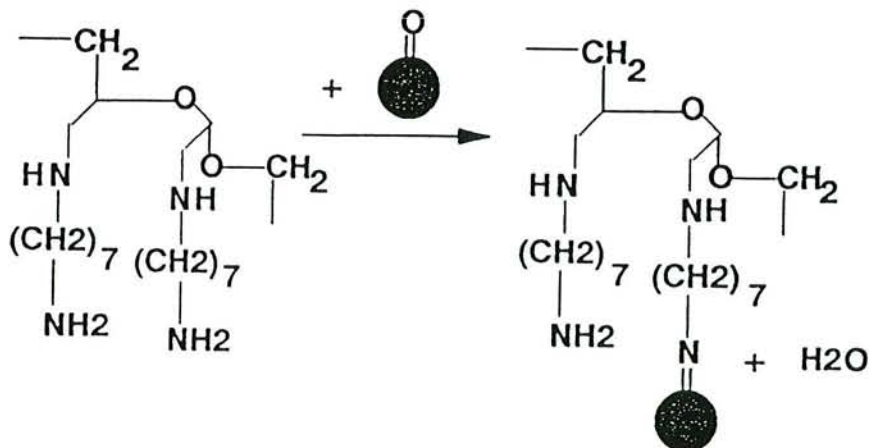
L'aminodextran ainsi préparé est soumis à 3 dialyses de 2 heures contre du tampon phosphate de sodium 0.06M pH 7.2.

La concentration du dextran activé est alors déterminée par de l'orcinoïde (Matériel et Méthodes).

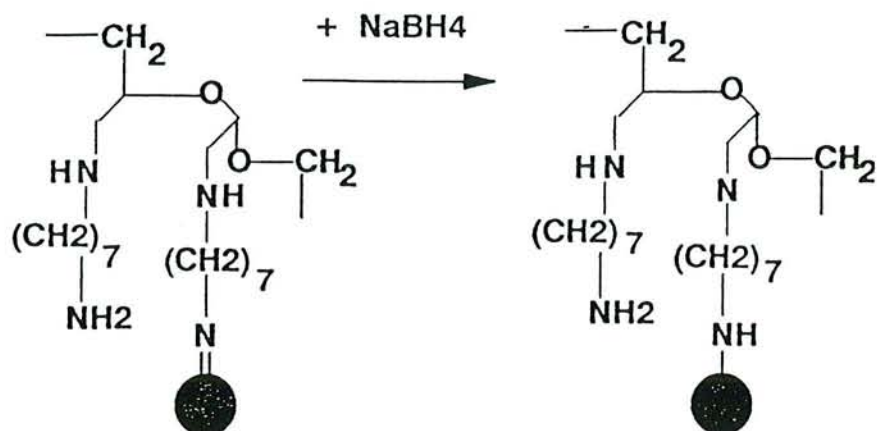
L'aminodextran peut être conservé ainsi plusieurs mois congelé à -20°C.

C.3.2/ Deuxième étape: couplage aux Ms

Le dextran est fixé par ses amines libres aux aldéhydes des Ms (dans des conditions identiques à celles décrites pour le couplage d'antigènes) :



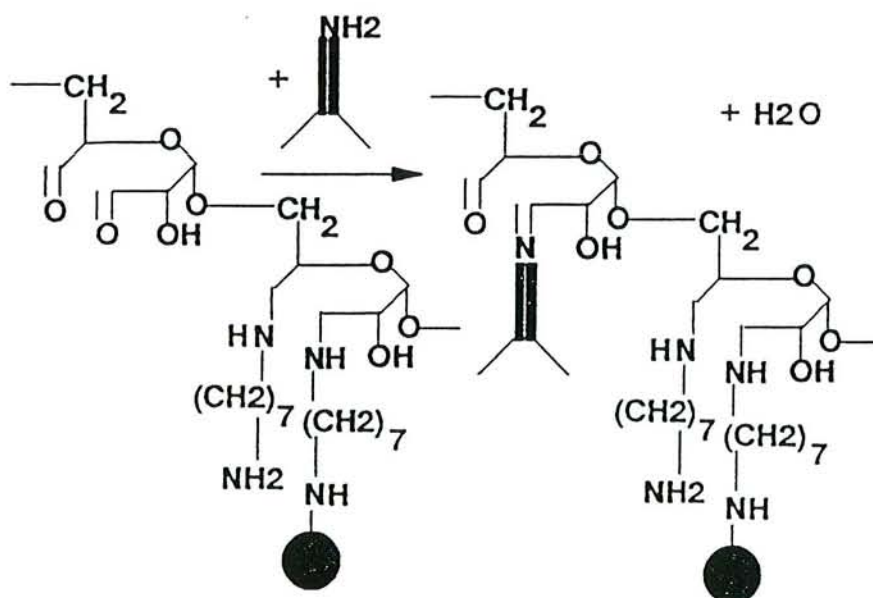
Les liaisons imines formées sont réduites par du borohydrure de sodium, une nuit à température ambiante, de façon à éviter des relargages du dextran :



C.3.3/ Troisième étape: couplage de l'anticorps

Le dextran couplé aux Ms (MsDx) est à nouveau oxydé par de l'acide périodique (2 heures, température ambiante) de façon à obtenir de nouvelles fonctions aldéhydes sur les cycles glycosidiques :

Après 12 heures de dialyse contre du tampon borate 0.1M pH9.0 NaCl 0.3M, les MsDx sont mises en contact avec les anticorps 12 heures à $+4^\circ\text{C}$. La fixation des amines des anticorps avec les aldéhydes des MsDx modifiées se fait suivant le protocole général déjà décrit pour les antigènes :



Les fonctions restées libres seront saturées par de l'albumine sérique humaine (ASH), 18 heures à +4°C et de l'éthanolamine pH 9.2 heures à température ambiante.

La séparation des Ms sensibilisées (MsDxAC) des produits non couplés est identique au protocole des antigènes, à savoir qu'elle fera intervenir un gradient discontinu de saccharose (20%-80%).

Les MsDxAC sont dialysées contre du tampon borate 0.01M pH 8.5 et conservées à +4°C.

D/ Appareillage

Le néphélémètre utilisé est un prototype industriel, Nephelia® (Diagnostics Pasteur), dont le principe est le suivant (figure 2.7) :

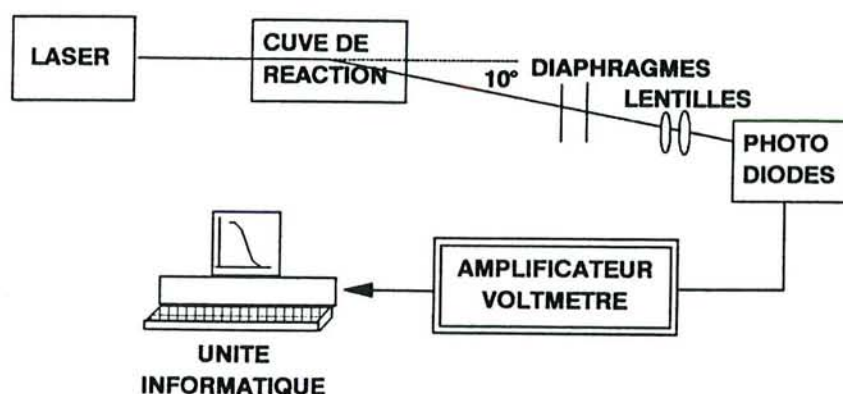


Figure 2.7: Schéma de principe du néphélémètre laser NEPHELIA®

La source lumineuse est un laser Hélium-Néon de longueur d'onde 632.8 nm, émettant une lumière rouge parfaitement monochromatique.

L'échantillon est placé dans une cuve de mesure en plastique, à usage unique (Nephelia®, Diagnostics Pasteur).

La lumière diffusée par les particules à doser est captée par un photodétecteur situé à un angle d'observation de 10° par rapport à l'axe du rayonnement incident. Celui-ci transforme l'énergie lumineuse en tension électrique (mV).

Le prototype industriel, muni d'un passeur d'échantillons, est relié à un micro-ordinateur chargé de l'exploitation des résultats. Le modèle mathématique utilisé pour

traiter les courbes d'étalonnage effectuée un lissage des points expérimentaux selon le critère des moindres carrés par une interpolation de type spline (BAUD, 1988).

II/ IMMUNSERUMS

A/ Antisérums anti plasminogène humain

Les antisérums utilisés sont des réactifs du commerce. L'As couplé sur les Ms est de marque Dako (réf. A081, lot 109). Il correspond à des fractions d'Ig purifiées à partir d'As de lapin. Le fabricant précise que toute trace d'Ac contaminant a été enlevée par absorption sur phase solide avec des protéines du plasma humain et que la spécificité de l'As a été évaluée par immunoélectrophorèse, où seul le plasminogène humain provoque un arc de précipitation. L'As qui révèle l'immunocapture est un As entier (réf. OSCB), de marque Behring, traité pour que soient éliminées les lipoprotéines.

B/ Antisérum anti plasminogène bovin

L'antisérum a été fourni par G. HUMBERT (1986). Il est obtenu par injection par voie sous-cutanée au jour J0, à 3 lapins Fauve de Bourgogne, de 5,5 mg de plasminogène dans 0,75 mL de NaCl 0.9% additionnés du même volume d'Adjuvant complet de FREUND. Quatre rappels successifs sont effectués par voie intra-veineuse (2,5 mg/mL/lapin) aux jours J0 + 24, 31, 48 et 59. A J0 + 65, la récupération d'environ 65 mL de sang est faite par section de la veine marginale de l'oreille. Les sérums sont récupérés par centrifugation au froid à 2 000g pendant 30 minutes.

Les différents prélèvements sont testés en néphélométrie par agglutination avec des Ms sensibilisées par du plasminogène bovin. Le plus réactif est utilisé pour ce travail.

III/ METHODES DE PURIFICATION ET DE DOSAGE

A/ Méthodes de purification

A.1/ Purification du plasminogène bovin par chromatographie d'affinité

A.1.1/ Principe

Le plasminogène bovin est purifié à partir de plasma citraté, provenant de sang bovin prélevé aux abattoirs de Metz après tranchage du cou de l'animal. Le sang est mélangé à une solution de citrate de sodium 0.13M (9v/v) pour éviter sa coagulation, puis le plasma est récupéré après deux centrifugations (4000 g pendant 30 minutes) et congelé en attente d'un cycle de purification.

La purification est obtenue en une étape par chromatographie d'affinité sur Lysine-Sepharose 4B (LS4B) selon la méthode de DEUTSCH et MERTZ (1970), modifiée par HUMBERT et al (1990).

A.1.2/ Protocole

Toutes les manipulations se font en chambre froide (+5°C) et en présence de sulfate de zinc 0.001M, de façon à minimiser l'activation en plasmine.

La colonne de LS4B est équilibrée en tampon A: Tris-HCl 0.05M, ZnSO₄ 0.001M, NaN₃ 0.02% et pH 8. L'azide de sodium préserve des contaminations microbiennes et le pH correspond à la zone de forte stabilité de l'enzyme.

Le plasma, après avoir été filtré sur du coton de verre pour éliminer la plupart des graisses, est déposé sur la colonne. Il est élué à raison d'un débit de 75 ml/heure. Seul le BPG est retenu sur la colonne de façon spécifique par ses sites d'affinité lysine (figure 2.8) :

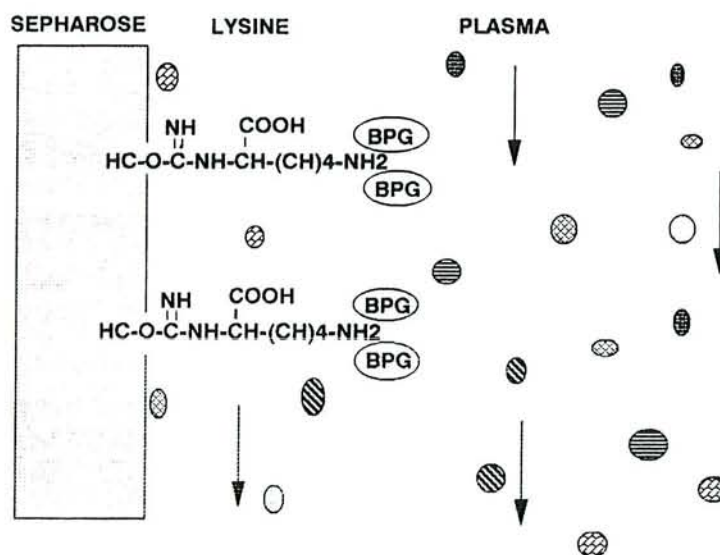


Figure 2.8: Affinité du plasminogène bovin sérique pour les résidus lysine d'une colonne de LS4B

Les protéines retenues de façon non spécifique sont éluées par du tampon B : tampon A + NaCl 0.5M.

Le BPg est élué de la colonne par un tampon C: tampon A + acide ϵ aminocaproïque (ϵ AAC) 0.2M. L' ϵ AAC décroche le BPg par compétition avec les lysines de la colonne LS4B (figure 2.9) :

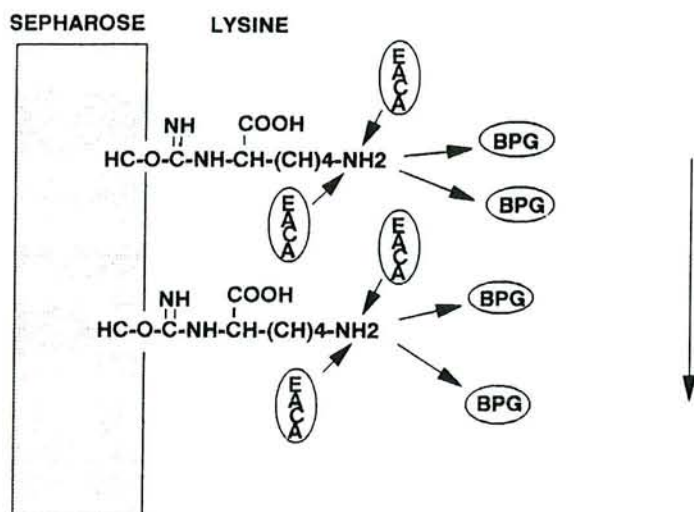


Figure 2.9: Elution du plasminogène bovin sérique d'une colonne de LS4B

Enfin, le fibrinogène, qui contamine la colonne, est éliminé par un tampon D : tampon A + urée 6M, afin de rendre au support toutes ses propriétés d'affinité.

La fraction BPg est ensuite déposée sur une colonne Sephadex G25 (chromaflex 1000 x 50 mm), de façon à la débarasser des sels et de l' ϵ AAC résiduel. Le tampon de filtration est constitué de Tris-HCl 0.01M, NaN₃ 0.02%, pH 8.0.

A.2/ Purification des IgG d'un sérum

A.2.1/ Principe

Les IgG d'un antiserum de lapin anti plasminogène humain sont purifiées sur colonne Econo-Pac® (BIO-RAD). La colonne est constituée d'un gel d'affinité bifonctionnelle contenant des groupements diéthylaminoéthyle (DEAE) et un colorant, le bleu Cibacron F3GA, lié de façon covalente à des billes d'agarose. Le gel purifie en une seule étape des IgG d'un sérum. Le colorant se lie à l'albumine, aux protéases et à diverses protéines, alors que le DEAE lie les protéines restantes. De par la force ionique du tampon initial, les IgG sont éluées directement, sans être retenues sur la

colonne. Seules de petites quantités de transferrine peuvent contaminer la fraction recueillie.

A.2.2/ Protocole

L'échantillon est dessalé sur la colonne de dessalage Econo-Pac[®], à raison de 3 mL de sérum par colonne. Le tampon éluant, spécifique des sérums de lapin, est fourni avec le kit BIO-RAD.

L'échantillon est ensuite appliqué sur la colonne de purification (3,8 mL par colonne). L'élution se fait par le même tampon et l'absorbance des fractions recueillies est déterminée à 280 nm. Les fractions présentant une absorbance significativement supérieure à celle du tampon sont mélangées.

Le volume d'IgG ainsi obtenu est concentré par centrifugation sur Centriscart[®], 15 minutes à 3000 g. La solution est ensuite aliquotée par volumes de 0,5 ml et congelée.

B/ Méthodes d'identification et de dosage

B.1/ Méthode électrophorétique

B.1.1/ Principe

La pureté du plasminogène obtenu par chromatographie d'affinité est déterminée par électrophorèse en gel vertical de polyacrylamide en milieu dissociant, adaptée de la technique de LAEMMLI et FAVRE (1973). En présence de Sodium Dodécyl Sulfate (SDS), qui dénature la protéine et uniformise sa charge électrique, les molécules ne migrent qu'en fonction de leur masse moléculaire (BOREL, 1987). De plus, l'addition de 2-mercaptoéthanol, qui rompt les ponts dissulfures, provoque un dépliement de la molécule.

B.1.2/ Protocole

La technique fait appel à un système de tampons discontinus, de composition et de pH différents :

- Le gel de séparation (T=15%, C=2.6%) est en tampon Tris-HCl 0.4 M/L pH 8.9.

- Le gel de concentration (T=3.9%, C=2.6%) est en tampon Tris-HCl 0.125 M/L pH 6.8.
- Le tampon d'électrode (pH 8) est un mélange:
 - Tris-HCl 0.045 M/L
 - Glycine 0.365 M/L
 - SDS 0.1%

Après migration, le gel est fixé 1 heure dans de l'acide trichloracétique (TCA) à 12% , coloré 3 heures dans une solution à 0.01% de bleu de Coomassie R250 dans le mélange méthanol/eau/TCA (1/1/2%) puis décoloré dans le mélange méthanol/eau/acide acétique (3/6.25/0.75).

B.1.3/ Electrophorèse du plasminogène purifié

L'électrophorèse suivante confirme la pureté du plasminogène obtenu à partir de plasma bovin. Les bandes observées correspondent aux différents variants du BPg. On n'observe pas d'activation en plasmine (figure 2.10) :

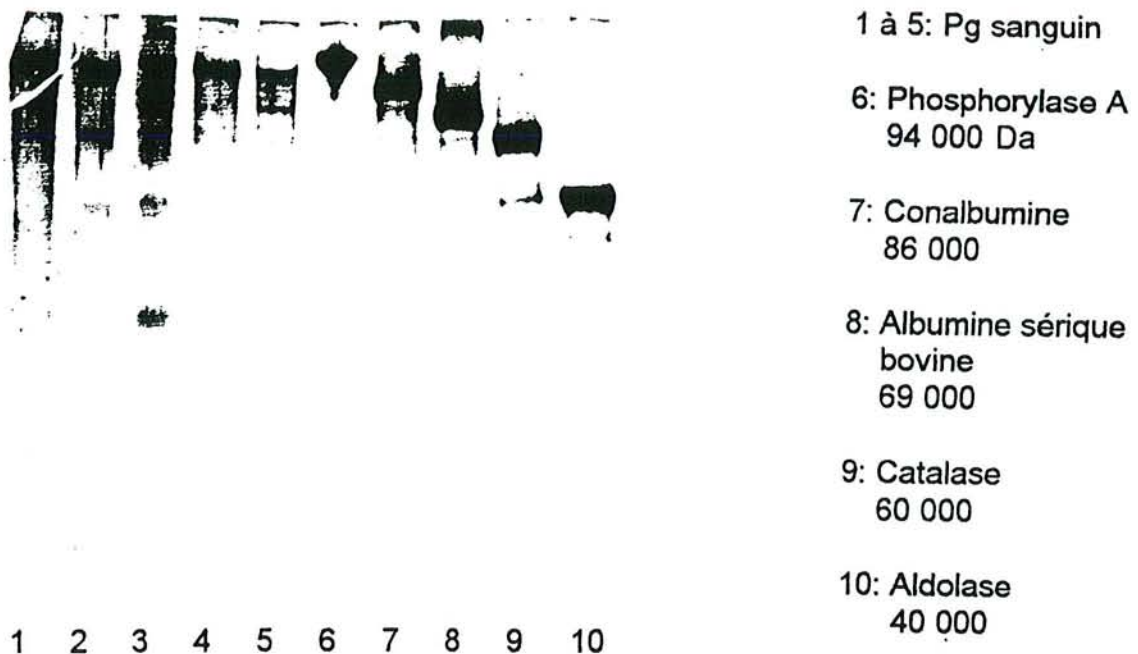


Figure 2.10 : Electrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS d'une solution purifiée de BPg

B.2/ Dosage de solutions de protéines purifiées

La méthode de BRADFORD (1976) est utilisée pour déterminer la concentration de la solution de BPg purifié et de la solution d'IgG provenant de l'antisérum anti plasminogène.

B.2.1/ Principe

Cette méthode a une sensibilité de l'ordre de $0.5\mu\text{g/mL}$, supérieure à celles d'autres méthodes classiques (Biuret, Lowry); elle permet donc de consommer moins d'échantillon. De plus, il n'y a aucune interférence avec les cations, l'EDTA ou le Tris-Hcl par exemple.

Son principe repose sur l'affinité d'un colorant, le bleu de Coomassie G-250, pour les protéines. La liaison de ce colorant aux protéines provoque un décalage de sa longueur d'onde d'absorption maximale de 465 à 595 nm, car le bleu de Coomassie G-250 passe de la couleur rouge, lorsqu'il est libre en solution, à la couleur bleue lorsqu'il se trouve lié. Le complexe formé a un fort coefficient d'extinction, ce qui permet d'atteindre une sensibilité importante dans le dosage. De plus, les lectures peuvent être effectuées au bout de 2 minutes et la coloration reste stable pendant 1 heure.

B.2.2/ Protocole

L'étalon est une solution d'albumine sérique bovine (1 mg/mL) pour le dosage du BPg et d'IgG bovines (3.6 mg/mL) pour le dosage des IgG anti BPg. Cinq dilutions sont effectuées, de façon à couvrir une gamme de 200 à $12.5\mu\text{g/mL}$. Les échantillons de concentration inconnue sont dilués au 1/10 et 1/20.

Solution de bleu de Coomassie :

| | |
|---------------------------------|-------------|
| - Bleu de Coomassie G-250: | 100 mg |
| - Ethanol 95%: | 50 mL |
| - Acide phosphorique 85% (p/v): | 100 mL |
| - Eau distillée | qsp 1000 mL |

Le protocole est le suivant :

| | |
|---------------------------------|--------------|
| Echantillon ou étalon : | 20 μ L |
| NaOH : | 50 μ L |
| Solution de bleu de Coomassie : | 1000 μ L |

--> Incubation 5 minutes à température ambiante

--> Lecture sur spectromètre à 590 nm contre un témoin
Coomassie/NaOH.

B.3/ Dosage du Dextran T500 par la méthode à l'orcinol chlorhydrique

B.3.1/ Principe

Le dextran, qui est un polymère de pentose, donne une coloration violet-bleu lorsqu'il est chauffé en présence d'orcinol et d'acide chlorhydrique concentré (réaction de Bial). Dans cette réaction, du furfural se forme aux dépens de la molécule pentosique et se condense avec l'orcinol pour donner le composé coloré.

B.3.2/ Protocole

- La gamme d'étalonnage est préparée avec une solution mère de Dextran T500 à 20 mg/mL en H₂O distillée :

| | | | | | | | |
|-----------------|---------------|--------|------|------|------|------|-------|
| Dilutions: | 1/10 | 1/12.5 | 1/20 | 1/25 | 1/40 | 1/80 | 1/200 |
| Concentrations: | 2000 | 1600 | 1000 | 800 | 500 | 250 | 100 |
| | (μ g/mL) | | | | | | |

- Préparer extemporanément la solution d'orcinol :

| | |
|--|-------------|
| HCL 12N: | 100 Volumes |
| Orcinol à 10% en Ethanol 95%: | 10 Volumes |
| FeCl ₃ à 10% en H ₂ O distillée: | 1 volume |

Le protocole est le suivant :

- Echantillon ou gamme étalon: 50 μ L
- HCl 12N 500 μ L
- > 5 min au bain marie bouillant.
Laisser refroidir 5 min.

- Solution d'orcinol 750 μ L
- > 90 min au bain marie à 60°C
Laisser refroidir 5 min.
- > Lire à 670 nm contre un témoin orcinol.

B.4/ Dosages par Immunonéphélémétrie Microparticulaire

B.4.1/ Caséines

B.4.1.1/ Principe

Le principe a été développé dans le chapitre sur les méthodes néphélométriques et nous ne l'exposerons pas de nouveau.

Les échantillons de caséines, qu'ils soient en milieu synthétique ou en milieu lait, sont dilués de façon à correspondre aux concentrations de la partie linéaire de la courbe d'étalonnage, soit: 375 ng/mL pour la caséine α S, 235 ng/mL pour la caséine β et 90 ng/mL pour la caséine κ .

Les échantillons de laits frais sont soumis à une thermisation à 40°C pendant 60 minutes puis homogénéisés de façon à résoudre les matières grasses.

B.4.1.2/ Protocole

Le tampon de réaction est le tampon borate 0.05 M pH 8 (annexe 1).

Les caséines ont été purifiées selon la technique de MERCIER et al (1968). L'étalon utilisé est une poudre de lait "low heat", étalonnée par INM (COLLARD-BOVY et al, 1991).

Les protocoles de couplage ont été décrits par COLLARD-BOVY et al (1991) et EI BARI et al (1991).

Le protocole de mise en réaction est résumé, pour les trois caséines, dans le tableau 2.1 :

Tableau 2.1: Protocole de dosage par INM des caséines α S, β et κ

| | <u>CASEINE αS</u> | <u>CASEINE β</u> | <u>CASEINE κ</u> |
|-----------------------------|--|--|--|
| <u>Antisérums</u> | | | |
| <u>anti-CN</u> | | | |
| Origine | Lapin | Lapin | Lapin |
| Prédilution | 1/42 | 1/20 | 1/45 |
| Dilution finale | 1/630 | 1/240 | 1/675 |
| <u>MS-CN</u> | | | |
| Lot | 16000 | 16000 | 16000 |
| Dilution finale | 1/40 | 1/40 | 1/40 |
| (c) finale | 0.3 mg/mL | 0.3 mg/mL | 0.3 mg/mL |
| <u>Echantillons</u> | | | |
| Pré-dilution | 1/3500 (laits frais) | 1/3500 (laits frais) | 1/3500 (laits frais) |
| Dilution finale | 1/35000(laits frais) | 1/35000(laits frais) | 1/35000(laits frais) |
| <u>Etalon</u> | | | |
| (c) départ g/L | 11.98 | 7.50 | 2.88 |
| Dilutions | 6 dilutions, 1 ^{ère} au 1/800, raison 2 | 6 dilutions, 1 ^{ère} au 1/800, raison 2 | 6 dilutions, 1 ^{ère} au 1/800, raison 2 |
| <u>Etape I</u> | | | |
| Etalon ou | | | |
| Echantillon(μ L) | 30 | 30 | 30 |
| Tampon (μ L) | 120 | 120 | 120 |
| <u>Etape II</u> | | | |
| MS (μ L) | 25 | 25 | 25 |
| AS (μ L) | 20 | 25 | 20 |
| Tampon (μ L) | 105 | 100 | 105 |
| <u>Lecture (min)</u> | 60 | 60 | 60 |

Toutes les pré-dilutions, ainsi que les mises en réaction, ont été effectuées sur le module III du néphélémètre laser Behring (BLN).

B.4.2/ Immunoglobulines G bovines

B.4.2.1/ Principe

Le principe est identique au principe général de couplage d'antigènes aux Ms (cf. le chapitre "La Néphélémétrie"), mais les IgG bovines (IgGb) ne sont pas couplées seules sur les microparticules. De l'albumine sérique humaine est co-couplée de façon à stabiliser l'ensemble en rétablissant une charge et une hydrophilie suffisantes (cf. annexe 2).

B.4.2.2/ Protocole

Le tampon de réaction est le borate 0.05 M pH 8 (annexe 1).

Le protocole de dosage est décrit dans le tableau 2.2 :

Tableau 2.2: Protocole de dosage par INM des Immunoglobulines G

| | <u>As anti IgGb</u> (2.5 mg/mL) | <u>MslgGb</u> (10 mg/mL) | <u>Agent Inhibant</u> (GGB 14 mg/mL) | <u>Tampon</u> Réact° |
|----------------------|------------------------------------|-----------------------------|---|-------------------------|
| <u>Prédilution</u> | 1/500 | 1/10 | 1/500 à 1/64000 | |
| <u>Etape I (µL)</u> | 30 | 30 | 140 | |
| Incubation | -----> | | 30 minutes | |
| <u>Etape II (µL)</u> | 30 | | | 70 |
| (c) finale | 500 ng/mL | 100 µg/mL | 2800 à 22 ng/mL | |
| <u>Lecture</u> | -----> | | 60 minutes | |

B.5/ Dosage du plasminogène humain par Immunonéphélémétrie Classique

B.5.1/ Principe

Le principe de l'immunonéphélémétrie "classique", qui utilise l'immunocomplexe antigène-anticorps comme particule diffusante, a été exposé dans le chapitre sur la néphélémétrie. Le kit de dosage (facteurs de la coagulation) utilisé dans le cadre de cette thèse est commercialisé par la société Behring.

B.5.2/ Protocole

Le protocole se compose d'une étape de pré-dilution des réactifs et d'une étape de mise en réaction:

Prédilutions (Module III du BLN)

| | |
|---------------------------|--------------|
| Echantillons: | 1/10 |
| Sérum étalon (code OUID): | 1/2.5 à 1/80 |
| Antisérums (code OSCB): | aucune |

Mise en réaction (module III du BLN)

| | |
|---|-----|
| Echantillons ou Sérum étalon (μL): | 100 |
| Antisérums (μL): | 40 |
| Diluant (sérum physiologique, μL): | 160 |

La lecture se fait de façon automatique sur le module I, soit après passage sur le module II du BLN, soit après 30 minutes d'incubation.

Les résultats, exprimés en volts, sont ensuite traités par un appareillage informatique qui calcule les concentrations des échantillons par rapport à la courbe obtenue pour les dilutions de l'étalon.

C/ Méthodes statistiques

C.1/ Fidélité des dosages

Toute méthode d'analyse -expérimentale ou de routine- doit respecter des normes statistiques dont l'une des plus importantes est la fidélité. Celle-ci est définie par deux critères :

- La répétabilité, qui est définie comme l'étroitesse de l'accord entre les résultats successifs obtenus avec la même méthode sur une matière identique soumise à l'essai dans les mêmes conditions (norme ISO/DIS 3534, citée par GRAPPIN, 1986).

- La reproductibilité, qui est l'étroitesse de l'accord entre les résultats individuels obtenus avec la même méthode sur une matière identique soumise à l'essai dans des conditions différentes (norme ISO/DIS 3534, citée par GRAPPIN, 1986).

Répétabilité et reproductibilité sont calculées par des méthodes statistiques classiques: moyennes, variances, écarts-types (GRAPPIN, 1986).

C.2/ Exactitude des méthodes

L'exactitude est évaluée par des études de surcharge et de corrélation, associées à des calculs statistiques (SAPORTA, 1990) tels que :

- Le coefficient de corrélation (r), qui est l'indice permettant d'évaluer le lien entre des concentrations théoriques et des concentrations réelles ou entre deux méthodes de dosage :

$$r = \frac{\Sigma(x_i - X)(y_i - Y)}{\sqrt{\Sigma(x_i - X)^2 \Sigma(y_i - Y)^2}}$$

X = somme des x_i
Y = somme des y_i
 Σ = somme des valeurs, pour x ou y allant de 1 à n

- La droite de régression linéaire, qui est la droite la plus probable, passant par n points de coordonnées (x,y), dont l'équation est $Y = aX + b$, avec :

$$a = \frac{n \cdot \sum x_i y_i - n \cdot \sum x_i \cdot \sum y_i}{n \cdot \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2} \quad \text{et } b = Y - aX ,$$

$\sum x_i$ = somme des x_i

$\sum y_i$ = somme des y_i

$\sum x_i y_i$ = somme des $x_i \cdot y_i$

$\sum x_i^2$ = somme des x_i au carré

$\sum y_i^2$ = somme des y_i au carré

TROISIEME PARTIE

RESULTATS

CHAPITRE 1

DOSAGE DU PLASMINOGENE HUMAIN SERIQUE PAR IMMUNONEPHELEMETRIE MICROPARTICULAIRE

CHAPITRE 1 : DOSAGE DE L'HPg SERIQUE PAR IMMUNONEPHELEMETRIE MICROPARTICULAIRE

A/ Mise au point du dosage

Nous nous proposons de mettre au point le dosage sérique de l'enzyme du système fibrinolytique humain. Pour cela, nous utiliserons des réactifs disponibles dans le commerce : les antisérums proviennent de différents fabricants dont les assurances de qualité donnent satisfaction; l'étalon est un pool calibré du commerce.

Le protocole général sur lequel nous allons nous appuyer correspond à une immunocapture du plasminogène des échantillons par des anticorps dirigés contre lui et couplés aux Ms. Cette capture est révélée par l'addition d'un antisérum anti plasminogène dans une réaction de type "sandwich".

Le protocole comporte une étape de dilution des réactifs et deux étapes de mise en réaction :

- Etape 0 : Prédilution des MsDxAcHPg, de l'As et de l'étalon ou de l'échantillon (diluteur automatique du module III du néphélémètre LN Behring)
- Etape I : 30 μ L MsDxAcHPg + 30 μ L HPg (module III du BLN) + 140 μ L diluant
- Incubation (conditions et durée à déterminer)
- Etape II : on ajoute aux réactifs précédents 30 μ L d'As amplifiant et 70 μ L de diluant (module III du BLN).
- Lecture Néphélémètre prototype NEPHELIA® N 600

A.1/ Couplage des AcHPg sur les MsDx

Ce couplage suit le protocole général de couplage décrit dans le chapitre "Matériel et Méthodes", que nous ne rappellerons donc pas ici.

Les MsDxAChPg obtenues sont conservées en tampon borate 0,01M, azide de sodium 0,2% pH 8,5 et donnent un signal néphélométrique en tampon de réaction (ou Blanc Billes, BB) de l'ordre de 48 mV pour une dilution au 1/40 (soit une concentration de 40 µg/mL).

Leur conservation à +4°C se révèle d'une remarquable stabilité, puisqu'au bout de deux ans, le BB reste aux alentours de 48 mV, signe d'une absence d'agglutination spontanée au cours du temps.

A.2/ Réactivité des MsDx sensibilisées

A.2.1/ Agglutination en présence d'HPg

La figure 3.1 montre l'agglutination des MsDxAChPg en présence d'HPg, amplifiée ou non par des Ac anti HPg.

L'antigène utilisé est un sérum étalon Behring de concentration connue en HPg (107 à 112 mg/L suivant les lots), que nous nommerons SEB par commodité.

Le tampon de réaction est un tampon borate 0,05M, défini en annexe 1. C'est celui qui a été mis au point pour le dosage du BPg en milieu lait (troisième partie, chapitre 2).

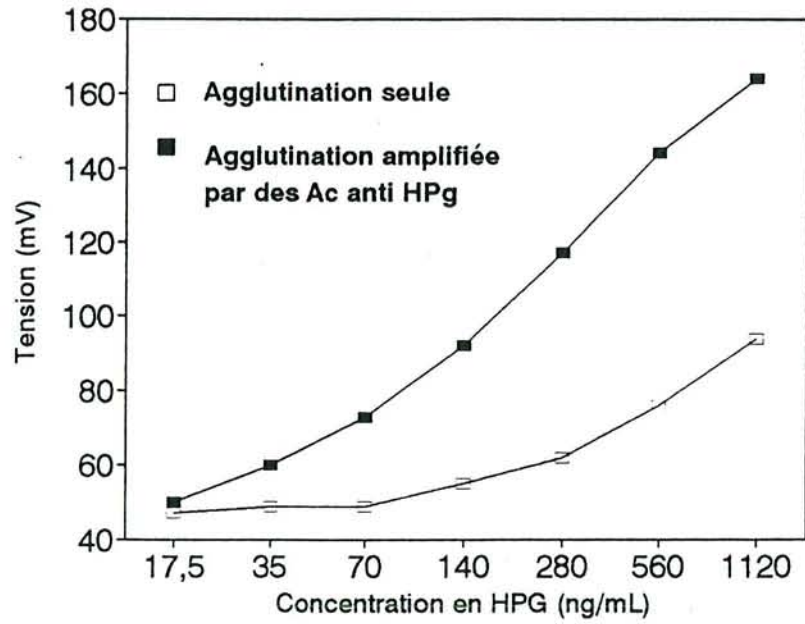
On constate l'importance de l'utilisation d'un As en "sandwich" qui permet de révéler la réaction d'agglutination.

L'agglutination des MsDxAChPg en présence d'HPg ne donne des résultats satisfaisants qu'avec la participation d'un autre antisérum anti HPg qui amplifie la réaction.

A.2.2/ Spécificité de cette agglutination

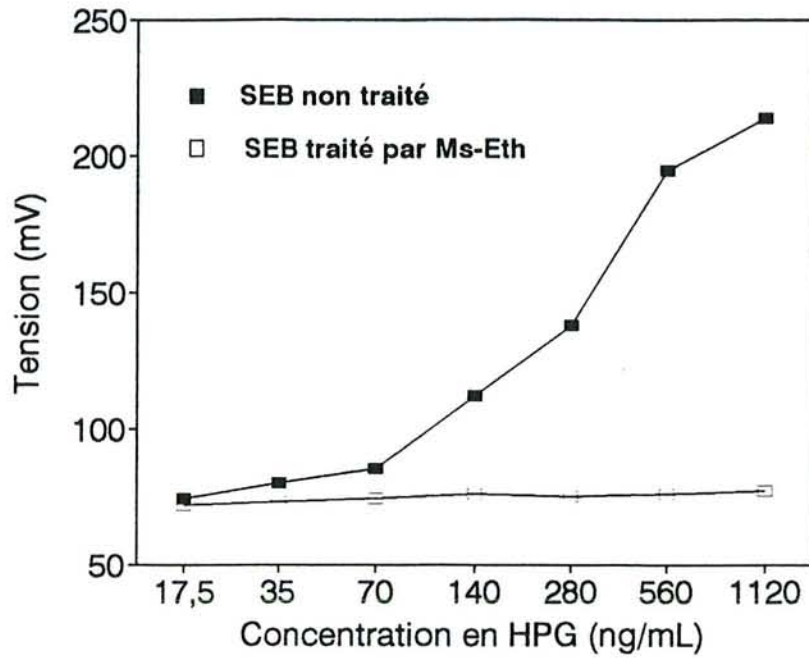
Il existe dans le sang un certain nombre de molécules capables de se fixer de façon aspécifique aux Ms et de les agglutiner: la fibronectine, certaines IgG et composants du complément (C3 et C1q) (CLIQUET et al, 1993).

Dans notre cas, la mise en présence de SEB et de MsDx non couplées provoque l'agglutination de celles-ci (figure 3.2).



| | HPG | MS | AS | Tampon |
|-------------------------|--|----------|---------|----------------|
| Dilution | 1/100 à 1/6400 | 1/40 | 1/400 | Borate pH 8 |
| Concentr° finale | 1120 à 18 ng/mL | 40 ug/mL | 9 ug/mL | |
| Incubation | 120 min (pré-incubation) + 60 min (incubation) | | | |
| Protocole | MsDxAcHPg + HPg HPg + AcHPg | | | |

FIGURE 3.1: AGGLUTINATION DES MsDxAcHPg PAR DES DILUTIONS D'UN SERUM ETALON HUMAIN



| | HPG | MS | AS | Tampon |
|-----------------------------|---|----------|----|------------------------|
| Dilution | 1/100 à 1/6400 | 1/200 | | Borate pH 8 |
| Concentr° finale | 1120 à 18 ng/mL | 70 ug/mL | | |
| Incubation | 60 minutes | | | |
| Protocole | Ms + SEB SEB traité par MS-Eth | | | |

FIGURE 3.2: AGGLUTINATION EN MILIEU BORATE DES MsDxAcHPg PAR DES DILUTIONS DU SEB AVANT ET APRES TRAITEMENT PAR DES Ms-Eth

Ce phénomène indésirable peut être éliminé en ajoutant dans le milieu des Ms saturées à l'éthanolamine (MsEth) qui fixent les protéines responsables de l'agglutination aspécifique. L'ensemble est séparé du sérum par centrifugation. (pour les détails du protocole, se reporter à l'annexe 3).

Un tel traitement minimise toute agglutination aspécifique par le SEB, puisque celle-ci n'apparaît plus de façon visible dans la réaction (figure 3.2).

Le sérum étalon nécessite un traitement avant sa mise en réaction pour éliminer toute part d'aspécificité dans l'agglutination.

A.2.3/ Choix du milieu de réaction

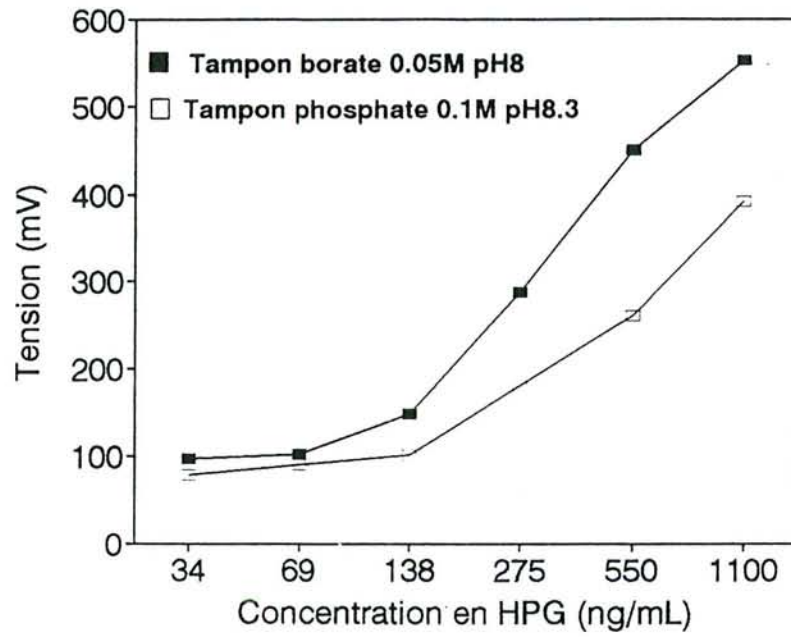
Le tampon où la réaction va se dérouler doit posséder un certain nombre de propriétés :

- Ne pas déstabiliser les MsDxAChPg seules au moins pendant le temps de la réaction (le BB ne doit pas évoluer).
- permettre et accélérer l'agglutination spécifique de ces Ms (ce rôle est en général dévolu au P.E.G. 6000), tout en évitant d'augmenter trop l'agglutination aspécifique qui perturberait le dosage.

Le SEB présente l'inconvénient de déstabiliser les Ms en tampon borate. Ce tampon a été étudié pour optimiser l'agglutination de Ms sensibilisées par des Ac anti plasminogène bovin dans des milieux synthétiques ou dans le lait. L'utilisation d'un tampon autre que le borate pourrait permettre de mieux maîtriser la déstabilisation en milieu sérique.

Nous avons donc comparé le tampon borate 0,05M à un tampon phosphate, utilisé par Diagnostics Pasteur comme diluant de néphélémétrie (réf. 90 090).

La figure 3.3 montre l'agglutination des MsDxAChPg en présence de SEB dans ces deux tampons : le tampon borate se montre plus favorable, malgré une force ionique plus faible et l'absence de NaCl. Il semble qu'ici, le pH, qui stabilise d'autant plus les Ms qu'il est basique, intervienne plus fortement que la force ionique. Toutefois, en tampon phosphate de sodium, l'élévation du signal par rapport au BB est suffisamment importante pour garantir une bonne précision des dosages (344 mV pour la première dilution du SEB, 135 mV en milieu de courbe).



| | HPG | MS | AS | Tampon |
|-------------------------|-------------------------|----------|----------|---|
| Dilution | 1/100 à 1/3200 | 1/40 | 1/200 | Phosphate pH 8.3 Borate pH 8.0 |
| Concentr° finale | 1100 à 34 ng/mL | 40 ug/mL | 18 ug/mL | |
| Incubation | 60 minutes | | | |
| Protocole | MsDxAcHPg + SEB + AcHPg | | | |

FIGURE 3.3: AGGLUTINATION DES MsDxAcHPg PAR DES DILUTIONS DU SEB DANS DEUX MILIEUX DE REACTION DIFFERENTS

De plus, le tampon phosphate déstabilisant moins les MsDxAcHPg, l'agglutination aspécifique devient négligeable et le prétraitement du SEB n'est plus indispensable (figure 3.4). En effet, l'écart des signaux néphélométriques entre le SEB traité et non traité n'est que de 3 % en milieu de courbe. Sans préjuger de la fidélité du dosage, et sachant qu'il existe des différences d'une cuve vide à l'autre de 3 à 6 mV, on peut affirmer que cette variation n'est pas significative. Le traitement de SEB par les MsEth est donc inutile dans ce tampon.

De plus, il est très courant que les pools calibrés du commerce (tel celui que nous utilisons ici) correspondent à des sérums concentrés (jusqu'à un rapport de 3) par rapport aux sérums normaux. Une absence d'agglutination aspécifique avec le SEB peut laisser préjuger qu'il en sera de même avec les sérums échantillons.

Le tampon phosphate est préféré au tampon borate 0,05M pH 8 qui génère une aspécificité trop importante.

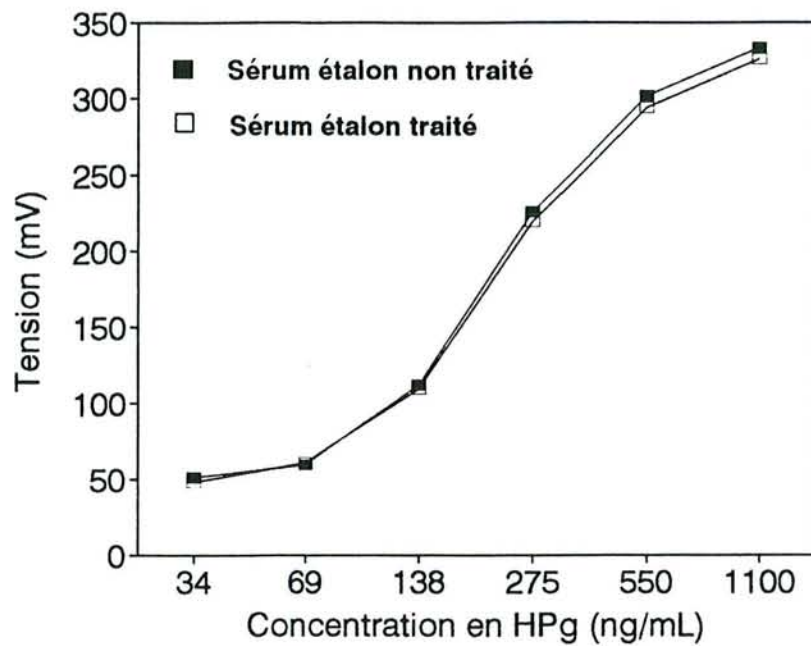
A.2.4/ Optimisation des paramètres du protocole

A.2.4.1/ Temps d'incubation de l'étape I

Nous avons testé différents temps d'incubation du système agglutinant avant l'ajout du système d'amplification: 3 minutes 45 secondes (qui correspondent au temps incompressible de passage d'un rack sur le module III du néphélomètre Behring), 30 minutes et 60 minutes.

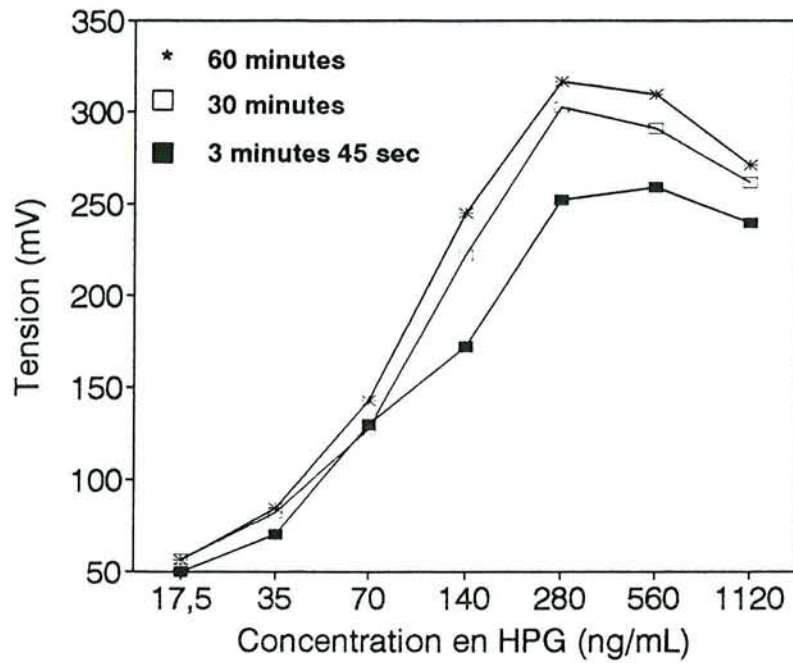
Les résultats sont indiqués dans la figure 3.5 : les incubations de 30 ou 60 minutes donnent des résultats assez proches, mais nettement supérieurs à ceux d'une incubation minimale. En milieu de courbe, cela représente un gain de respectivement 50 ou 70 mV. Le principe d'une incubation est donc retenu.

Un temps de 30 minutes d'incubation est préconisé à l'étape I après la mise en réaction des MsDxAcHPg avec l'HPg.



| | HPG | MS | AS | Tampon |
|-----------------------------|--|----------|----------|---------------------|
| Dilution | 1/100 à 1/3200 | 1/40 | 1/200 | Phosphate pH 8.3 |
| Concentration finale | 1100 à 34 ng/mL | 40 ug/mL | 18 ug/mL | |
| Incubation | 60 minutes | | | |
| Protocole | MsDxAcHPg + SEB SEB traité par Ms-Eth + AsHPg | | | |

FIGURE 3.4: AGGLUTINATION EN MILIEU PHOSPHATE DES MsDxAcHPg PAR DES DILUTIONS DU SEB TRAITE OU NON



| | HPG | MS | AS | Tampon |
|-----------------------------|---|----------|-----------|----------------|
| Dilution | 1/100 à 1/6400 | 1/40 | 1/800 | Borate pH 8 |
| Concentration finale | 1120 à 18 ng/mL | 40 ug/mL | 4.5 ug/mL | |
| Incubation | 3 min 45sec ou 30 min ou 60 min (pré-incubation) + 60 minutes (Incubation) | | | |
| Protocole | MsDxAcHPg + HPg + AcHPg | | | |

FIGURE 3.5: AGGLUTINATION DES MsDxAcHPg PAR DES DILUTIONS DU SEB AVEC DIFFERENTS TEMPS DE PRE-INCUBATION

A.2.4.2/ Quantité d'AChPg amplifiants et origine de ces Ac

Trois antisérums anti HPg différents sont testés. Leurs caractéristiques sont les suivantes :

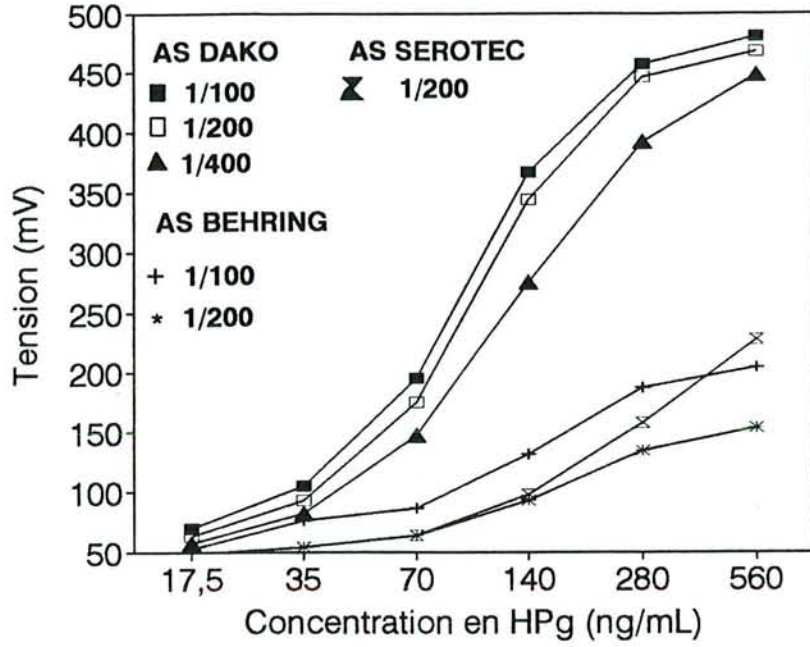
Tableau 3.1 : Caractéristiques des antisérums comparés

| | <u>AS 1</u> | <u>AS 2</u> | <u>AS 3</u> |
|------------------------------|-----------------------|----------------|---------------------|
| <u>Provenance</u> | DAKO | BEHRING | SEROTEC |
| <u>Etat</u> | Fractions Ig | As entier | As entier |
| <u>(c) ou titre (mg/mL)</u> | 3,6 | 0,41 (IDR) | 70(protéine totale) |
| <u>Animal</u> | Lapin | Lapin | Chèvre |
| <u>Dilutions testées</u> | 1/100, 1/200 1/400 | 1/100 1/200 | 1/200 |
| <u>Traitement aux Ms-Eth</u> | Non | Non | Oui |

La dilution d'AChPg va être choisie de façon à augmenter au maximum le signal néphélométrique; toutefois ce système ne devra pas consommer trop d'antisérum.

Les résultats sont indiqués sur la figure 3.6. Le plus fort signal néphélométrique est obtenu avec l'As Dako, le plus faible avec l'As Behring, à dilutions égales. L'As Sérotec fournit un signal d'amplitude sensiblement supérieure au Behring, mais présente l'inconvénient de nécessiter un prétraitement à chaque utilisation pour éliminer une forte réaction aspécifique; il sera donc écarté.

L'As Dako présente la meilleure réactivité des trois As testés. C'est aussi le seul se présentant directement sous forme de fractions Ig, ce qui peut expliquer un meilleur comportement à des dilutions comparables.



| | HPG | MS | AS | Tampon |
|-----------------------------|-------------------|-------------------------------------|---------------------------|---------------------|
| Dilution | 1/200 à 1/6400 | 1/40 | | Phosphate pH 8.3 |
| Concentration finale | 560 à 18 ng/mL | 40 ug/mL | | |
| Incubation | 60 minutes | | | |
| Protocole | MsDxAcHPg + HPg + | As: Dako 1/100 1/200 1/400 | Behring 1/100 1/200 | Serotec |

FIGURE 3.6: AGGLUTINATION DES MsDxAcHPg PAR DES DILUTIONS DU SEB EN PRESENCE DE DIFFERENTS AS AMPLIFIANTS

Les Ac anti HPg Dako sont les mêmes que ceux couplés aux MsDx. Dans le tampon de réaction utilisé, ils ne déstabilisent pas les Ms de façon aspécifique, mais des essais ultérieurs ont montré une absence de corrélation ($r=0,115$, $n=121$ échantillons) avec un dosage réalisé par Immunonéphélométrie Classique (Behring).

Le choix de l'As Behring pour révéler l'immunocapture apparaît donc plus judicieux que celui de l'As Dako. En effet, même si la réactivité est moins grande dans ce cas, le fait d'utiliser des Ac différents de ceux couplés sur les Ms permet d'augmenter la sécurité sur la spécificité du dosage. En effet, si, malgré les affirmations du fabricant sur la spécificité des IgG anti plasminogène, celles-ci reconnaissent une autre protéine dans les sérums, l'utilisation d'un sérum différent en "sandwich" permettra de ne révéler que la réaction spécifique du plasminogène; alors que l'utilisation d'un As identique révélera toutes les immunocaptures, y compris celles qui sont non spécifiques.

L'As Behring ne déstabilise pas les Ms, même à une dilution au 1/100. Il amplifie suffisamment le signal de départ (5 fois pour une concentration en HPg de 0,56 $\mu\text{g/mL}$) et sera donc retenu pour la suite du dosage, à une dilution de 1/100.

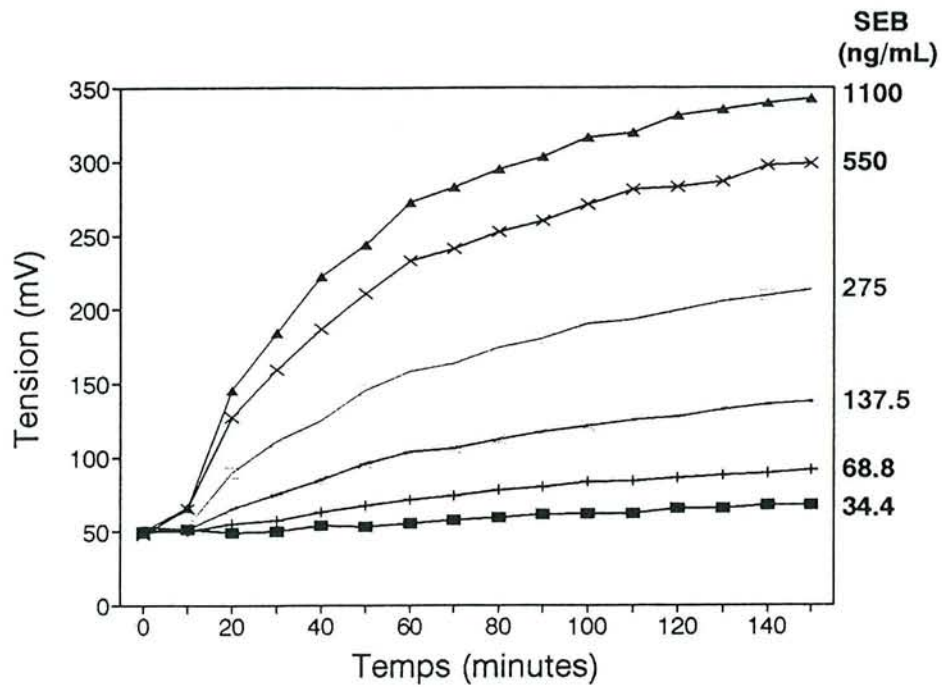
A.2.4.3/ Temps d'incubation de l'étape II

La cinétique de la réaction est suivie sur 150 minutes, par des lectures toutes les 10 minutes, et pour une gamme de 6 concentrations d'HPg (de 34,4 à 1100 ng/mL) (figure 3.7).

Les courbes d'évolution du signal présentent des pentes importantes jusqu'à 90 minutes pour la concentration la plus élevée, jusqu'à 60 minutes pour les deux suivantes, les deux dernières évoluant finalement peu.

Le temps minimum suffisant pour obtenir une bonne précision est de 60 minutes. Il faut toutefois garder à l'esprit que nous travaillons dans des conditions de moindre consommation de réactifs (Ms et As) et non de test de diagnostic rapide; ce dernier serait possible en augmentant les concentrations en Ac anti HPg et en MsDxAChPg pour obtenir une cinétique autorisant une lecture en 10 ou 15 minutes.

Le temps de réaction de l'étape II est fixé à 60 minutes après la mise en réaction de l'As amplifiant.



| | HPG | MS | AS | Tampon |
|-------------------------|-------------------------|----------|-------|---------------------|
| Dilution | 1/100 à 1/3200 | 1/40 | 1/100 | Phosphate pH 8.3 |
| Concentr° finale | 1100 à 34 ng/mL | 40 ug/mL | | |
| Incubation | 3 min 45 sec à 150 min | | | |
| Protocole | MsDxAcHPg + SEB + AcHPg | | | |

FIGURE 3.7: CINETIQUE DE LA REACTION D'AGGLUTINATION DES MsDxAcHPg PAR DES DILUTIONS DU SEB

A.2.5/ Dilution et traitement préalables des échantillons

Tous les sérums utilisés proviennent d'échantillons dosés en routine au laboratoire d'Immunologie de la faculté de Médecine.

250 sérums individuels ont été mélangés pour former un pool. Si l'on considère que la valeur moyenne de l'HPg dans le sang se situe entre 100 et 120 mg/L, ce pool devra donc être dilué au 1/500 pour se situer en milieu de courbe, ce qui est confirmé sur la figure 3.8 : après dosage et par référence à l'étalonnage, le pool est à une concentration de 105 mg/L.

D'après ce qui a été décrit pour l'étalonnage, et sachant que les échantillons seront dilués au 1/500, il n'est donc pas nécessaire de les traiter avec des Ms-Eth; cependant, pour enlever tout doute sur une éventuelle aspécificité de l'agglutination en présence de sérums, nous avons comparé le dosage de quelques échantillons avec et sans traitement (tableau 3.2); les différences obtenues sont minimes (2,1% en moyenne) et non significatives d'une aspécificité due au milieu (tableau 3.2) :

Tableau 3.2 : Comparaison des concentrations en HPg obtenues par INM à partir d'échantillons traités ou non

| <u>Echantillon non traité</u> | <u>Echantillon traité</u> | <u>CV</u> |
|-------------------------------|---------------------------|-----------|
| mg/l | mg/l | % |
| 288 | 281 | 2,4 |
| 292 | 286 | 2,1 |
| 315 | 312 | 1,0 |
| 319 | 309 | 3,1 |
| 302 | 296 | 2,0 |

Ces résultats confirment ceux obtenus avec le sérum étalon. Il est très courant que ces pools calibrés du commerce correspondent à des sérums concentrés par rapport aux sérums échantillons

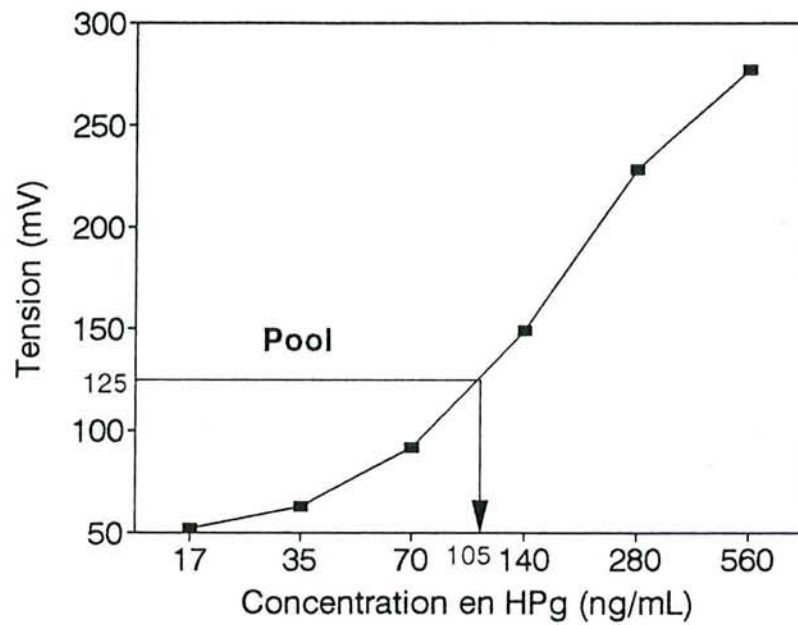


FIGURE 3.8: DOSAGE D'UN POOL DE SERUMS HUMAINS PAR RAPPORT AU SERUM ETALON

Le dosage de l'HPg en Immunonéphélémétrie Classique (Behring) nécessite un traitement clarifiant des échantillons, préconisé pour les sérums troubles. L'addition de trichlorotrifluoroéthane permet alors, après centrifugation, d'éliminer la plupart des graisses (voir annexe 3).

Dans notre protocole, les échantillons sont dilués au 1/500, ce qui est vraisemblablement suffisant pour éliminer toute turbidité résiduelle. Toutefois, nous avons comparé le dosage de 51 échantillons avec et sans traitement au trichlorotrifluoroéthane; ces résultats confirment l'inutilité d'un tel traitement (figure 3.9) : La corrélation des deux essais présente un coefficient de 0.969 au seuil de risque de 1/1000, la droite ayant une pente de 1,02.

Les échantillons de sérum humain sont dilués au 1/500 et mis en réaction sans aucun traitement préalable.

A.2.6/ Réaction croisée avec les lipoprotéines(a)

On sait depuis 1987 (EATON et al) qu'il existe une communauté antigénique entre l'HPg et les lipoprotéines(a). Il faut donc vérifier qu'une éventuelle réaction croisée avec les lp(a) ne perturbe pas le dosage.

Des sérums riches en lp(a) (0,48 à 0,66 mg/mL) nous ont été fournis par O. Flécheux (Diagnostics Pasteur). Leurs HPg, dosés par immunonéphélémétrie classique, varient de 56 à 132 mg/L (tableau 3.3) :

Tableau 3.3: Teneurs des sérums en lp(a) et HPg

| <u>Echantillon n°</u> | <u>Lpa(a) (mg/ml)</u> | <u>HPg (mg/l) par INC</u> |
|-----------------------|-----------------------|---------------------------|
| 1 | 0,66 | 132 |
| 2 | 0,50 | 127 |
| 3 | 0,48 | 131 |
| 4 | 0,45 | 56 |
| 5 | 0,59 | 118 |

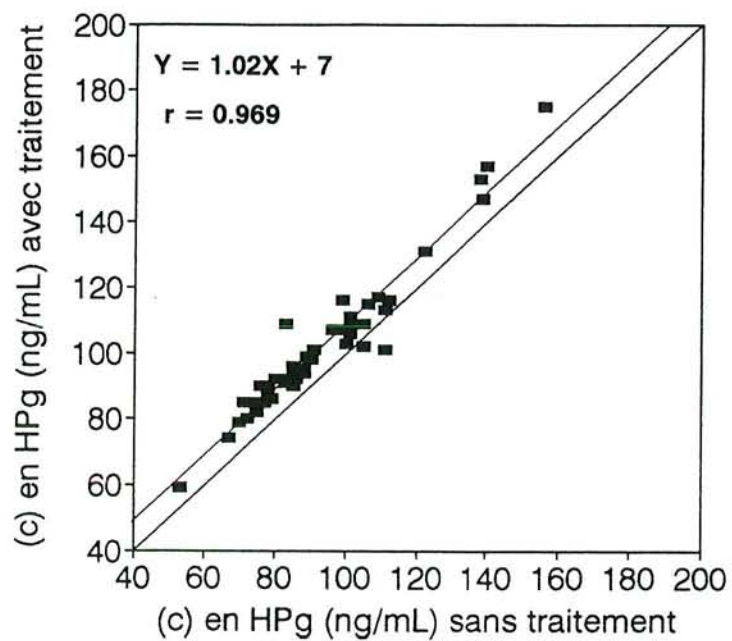


FIGURE 3.9: CORRELATION ENTRE LES TENEURS EN BPG DES SERUMS TRAITES OU NON PAR UN CLARIFIANT

On peut noter que les sérums riches en Ip(a) ont des teneurs moyennes ou faibles en HPg par dosage en INC, ce qui va dans le sens d'une absence de réaction croisée entre l'As Behring et les Ip(a).

Les sérums 1 et 2 sont choisis pour leurs concentrations élevées en Ip(a). Ils sont surchargés d'une quantité connue d'HPg et dosés par notre protocole. Les quantités récupérées sont corrélées aux quantités de départ au seuil de risque de 1/1000 ($Y = 1,15X - 21$, $r = 0,988$ et $Y = 0,87X + 3,5$, $r = 0,975$ respectivement pour les échantillons 1 et 2), comme le montre le tableau 3.4.

Tableau 3.4: Récupération de l'HPg dans des sérums riches en Ip(a)

| <u>Sérum</u> | <u>HPg théorique</u> | <u>HPg mesurée</u> | <u>Corrélation</u> | <u>% récupération</u> |
|--------------|----------------------|--------------------|--------------------|-----------------------|
| 1 | 79 | 79 | r=0,988 | 100 |
| | 108 | 92 | | 85 |
| | 137 | 135 | | 99 |
| | 194 | 206 | | 125 |
| 2 | 83 | 83 | r=0,975 | 100 |
| | 112 | 87 | | 78 |
| | 141 | 132 | | 94 |
| | 198 | 176 | | 89 |

La communauté antigénique entre l'HPg et les Ip(a) n'interfère pas sur le dosage.

A.2.7/ Faisabilité du dosage

Le seuil de détection est de l'ordre de 50 ng/mL.

La gamme de dosage s'étend de 35 à 550 mg/L, ce qui englobe les variations physiologiques (de 60 à 250 mg/L selon les normes établies par Behring pour son dosage en INC) et les valeurs pathologiques, qui sont pour la plupart des valeurs basses.

130 échantillons individuels sont testés avec le protocole que nous venons de développer (figure 3.10).

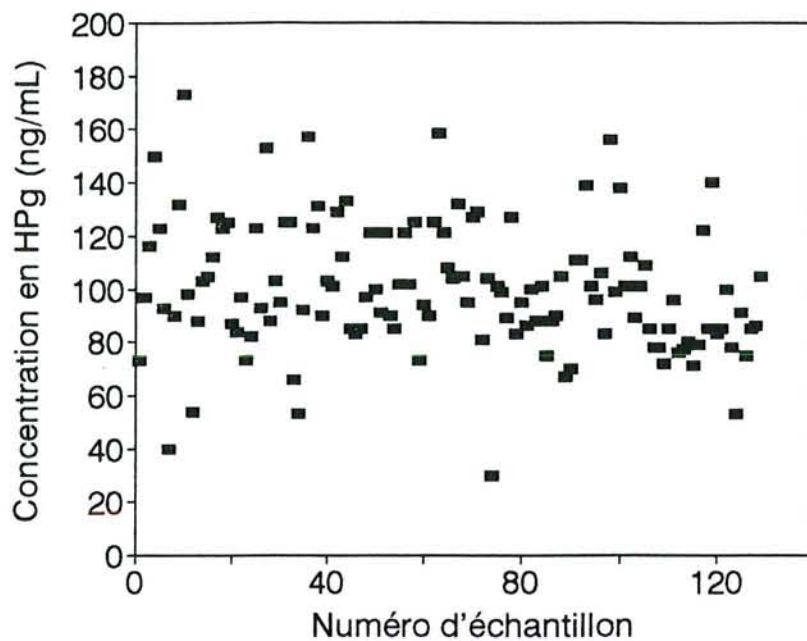


FIGURE 3.10: TENEURS EN HPg DE SERUMS HUMAINS SELON LE DOSAGE PAR INM

La moyenne des valeurs est de 100 mg/L; la plus basse est à 30 mg/L et la plus élevée à 173 mg/L. La figure 3.11 montre que les valeurs suivent une répartition normale (classes médiane, moyenne et modale confondues).

Les valeurs obtenues correspondent à celles généralement admises dans la littérature, où le plasminogène a une teneur moyenne comprise entre 100 et 120 mg/L (BACHMANN, 1986). Il est difficile de comparer nos valeurs à celles obtenues par d'autres méthodes immunochimiques, trop peu nombreuses. BORQUE et al (1989) utilisent des anticorps anti HPg couplés à des particules de polystyrène, mais le système utilisé fait appel à un comptage des particules non agglutinées après introduction de l'antigène. Mais surtout, les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport à un pool étalon de leur conception.

A.2.8/ Protocole final de dosage

Le protocole optimisé du dosage de l'HPg sérique est le suivant :

- Etalon : Sérum Etalon Behring non traité. De 34 à 1100 ng/mL.
- Ac amplifiants : Antisérums Behring de dilution finale au 1/100.
- MsDxAcHPg : 40 µg/mL en milieu de réaction, soit un BB de 48 mV.
- Echantillons : Sérum humain au 1/500 final. Pas de pré-traitement.
- Tampon de réaction : tampon pour néphélométrie Diagnostics Pasteur

B/ Validation du dosage

B.1/ Reproductibilité de l'étalonnage

Les étalonnages obtenus sur 6 mois lors de neuf manipulations différentes ont été comparés (figure 3.12). En milieu de courbe, le CV moyen est inférieur à 5%, et il n'excède pas 7% aux deux extrémités.

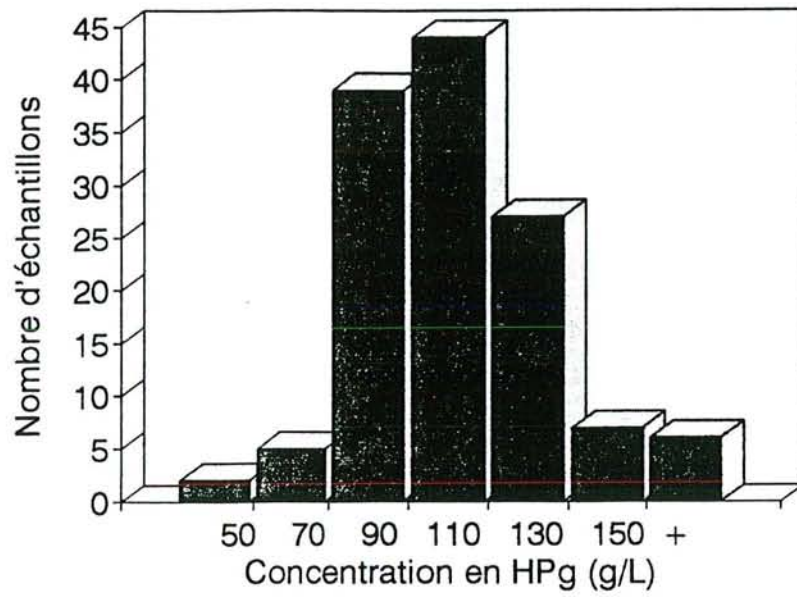


FIGURE 3.11: HISTOGRAMME DE REPARTITION DES TENEURS EN HPg DE SERUMS HUMAINS

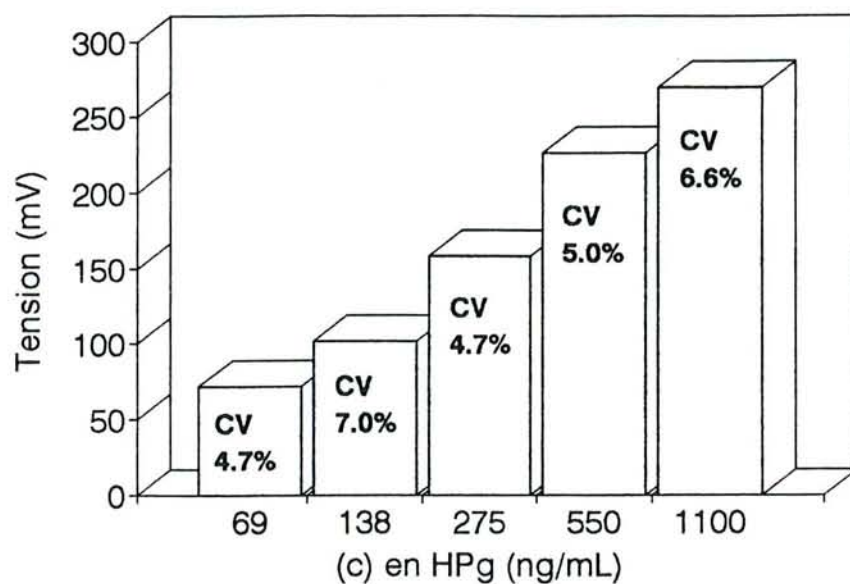


FIGURE 3.12: REPRODUCTIBILITE DES DIFFERENTS POINTS DE LA GAMME D'ETALONNAGE EN HPg

Cette reproductibilité pourrait sans doute encore être améliorée par l'utilisation de réactifs lyophilisés, nos réactifs conservés sous forme liquide pouvant subir un vieillissement préjudiciable à une bonne fidélité de l'expérience.

L'étalonnage présente une répétabilité satisfaisante avec un CV moyen de 5.6% sur l'ensemble des points.

B.2/ Fidélité du dosage

La fidélité donne la mesure de la variabilité des résultats pour un même échantillon. Elle correspond à la résultante de toutes les erreurs inhérentes à la manipulation (erreurs des pipetages pour les dilutions et les mises en réaction, erreurs sur les mesures, etc...).

La répétabilité correspond à des conditions expérimentales identiques (même manipulateur, mêmes appareils, mêmes réactifs); nous la dénommerons répétabilité intra-essai.

La reproductibilité correspond à des conditions expérimentales différentes (manipulateur, appareillage et réactifs différents); dans notre cas, le manipulateur et l'appareillage restent les mêmes, seuls les réactifs sont renouvelés. C'est pourquoi, plutôt que de reproductibilité, nous parlerons de répétabilité inter-essais.

B.2.1/ Fidélité intra-essai

Trois sérums de concentrations différentes en HPg (un "haut", un "moyen" et un "faible") sont testés par rapport à un même étalonnage.

Le sérum "haut" provient du pool de 250 échantillons, surchargé par de l'HPg. Le sérum "moyen" correspond à ce pool. Le sérum "faible" correspond à une dilution du pool dans du sérum bovin dont le plasminogène a été extrait par plusieurs cycles de chromatographie d'affinité sur Lysine-Sepharose 4B (partie Matériel et Méthodes). Ce sérum bovin, que l'on dénommera sérum Pg^m, n'agglutine pas les MsDxAcHPg (figure 3.13) et permet donc de diluer l'HPg sans diminuer la concentration protéique globale.

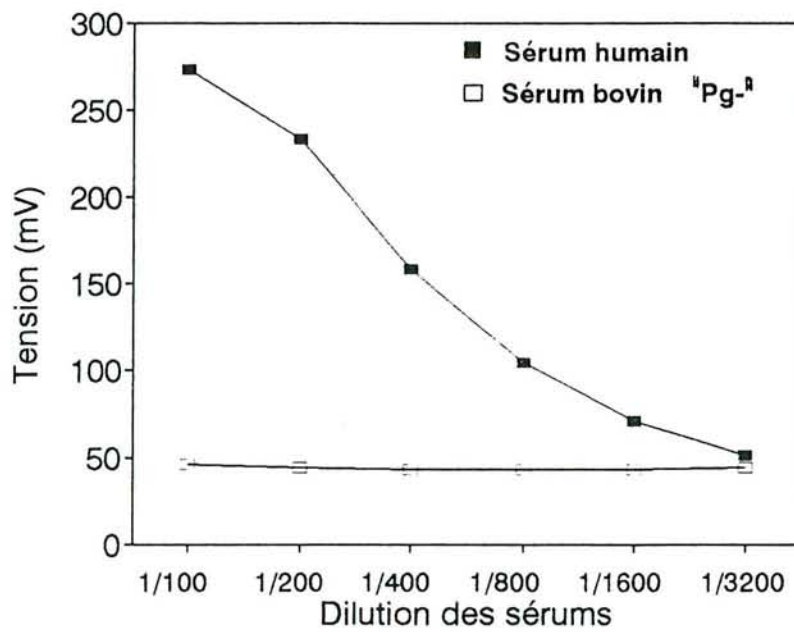


FIGURE 3.13: AGGLUTINATION COMPAREE DES MsDxAcHPg PAR LE POOL DE SERUMS HUMAINS ET PAR LE SERUM BOVIN "Pg-"

Les répétabilités sont indiquées dans la figure 3.14. Le sérum moyen a la meilleure fidélité intra-essai; cela correspond à la partie de la courbe d'étalonnage où la pente est la plus importante, donc la précision plus grande.

La fidélité intra-essai est proche de 1% en milieu de gamme et reste inférieure à 3% sur l'ensemble.

B.2.2/ Fidélité inter-essais

Les mêmes sérums sont testés par rapport à des étalonnages différents, 7 fois, 7 jours différents (figure 3.15).

La répétabilité inter-essais est satisfaisante pour le sérum moyen, qui est assez représentatif des valeurs physiologiques, moins bonne pour les sérums hauts et bas, pour les raisons évoquées plus haut, mais le CV reste acceptable.

La fidélité inter-essais est inférieure à 5% en milieu de gamme et à 12% aux extrémités.

B.3/ Exactitude de la méthode

B.3.1/ Etudes de récupération

Ces études permettent de tester la spécificité de la méthode, les valeurs récupérées étant égales en théorie à celles ajoutées.

Un sérum est dilué ou surchargé par de l'HPg purifié (1,02 mg/mL) puis dosé par INM. Le pourcentage de récupération équivaut à: $(\text{Valeur mesurée}/\text{Valeur théorique}) \times 100$. Plus la méthode est exacte, plus le pourcentage moyen de récupération est proche de 100.

B.3.1.1/ Tests de surcharge

Le pool est dilué par le sérum bovin Pg^m, utilisé pour les répétabilités, de façon à correspondre à une valeur basse (2v/v). Le sérum résultant a, par dosage en INM, une concentration en HPg de 74 mg/L. Les surcharges d'HPg purifié vont de 27 à 93 mg/L.

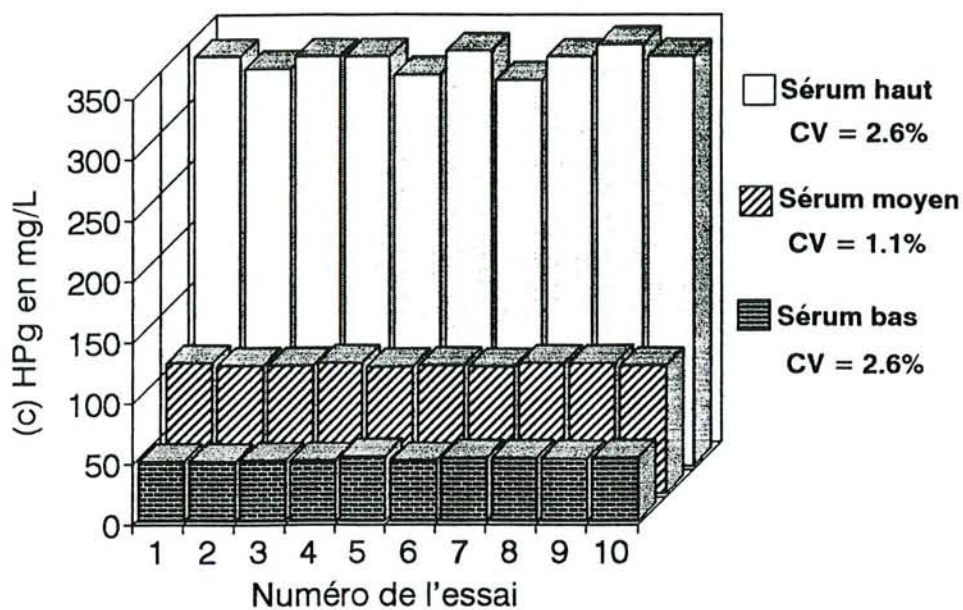


FIGURE 3.14: FIDELITE INTRA-ESSAI DU DOSAGE PAR INM DE L'HP_g

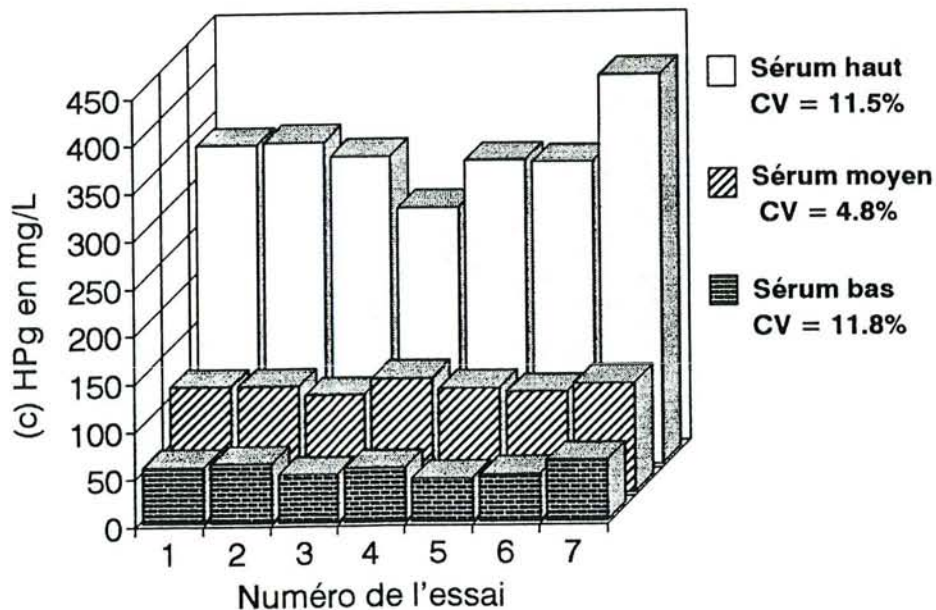


FIGURE 3.15: FIDELITE INTER-ESSAIS DU DOSAGE PAR INM DE L'HP_g

Les résultats des surcharges sont indiqués dans le tableau 3.5. Le pourcentage moyen de récupération est de 93%. L'équation de la droite de régression linéaire est :

$$Y = 0,89X + 6,37 \text{ avec un coefficient de corrélation } r = 0,997 \text{ (} p < 0,001 \text{)}.$$

De même, en surchargeant le SEB (95 mg/L mesuré par INM), on obtient un pourcentage moyen de récupération de 104% (tableau 3.5). L'équation de la droite de régression linéaire est :

$$Y = 1,03X + 0,83 \text{ avec un coefficient de corrélation } r = 0,986 \text{ (} p < 0,001 \text{)}.$$

B.3.1.2/ Etudes de dilutions

Un échantillon de concentration élevée, correspondant au pool surchargé par de l'HPg, est dosé par INM à 441 mg/L. Il est dilué de façon à parcourir la gamme de dosage: dilutions au 1/2, 1/3 et 1/4. Les résultats des dosages des dilutions sont indiqués dans le tableau 3.6. Le pourcentage moyen de récupération est de 82%. L'équation de la droite de régression linéaire est :

$$Y = 1,09X - 38,86 \text{ avec un coefficient de corrélation de } 0,999 \text{ (} p < 0,001 \text{)}.$$

Un deuxième échantillon de concentration élevée en HPg (349 mg/L) donne des résultats similaires, avec un pourcentage moyen de récupération de 88% (tableau 3.6). L'équation de la droite de régression linéaire est :

$$Y = 1,10X - 33,29 \text{ et } r = 0,999 \text{ (} p < 0,001 \text{)}.$$

Pour les dilutions au 1/4, on peut observer des récupérations plus faibles que pour les autres dilutions. Ceci peut être en partie expliqué parce qu'une telle dilution introduit des proportions importantes de tampon de réaction, ce qui modifie de façon non négligeable le milieu sérique de départ. L'utilisation du sérum Pg^m eut sans doute corrigé cette dérive.

Cet effet sérique pourrait aussi expliquer qu'en dilution les droites de régression ne passent pas par l'origine.

TABLEAU 3.5: RECUPERATION DES SURCHARGES D'HP_g DANS DES SERUMS HUMAINS

| Sérum (mg/L) | Surcharge HP _g (mg/L) | Concentration théorique (mg/L) | Concentration mesurée (mg/L) | Récupér° % |
|--------------|----------------------------------|--------------------------------|------------------------------|------------|
| 74 | 0 | 74 | 74 | 100 |
| 74 | 27 | 101 | 96 | 95 |
| 74 | 51 | 125 | 114 | 91 |
| 74 | 93 | 167 | 157 | 94 |
| 95 | 0 | 95 | 95 | 100 |
| 95 | 11 | 106 | 110 | 104 |
| 95 | 15 | 110 | 116 | 105 |
| 95 | 24 | 119 | 129 | 108 |
| 95 | 36 | 131 | 133 | 102 |
| 95 | 54 | 149 | 153 | 103 |

TABLEAU 3.6: RECUPERATION DE L'HP_g DANS DES DILUTIONS DE SERUMS HUMAINS

| Sérum (mg/L) | Dilution | Concentration théorique (mg/L) | Concentration mesurée (mg/L) | Récupér° % |
|--------------|----------|--------------------------------|------------------------------|------------|
| 441 | 1/1 | 441 | 441 | 100 |
| 441 | 1/2 | 221 | 201 | 91 |
| 441 | 1/3 | 147 | 115 | 78 |
| 441 | 1/4 | 110 | 86 | 78 |
| 349 | 1/1 | 349 | 349 | 100 |
| 349 | 1/1.5 | 233 | 229 | 98 |
| 349 | 1/2.25 | 155 | 136 | 88 |
| 349 | 1/3.38 | 103 | 79 | 77 |

B.3.1.3/ Conclusion sur les études de récupérations

L'ensemble des récupérations (surcharges plus dilutions) est représenté en figure 3.16. L'équation de la droite de régression linéaire est :

$$Y = 1,01X - 8,42 \text{ et } r = 0,992 \text{ (} p < 0,001 \text{)}.$$

Les études de récupération confirment l'exactitude de la méthode, la pente de la droite de régression linéaire étant proche de 1 (1,01). Les valeurs mesurées des surcharges et dilutions sont corrélées aux valeurs théoriques au seuil de risque de 1/1000.

B.3.2/ Corrélation avec une technique de référence.

A titre de validation, nous avons cherché à évaluer, par un calcul de régression, l'accord entre les résultats du dosage de l'HPg par INM et ceux obtenus par une méthode de référence. La méthode choisie est l'Immunonéphélométrie classique (INC, Matériel et Méthodes), non parce qu'elle constituait pour nous une méthode dite "de référence", mais parce qu'en l'absence d'une référence pour le dosage de l'HPg, nous nous sommes tourné vers la technique la plus couramment utilisée en biologie clinique pour cette molécule. Nous avons choisi le dosage élaboré par la société Behring. Nous utiliserons le protocole, les réactifs et le néphélomètre LN Behring. Cent sérums seront ainsi testés en parallèle, de façon à positionner notre méthode par rapport à celles existant en biologie clinique.

B.3.2.1/ Résultats de la corrélation

La figure 3.17 montre le nuage de points, avec une droite de régression linéaire ayant une pente de 0,44, pour un coefficient de corrélation de 0,769. La moyenne des valeurs se situe à 98 mg/L selon la technique d'INM et 106 mg/L selon l'INC.

B.3.2.2/ Discussion

L'expérience que nous avons de cette technique en tant qu'utilisateur nous conduit à émettre des réserves sur un certain nombre de points, qui peuvent avoir des implications sur le résultat de la corrélation :

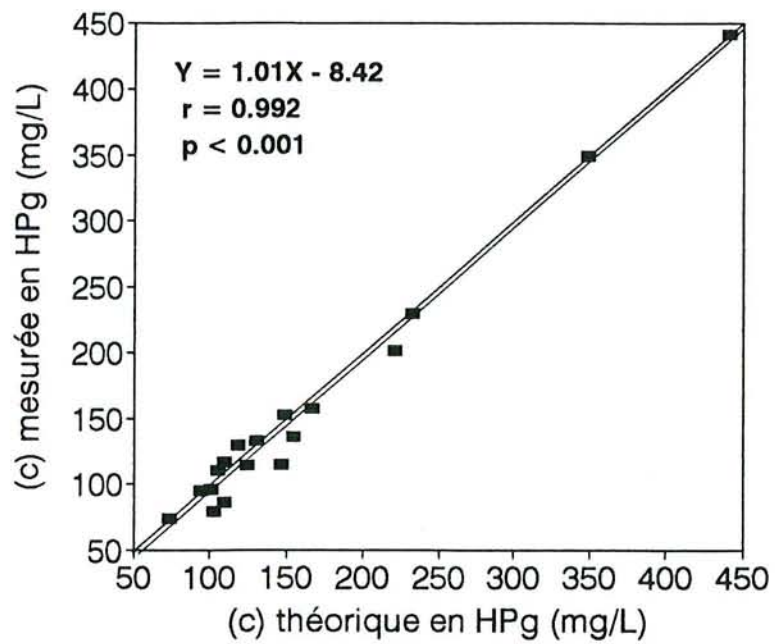


FIGURE 3.16: RECUPERATION DE L'HPg DANS DES SERUMS HUMAINS

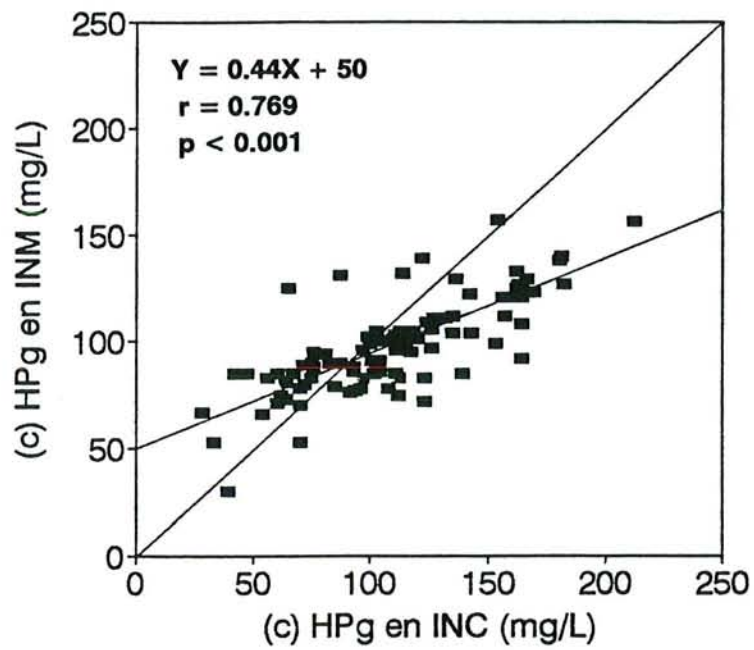


FIGURE 3.17: CORRELATION SUR LES TENEURS EN HP_g DE SERUMS HUMAINS OBTENUES PAR INM OU INC

- Le fabricant conseille de traiter les sérums qui présentent un trouble (dû principalement aux graisses) par un clarifiant, le trichlorotrifluoroéthane.

Nous avons testé en INC une centaine d'échantillons, dont seuls ceux qui présentaient un trouble apparent ont été traités. Puis, la turbidité des dilutions d'échantillons (ou blancs échantillons, 1/30 en NaCl 0,9%) a été mesurée sur le néphélémètre LN Behring. Certains d'entre eux présentaient un blanc élevé, quelquefois comparable à la valeur obtenue lors de la réaction immunologique du dosage (figure 3.18): près de 20% des sérums avaient un blanc supérieur à 2 Volts (signal qui correspond à une concentration d'environ 50 mg/L en HPg) et 4 d'entre eux avaient des valeurs supérieures à 6 Volts, soit en plein milieu de la gamme d'étalonnage. Le sérum le plus élevé en HPg, soit 255 mg/L avait un blanc de 9,38 Volts, qui est vraisemblablement à l'origine d'une valeur aussi haute, bien qu'on observe des valeurs élevées avec des blancs corrects. Quoiqu'il en soit, la corrélation entre les valeurs totales et les valeurs amputées des blancs en est affectée (figure 3.19, n=98).

On dégage deux populations d'échantillons : celles à blancs faibles dont les valeurs se corrélaient parfaitement et celle à blancs élevés dont on ne peut dire s'ils affectent ou non le dosage. De plus, la soustraction des valeurs des blancs ne conduirait pas forcément à la valeur réelle en HPg dans l'échantillon. Le protocole Behring est donc appliqué strictement pour la corrélation.

- Le temps de lecture requis par le protocole Behring est de 30 minutes. Nous avons effectué deux lectures successives de 100 échantillons à 30 et à 50 minutes sur le néphélémètre Behring. Les résultats obtenus à la deuxième lecture sont sensiblement différents de ceux de la première, bien qu'ils soient corrélés au seuil de 1/1000 ($r = 0,875$) (figure 3.20). Si l'on fait la même démarche avec l'INM, i.e. une lecture à 60 minutes et une à 90 minutes d'incubation, les valeurs restent beaucoup plus proches (figure 3.21), avec un coefficient r égal à 0,999.

Il semble, dans le cas de l'INC, qu'il y ait une redissolution partielle des immunocomplexes, ce qui interdit toute lecture au dessus de 30 minutes d'incubation. Ce n'est pas le cas en INM où les agglutinats en suspension ont une plus grande stabilité.

- Nous avons comparé sur 25 sérums la réaction HPg/AcHPg entre l'As provenant du kit de dosage Behring (titre IDR 0,41) et un As Dako, de qualité équivalente (3,6 mg/mL). Les signaux néphélémétriques de la réaction sont différents, ce qui n'est en rien surprenant, chaque As ayant un pouvoir précipitant qui lui est propre. Mais si l'on rapporte ces valeurs à un étalon utilisé dans les mêmes

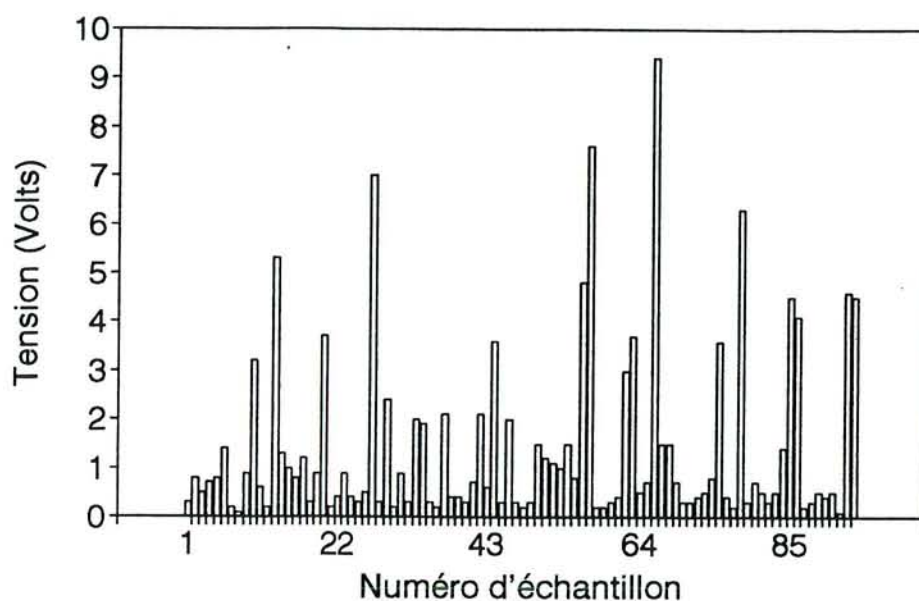


FIGURE 3.18: SIGNAUX NEPHELEMETRIQUES DES ECHANTILLONS DILUES AU 1/30

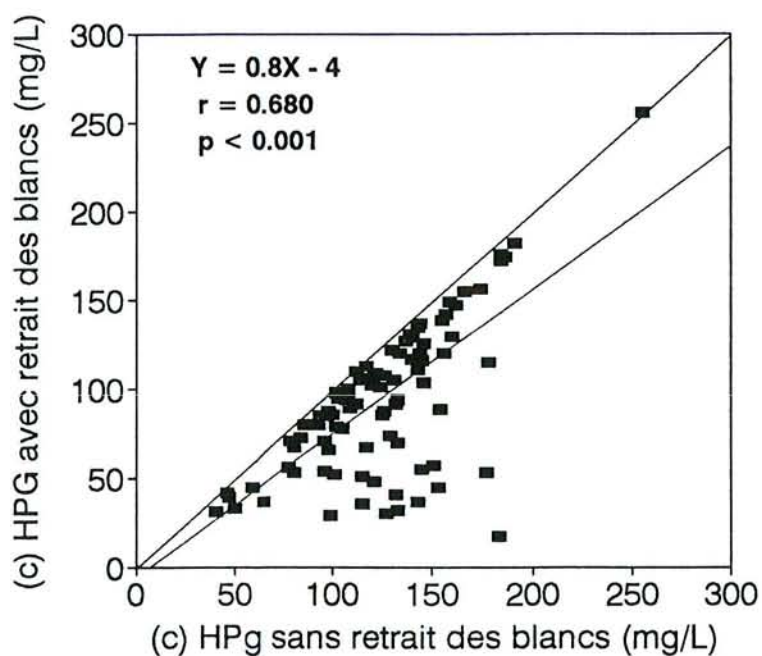


FIGURE 3.19: CORRELATION ENTRE LES TENEURS EN HP_g DES SERUMS DOSES PAR INC AVEC OU SANS RETRAIT DES BLANCS

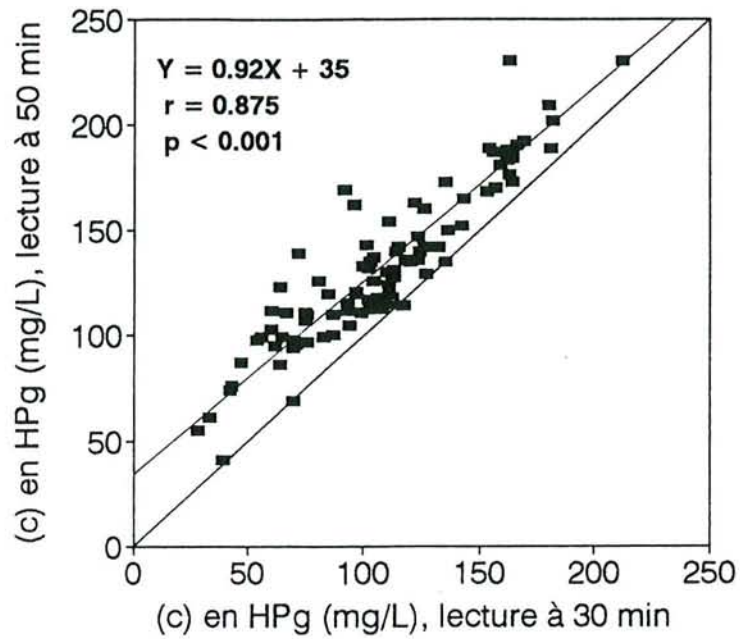


FIGURE 3.20: CORRELATION ENTRE LES TENEURS EN HPg DES SERUMS MESUREES EN INC A DEUX TEMPS D'INCUBATION DIFFERENTS

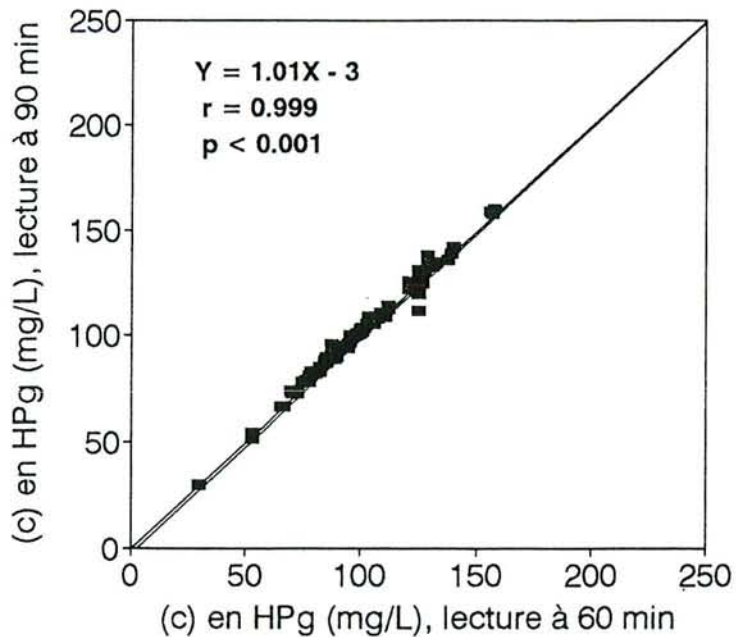


FIGURE 3.21: CORRELATION ENTRE LES TENEURS EN HPg DES SERUMS MESUREES EN INM A DEUX TEMPS D'INCUBATION DIFFERENTS

conditions, on obtient des concentrations nettement plus élevées avec l'As Dako qu'avec l'As Behring (figure 3.22) : la moyenne est de 143 mg/L avec le premier contre 124 mg/L pour le second. Néanmoins, les deux essais restent corrélés au seuil de 1/1000 ($r = 0,919$).

Les valeurs physiologiques annoncées par Behring (60-250 mg/L, moyenne à 120 mg/L) sont donc valables dans le cadre d'un dosage de l'HPg mettant en oeuvre les réactifs, protocole et appareillage de ce fabricant. Les valeurs obtenues par INM avec un As de provenance différente (Dako) sont inférieures (moyenne proche de 100 mg/L). Il faut donc relativiser les concentrations d'HPg par rapport à la méthode de dosage.

Les résultats de la corrélation justifient un certain nombre de commentaires :

Tout d'abord, on doit noter la relative faiblesse de la pente de la droite de régression linéaire (0,44) ainsi qu'une ordonnée à l'origine élevée (50 mg/L). Les problèmes de blancs échantillons en INC (évoqués au début de ce paragraphe) jouent un rôle important dans l'obtention de tels résultats. De ce fait, un certain nombre de teneurs élevées en HPg obtenues par cette technique sont sur-évaluées, et ceci malgré les pré-traitements requis par le fabricant. Cette surestimation est en partie responsable de la faiblesse de la pente.

De plus, en INC, le signal est en partie formé par l'antigène (dans notre cas, l'HPg, qui provoque la formation du complexe immun). En INM, le signal résulte de l'agglutination des Ms (consécutif à l'apparition de l'immunocomplexe). Dans le premier cas, l'état de l'Ag est beaucoup plus important dans la formation du signal que dans le deuxième cas. De plus l'As qui va déterminer la spécificité de la méthode est différent dans les deux cas.

Bien que les deux méthodes se terminent par une lecture néphélométrique, leurs principes et les bases physiques de formation des signaux sont donc totalement différents. Ceci peut expliquer, en plus du manque de performance de l'INC, un coefficient de corrélation à 0,769.

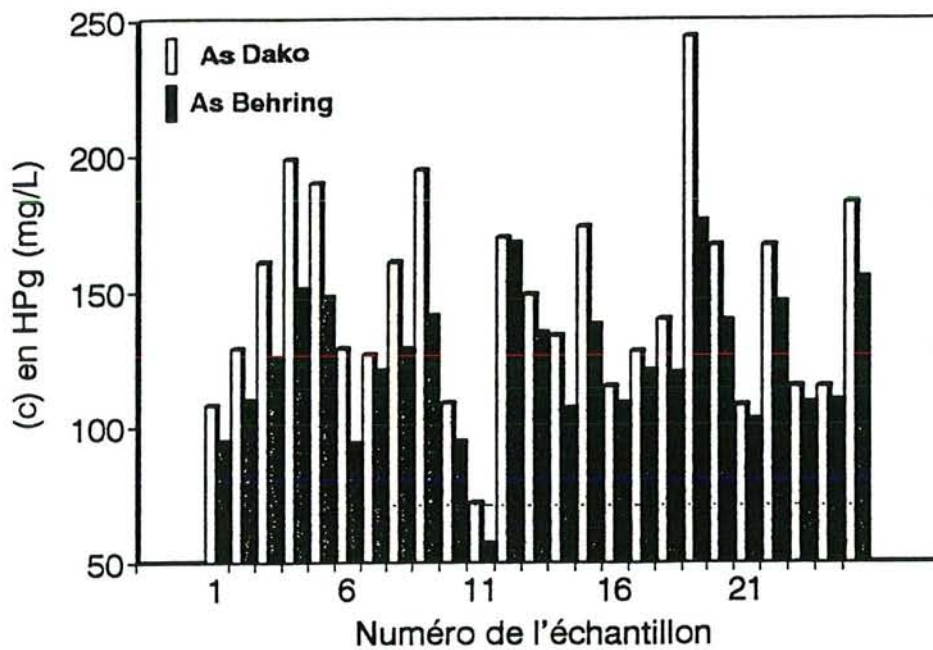


FIGURE 3.22 : AGGLUTINATION DES MsDxAcHPg PAR DES SERUMS HUMAINS EN PRESENCE D'AS AMPLIFIANTS DIFFERENTS

C/ Conclusions

Nous avons mis au point et effectué la validation du dosage de l'HPg par INM.

Son optimisation en abaisse le seuil de détection à 50 ng/mL, autorisant une dilution des échantillons au 1/500. Cette forte dilution, associée à un tampon minimisant les réactions aspécifiques, permet d'utiliser directement des échantillons, sans aucun pré-traitement. Les tests de récupération permettent de confirmer la spécificité du dosage et les répétabilités intra- et inter-essais donnent satisfaction dans le cadre d'une utilisation en biologie clinique. La comparaison de la méthode à un dosage par INC révèle les limites de ce dernier.

Notre technique de dosage présente un double intérêt :

- Tout d'abord, en biologie clinique, elle trouve sa place dans les méthodes d'évaluation du système fibrinolytique et de ses variations physio-pathologiques. L'enzyme intervient aussi dans certains processus tels l'inflammation et l'invasion tumorale et est perturbée dans certaines affections hépatiques. Il est donc extrêmement intéressant de disposer d'un dosage moléculaire de l'HPg, qui sera une source d'information complémentaire des dosages d'activité enzymatique. L'étape ultérieure serait de posséder un dosage discriminant du plasminogène et de la plasmine, par l'utilisation d'anticorps monoclonaux, de façon à évaluer avec précision l'activation du système dans les nombreuses pathologies où il intervient.

- En second lieu, ce dosage va servir de base à celui du plasminogène bovin dans le lait. Nous allons l'utiliser directement grâce à la forte homologie de structure du plasminogène entre les deux espèces. Ce type de dosage "inter-espèces" a déjà été utilisé avec succès pour le plasminogène en ELISA (POLITIS et al, 1992). La sensibilité atteinte après optimisation d'un tel système permettra de conclure quant à son utilisation en milieu lait.

CHAPITRE 2

**DOSAGE DU PLASMINOGENE BOVIN
EN MILIEU SYNTHETIQUE PAR UN
SYSTEME INTER-ESPECES
D'IMMUNONEPHELEMETRIE
MICROPARTICULAIRE**

CHAPITRE 2 : DOSAGE DU PLASMINOGENE BOVIN EN MILIEU SYNTHETIQUE PAR UN SYSTEME INTER-ESPECES D'IMMUNONEPHELEMETRIE MICROPARTICULAIRE

A/ Introduction

Dans la partie Matériel et Méthodes , nous avons décrit les différents modèles de dosage réalisables en INM, mettant en oeuvre des Ms sensibilisées soit par des Ag, soit par des Ac. Les deux modèles sont applicables au dosage du BPg. Pour des raisons pratiques, et pour faire suite à une étude préliminaire allant dans ce sens (HUMBERT, 1986), nous avons choisi initialement de mettre au point un dosage par inhibition de l'agglutination de Ms sensibilisées par du BPg (MsBPg).

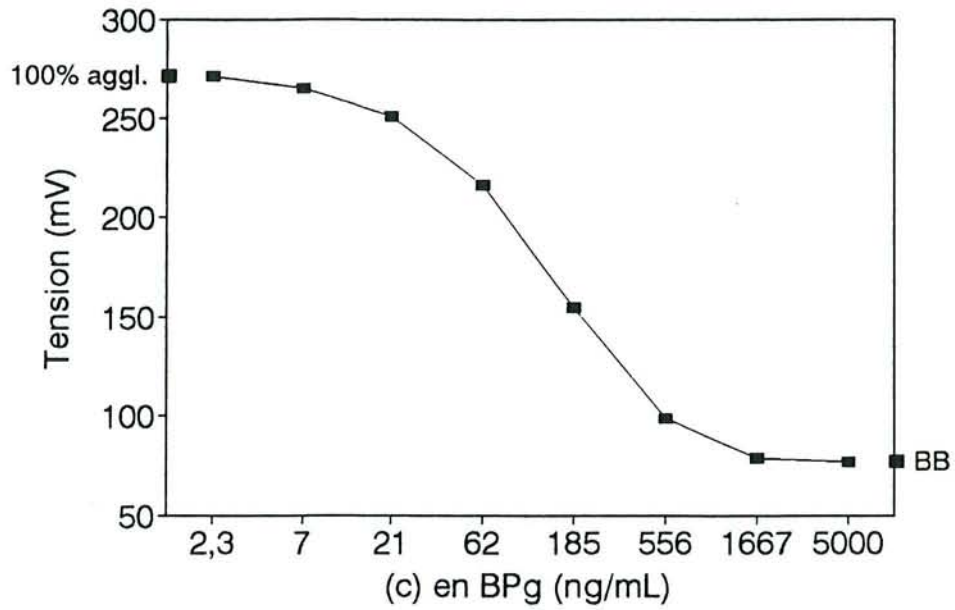
Malheureusement, après des débuts prometteurs (inhibition totale du système par du BPg, sensibilité de l'ordre de 10 ng/mL, figure 4.1), nous nous sommes heurté à une instabilité irréductible des MsBPg en suspension à court ou moyen terme. De plus, la reproductibilité des résultats d'un lot à l'autre était décevante.

Devant cette situation, nous avons retenu pour la quantification du BPg l'emploi de Ms sensibilisées par des Ac anti Plasminogène.

Le chapitre précédent décrit la mise au point du dosage du plasminogène humain en milieu sérique. La forte homologie entre les plasminogènes humain et bovin (78% sur l'ensemble de leurs séquences) laisse penser qu'il serait possible d'utiliser des MsDxAChPg pour doser le BPg

Nous allons maintenant utiliser cette réaction croisée entre les plasminogènes humain et bovin pour doser ce dernier.

Puis, nous optimiserons ce système "inter-espèces" de façon à en augmenter sa sensibilité



| | BPg | MS | AS | Tampon |
|-------------------------|--------------------------|----------|----------------------------------|------------------|
| Dilution | 1/200 à 1/437400 | 1/200 | 1/3000 | Borate pH 8.0 |
| Concentr° finale | 5000 à 2.3 ng/mL | 50 ug/mL | | |
| Incubation | 60 minutes | | | |
| Observation | | | Traitement par Ms-Eth (annexe 3) | |
| Protocole | MsBPg + BPg + As antiBPg | | | |

FIGURE 4.1: INHIBITION DE L'AGGLUTINATION MsBPg/AsBPg PAR DES DILUTIONS D'UNE SOLUTION DE BPg

B/ Mise au point du dosage du BPg par un système inter-espèces

B.1/ Agglutination des MsAcHPg par du BPg

Les MsDxAcHPg sont mises en présence de différentes dilutions de BPg (solution mère à 2,1 mg/mL) pendant un temps de contact de 30 minutes. L'agglutination ainsi initiée est alors révélée par l'addition d'un As anti BPg (cf. matériel et méthodes) dilué au 1/200 final. Cet As a préalablement été traité par des Ms-Eth, selon le protocole défini en annexe 3, de façon à éviter toute agglutination aspécifique des Ms en présence des Ac HPg. Nous le nommerons AsBPg*.

Une lecture au néphélémètre est effectuée 60 minutes après l'ajout d'un AsBPg*. Le milieu de réaction utilisé est un tampon borate 0,05M pH 8, précédemment conçu (COLLARD-BOVY et al, 1991) pour optimiser la réaction d'agglutination en milieu lait (annexe 1).

La figure 4.2 met en évidence une agglutination significative, due à la formation d'un immuncomplexe entre les anticorps anti HPg et du BPg. Le Blanc Bille est multiplié par 5 pour 0,5 µg/mL de BPg et le seuil de détection est de l'ordre de 100 ng, ce qui n'est pas négligeable pour une réaction inter-espèces non optimisée.

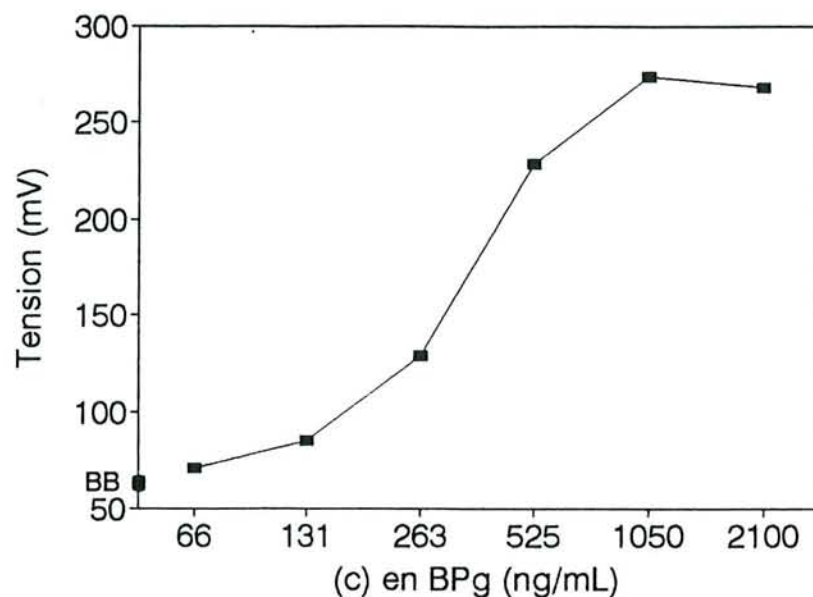
Il est à noter que l'utilisation du tampon de réaction défini pour le dosage de l'HPg (à base de phosphate) stabilise, dans ce cas, les MsDxAcHPg de façon telle que l'agglutination n'est plus significative aux concentrations de BPg utilisées.

La réaction croisée entre des anticorps anti plasminogène humain et le plasminogène bovin est suffisamment importante pour permettre l'agglutination de Ms.

B.2/ Quantité optimale d'anticorps amplifiants

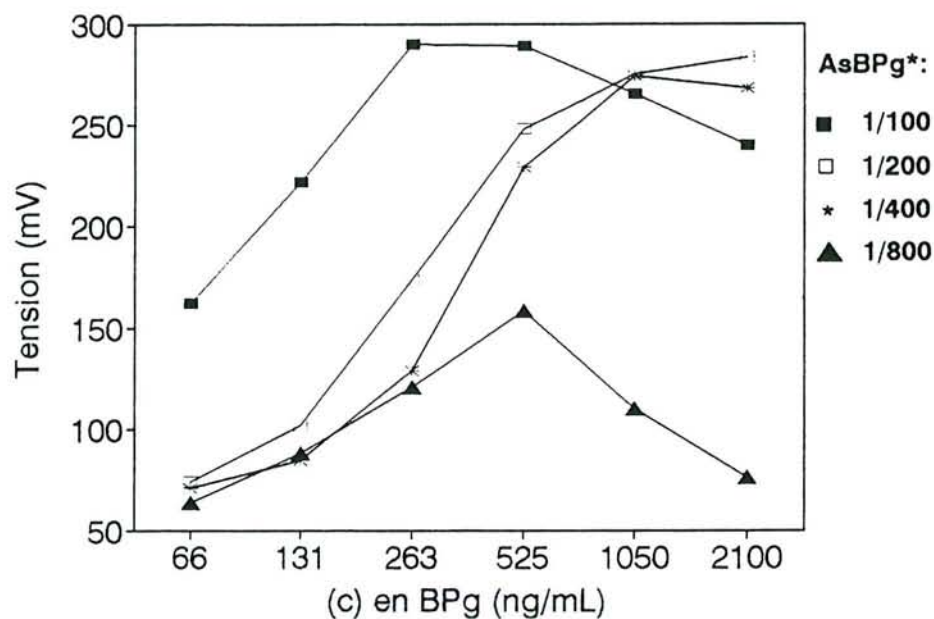
Les effets de quatre dilutions de l'AsBPg* sur l'agglutination de MsDxAcHPg/BPg sont comparés : 1/100, 1/200, 1/400, 1/800 (figure 4.3).

Dans un souci d'économie de réactifs, nous choisirons une dilution finale au 1/400, première dilution agglutinant les Ms de façon suffisamment importante.



| | BPg | MS | AS | Tampon |
|-------------------------|---|--------------|--|------------------|
| Dilution | 1/1000 à 1/32000 | 1/40 | 1/200 | Borate pH 8.0 |
| Concentr° finale | 2100 à 66 ng/mL | 100 ug/mL | | |
| Incubation | 30 min (pré-incubation) + 60 min (incubation) | | | |
| Observation | | | Traitement par Ms-Eth (annexe 3) | |
| Protocole | MsDxAcHPg + BPg + AsBPg* | | | |

FIGURE 4.2: AGGLUTINATION DES MsDxAcHPg PAR LES DILUTIONS D'UNE SOLUTION DE BPg EN PRESENCE D'UN AsBPg



| | BPg | MS | AS | Tampon |
|-------------------------|--|-----------|----------------------------------|------------------|
| Dilution | 1/1000 à 1/32000 | 1/40 | 1/100 à 1/800 | Borate pH 8.0 |
| Concentr° finale | 2100 à 66 ng/mL | 100 ug/mL | | |
| Incubation | 30 min (pré-incubation) + 60 min (incubation) | | | |
| Observation | | | Traitement par Ms-Eth (annexe 3) | |
| Protocole | MsDxAcHPg + BPg + AsBPg* 1/100 + AsBPg* 1/200 + AsBPg* 1/400 + AsBPg* 1/800 | | | |

FIGURE 4.3: AGGLUTINATION DES MsDxAcHPg PAR LES DILUTIONS D'UNE SOLUTION DE BPg EN PRESENCE D'UN AsBPg A DIFFERENTES CONCENTRATIONS

B.3/ Concentration optimale de MsDxAcHPg

Deux concentrations de MsDxAcHPg sont testées lors d'une agglutination par le BPg : 200 et 100 µg par mL de milieu de réaction. Les voltages sont plus importants avec les Ms plus concentrées, mais le seuil de détection n'en est pas amélioré (figure 4.4).

Toujours avec le même souci de moindre consommation, nous choisirons donc d'introduire 100 µg de MsDxAcHPg par mL de milieu de réaction.

B.4/ Protocole final et gamme d'étalonnage

Le protocole final est sensiblement identique à celui utilisé pour l'HPg:

- Etape I: 30 µL MsDxAcHPg (1 mg/mL)
 30 µL BPg (21 à 0,66 µg/mL)
 140 µL tampon de réaction.

- Incubation de 30 minutes à température ambiante.

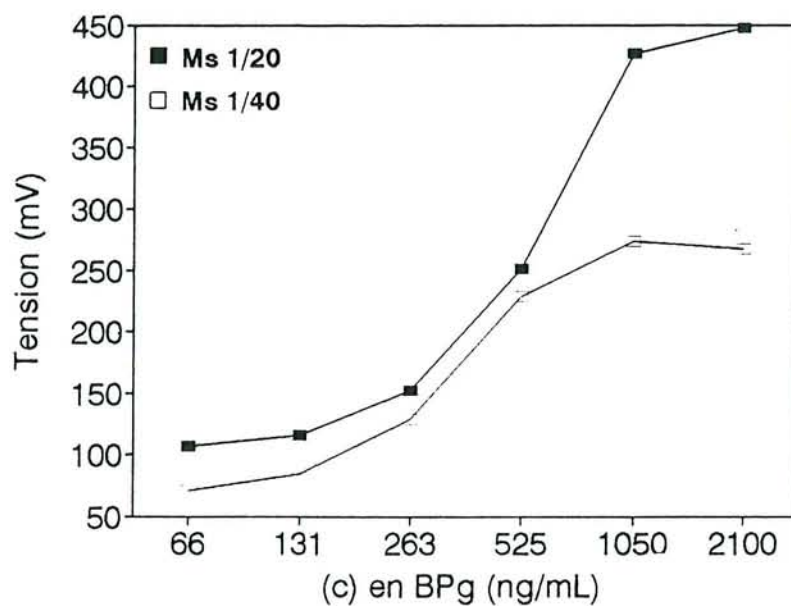
- Etape II: ajouter 30µL AsBPg*(1/40) et 70µL tampon de réaction.

La gamme d'étalonnage a un seuil de détection d'environ 80 ng/mL et permet de doser le BPg entre 130 et 1050 ng/mL .

C/ Optimisation de la sensibilité du dosage

On étudie l'influence du pH et de la teneur du tampon en PEG sur le dosage. Les effets de quatre pH (6,5 / 7 / 7,5 / 8) et de trois concentrations en PEG sont ainsi testés sur les courbes d'étalonnage du BPg (des pH plus bas ou des teneurs en PEG plus concentrées risqueraient de déstabiliser fortement les Ms en les agglutinant de façon aspécifique).

On constate (tableau 1, annexe 4) que le pH et le PEG influencent l'agglutination MsDxAcHPg/BPg, et ce quelles que soient leurs valeurs. Dans tous les cas, le Blanc Bille reste stable pendant la lecture.



| | BPg | MS | AS | Tampon |
|-------------------------|---|------------------|----------------------------------|------------------|
| Dilution | 1/1000 à 1/32000 | 1/20 et 1/40 | 1/400 | Borate pH 8.0 |
| Concentr° finale | 2100 à 66 ng/mL | 200 et 100 ug/mL | | |
| Incubation | 30 min (pré-incubation) + 60 min (incubation) | | | |
| Observation | | | Traitement par Ms-Eth (annexe 3) | |
| Protocole | MsDxAcHPg 1/20 MsDxAcHPg 1/40 + BPg + AsBPg* | | | |

FIGURE 4.4: AGGLUTINATION DES MsDxAcHPg PAR LES DILUTIONS D'UNE SOLUTION DE BPg POUR DIFFERENTES CONCENTRATIONS DE Ms

La plus grande différence avec la courbe initiale est obtenue en tampon pH 6,5 et PEG 5% (figure 4.5). Dans ces nouvelles conditions de milieu de réaction, la courbe étalon s'est déplacée vers des valeurs plus basses : la gamme de dosage s'étend de 30 à 130 ng/mL.

Un milieu de réaction à pH 6,5 et à 5% de PEG permet d'abaisser le seuil de détection vers 20 ng.

D/ Validation du dosage

Une validation de ce dosage a été effectuée. Celui-ci ne constituant qu'une étape vers le dosage du BPg dans des laits, cette étude ne sera pas détaillée. Toutefois, il en ressort les résultats suivants :

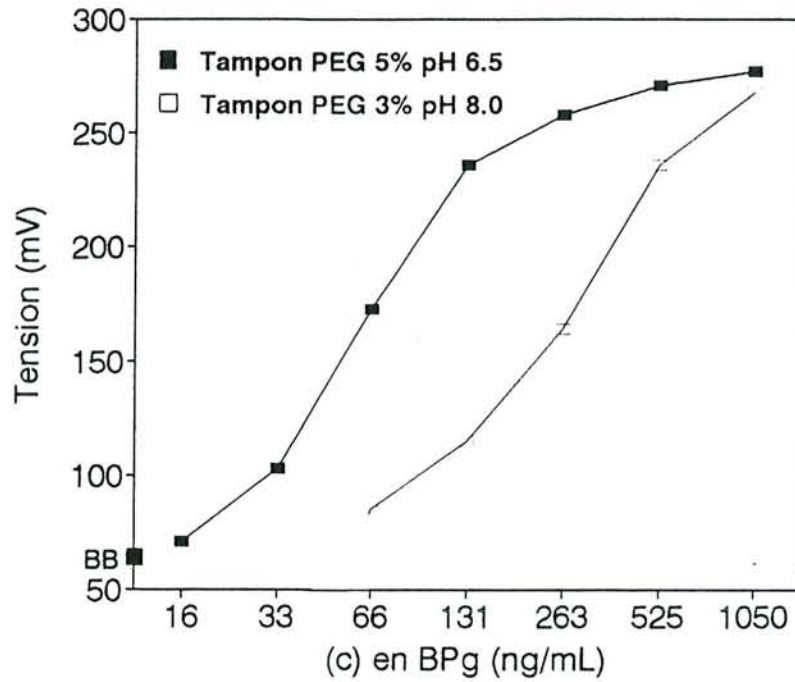
- La fidélité inter-essais de l'étalonnage présente des variations qui restent inférieures à 5% sur tous les points de la gamme.
- La récupération moyenne de surcharges par du BPg est de 102%.
- La fidélité sur des échantillons de concentration haute, moyenne et basse fournit des CV inférieurs à 4% (intra-essai) ou 5% (inter-essais).

D/ Conclusions sur le dosage inter-espèces

En partant d'un dosage de sensibilité moyenne (environ 80 ng/mL), et en faisant varier les paramètres de la réaction, le dosage final est amélioré en sensibilité (seuil de détection de 20 ng/mL) et permet de doser 30 ng de BPg par mL de milieu de réaction.

Il faut rester prudent quant à l'utilisation du PEG pour optimiser la réaction; cet additif accélère l'agglutination spécifique mais aussi aspécifique et limite le volume des agglutinats. Au-delà d'un certain seuil, il peut déstabiliser les MsAc en présence d'As. Dans notre cas, pour des pourcentages de PEG de 3 à 5, bien que le BB reste stable (55 mV), la simple addition de l'As amplifiant agglutine les MsAChPg à hauteur de 100 mV, ramenant le seuil de détection aux valeurs initiales.

On doit de même rejeter les dilutions en AcBPg* inférieures au 1/400, qui, ajoutées aux seules MsDxAChPg, les déstabilisent (89 mV au 1/200, 91 au 1/150, 102 au 1/100, au lieu des 55 mV du BB).



| | BPg | MS | AS | Tampon |
|-------------------------|---|-----------|----------------------------------|-------------------------|
| Dilution | 1/2000 à 1/128000 | 1/40 | 1/400 | Borate pH 6.5 PEG 5% |
| Concentr° finale | 1050 à 16 ng.mL | 100 ug/mL | | Borate pH 8.0 PEG 3% |
| Incubation | 30 min (pré-incubation) + 60 min (incubation) | | | |
| Observation | | | Traitement par Ms-Eth (annexe 3) | |
| Protocole | MsDxAcHPg + BPg + AsBPg* | | | |

FIGURE 4.5: AGGLUTINATION DES MsDxAcHPg PAR LES DILUTIONS D'UNE SOLUTION DE BPg DANS DEUX MILIEUX DE RÉACTION DIFFÉRENTS

Il faut donc, dans de tels systèmes, évaluer avec esprit critique la signification des taux d'agglutination observés.

Le seuil de détection reste néanmoins insuffisant pour doser des échantillons de lait. En effet, avec un tel système, si l'on veut que le signal correspondant à la concentration du BPg dans la cuve se situe en milieu de courbe, les échantillons ne pourront être dilués qu'au 1/40 final. Or, à cette dilution, le milieu lait pose un certain nombre de problèmes pour la mise en oeuvre de la méthode, ne serait-ce que par sa turbidité résiduelle.

L'homologie entre les plasminogènes humain et bovin avait déjà été utilisée pour un dosage ELISA de BPg avec des AHPg (POLITIS et al, 1993). Comme nous venons de le constater, dans le cas de l'INM, le dosage d'échantillons lait n'est pas possible avec ce système. L'ELISA présente l'avantage de s'affranchir de la turbidité du milieu, puisqu'il y a élimination de celui-ci par lavage.

Il est donc indispensable de disposer d'un système plus performant. C'est pourquoi nous avons choisi de mettre au point un système à base d'Ac anti BPg, que nous qualifierons de "mono-espèce".

CHAPITRE 3

**DOSAGE DU PLASMINOGENE BOVIN
EN MILIEU SYNTHETIQUE PAR UN
SYSTEME MONO-ESPECE
D'IMMUNONEPHELEMETRIE
MICROPARTICULAIRE**

CHAPITRE 3 : DOSAGE DU PLASMINOGENE BOVIN EN MILIEU SYNTHETIQUE PAR UN SYSTEME MONO-ESPECE D'IMMUNONEPHELEMETRIE MICROPARTICULAIRE

A/ Introduction

Le moyen le plus probable d'accroître la sensibilité du dosage est alors de construire un système mono-espèce en couplant des Ac anti BPg sur les Ms. De cette façon, nous nous affranchissons de la perte de réactivité d'un système inter-espèces.

B/ Mise au point du dosage du BPg par un système mono-espèce

B.1/ Purification de l'Antisérum anti BPg

L'antisérum anti BPg, utilisé précédemment, ne peut être couplé tel quel, car, en plus des immunoglobulines, toutes sortes de protéines (dont l'albumine, présente en grande quantité) se fixeraient aux Ms.

Il est donc nécessaire d'isoler la fraction immunoglobulinique du sérum. Nous utilisons pour cela une colonne Econo-Pac Sérum IgG[®] (BIORAD), dont le principe et le mode d'emploi sont développés dans la partie Matériel et Méthodes. Cette colonne permet de purifier les IgG de sérums de lapins.

Les fractions récupérées sont concentrées par ultrafiltration sur Centriscart[®] et mélangées. La teneur en protéines du pool, mesurée par la méthode de Bradford, est de 13,05 g/L.

B.2/ Couplage MsDxAcBPg

Les Ms utilisées proviennent du lot 16000. Le couplage se déroule selon le protocole général décrit au chapitre Matériel et Méthodes .

Les MsDxAcBPg dialysées contre le tampon de réaction restent stables au cours de leur conservation à +4°C.

Les MsDxAcBPg dialysées contre le tampon de réaction restent stables au cours de leur conservation à +4°C.

B.3/ Agglutination des MsDxAcBPg en présence de BPg

Les MsDxAcBPg s'agglutinent en présence de BPg, lorsque la réaction est amplifiée par l'AsBPg*, avec un seuil de détection inférieur à 20 ng (figure 5.1). Le système inter-espèce, dans les mêmes conditions, avait un seuil de détection de 80 ng.

Le passage à un système bovin homogène permet un gain d'un facteur 4 par rapport au système inter-espèces initial.

B.4/ Optimisation du système

Un certain nombre de paramètres du dosage, susceptibles d'amplifier l'agglutination des Ms, sont testés de la même façon qu'au chapitre précédent (paragraphe C).

B.4.1/ Variations du pH et du PEG

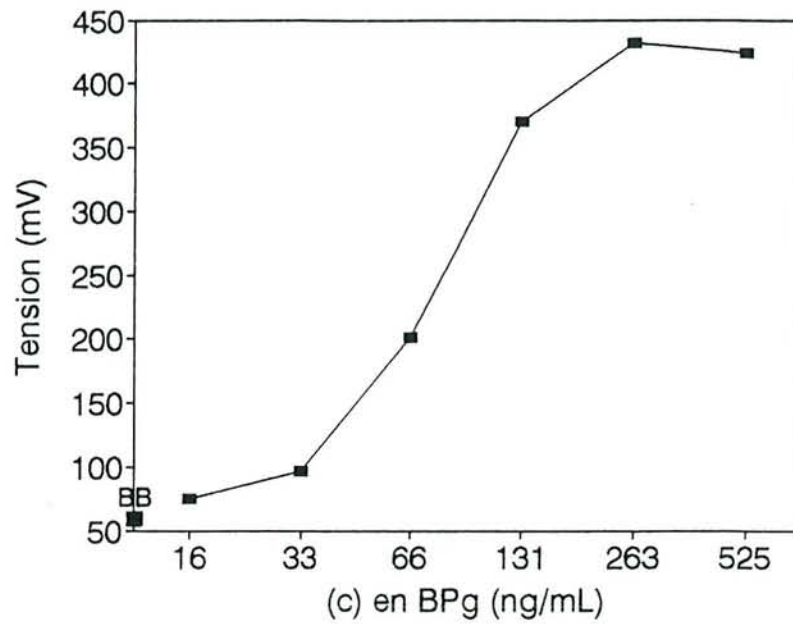
Des variations de 3 à 5% de la teneur du tampon en PEG n'ont aucun effet favorable sur la réaction.

De même, de pH 7 à pH 8, aucune variation significative n'est enregistrée. A pH 6,5, on note une déstabilisation des Ms dans le milieu.

B.4.2/ Origine de l'As amplifiant

Nous avons comparé l'amplification due à l'AsA3* entier, aux fractions IgG de cet As (AcBPg) et à un mélange de ces AcBPg avec des AcHPg.

L'utilisation d'un mélange pourrait se révéler efficace par la complémentarité éventuelle des épitopes reconnus.



| | BPg | MS | AS | Tampon |
|------------------|---|----------|----------------------------------|----------------------------|
| Dilution | 1/4000 à 1/128000 | 1/50 | 1/400 | Borate pH 8.0 PEG 3% |
| Concentr° finale | 525 à 16 ng/mL | 30 µg/mL | | |
| Incubation | 30 min (pré-incubation) + 60 min (incubation) | | | |
| Observation | | | Traitement par Ms-Eth (annexe 3) | |
| Protocole | MsDxAcBPg + BPg + AsBPg* | | | |

FIGURE 5.1: AGGLUTINATION DES MsDxAcBPg PAR LES DILUTIONS D'UNE SOLUTION DE BPg

La figure 5.2 apporte des éléments de réponse : les fractions IgG pures permettent d'améliorer la sensibilité par rapport à l'As entier (et ce quelle que soit sa dilution). L'utilisation d'un mélange humain/bovin se révèle moins satisfaisante que celle d'IgG bovines seules.

L'utilisation de fractions IgG bovines purifiées, à une concentration de 32,5 µg/mL, permet d'abaisser le seuil de détection aux alentours de 5 ng.

B.5/ Protocole retenu et gamme d'étalonnage

Le protocole final est le suivant :

- MsDxAcBPg : dilution finale au 1/40, soit 40 µg/mL
- IgGb : dilution finale au 1/400, soit 32,5 µg/mL
- BPg (2,1 mg/mL) : dilutions de 1/32 000 à 1/51

- Etape I :
 - 30µLMsDxAcBPg(1/4)
 - 30µL BPg(1/3 200 à 1/51 200)
 - 140µL Tampon de réaction

- Incubation : 30 minutes

- Etape II :
 - 30µL IgGb(1/40)
 - 70µL Tampon de réaction

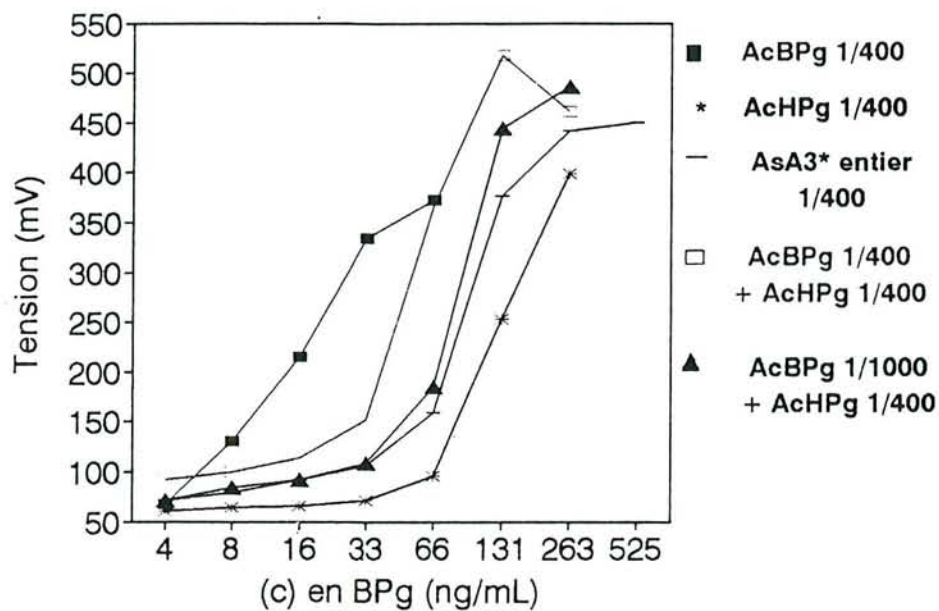
- Lecture : 60 minutes

La gamme d'étalonnage s'étend de 4 à 66 ng/mL, pour un seuil de détection d'environ 5 ng/mL.

C/ Validation du dosage

C.1/ Tests de surcharge

Avec le protocole ainsi mis au point, on dose une solution de BPg pure (7.1 ng/mL) et surchargée par des quantités croissantes de BPg (2, 4, 8, 16 et 32,8 ng/mL).



| | BPg | MS | AS | Tampon |
|-------------------------|--|----------|----|----------------------------|
| Dilution | 1/4000 à 1/512000 | 1/50 | | Borate pH 8.0 PEG 3% |
| Concentr° finale | 525 à 4 ng/mL | 80 ug/mL | | |
| Incubation | 30 min (pré-incubation) + 60 min (incubation) | | | |
| Protocole | MsDxAcBPg + BPg + AcBPg (1/400) ↓ + AcHPg (1/400) + AsBPg* (1/400) + AcBPg (1/400) + AcHPg (1/400) + AcBPg (1/1000) + AcHPg (1/400) | | | |

FIGURE 5.2: AGGLUTINATION DES MsDxAcBPg PAR LES DILUTIONS D'UNE SOLUTION DE BPg EN PRESENCE DE DIFFERENTS Ac AMPLIFIANTS

Les résultats sont indiqués dans la figure 5.3.

L'équation de la droite de régression linéaire est :

$$Y = 0,94X + 0,80 \text{ et } r = 0,999 \text{ (} p < 0,001 \text{)}.$$

La moyenne des récupérations est de 102%.

La récupération est linéaire entre 7 et 40 ng/mL et les valeurs mesurées sont corrélées à 99,9% aux valeurs théoriques.

C.2/ Etudes de répétabilité

Seule la répétabilité intra-essais a été testée. Trois échantillons de BPg, de concentration haute, moyenne et basse sur la courbe d'étalonnage, ont été dosés 10 fois avec le même étalonnage. Les résultats sont indiqués dans le tableau 5.1.

Tableau 5.1: Fidélité intra-essai du dosage mono-espèce du BPg

| | <u>n</u> | <u>Conc.mesurée</u> ng/mL | <u>Ecart-type</u> ng/mL | <u>CV</u> % |
|--------------------|----------|------------------------------|----------------------------|----------------|
| BPg "haut" | 10 | 59 | 2,1 | 3,5 |
| BPg "moyen" | 10 | 31 | 0,9 | 2,9 |
| BPg "bas" | 10 | 15 | 0,6 | 4,1 |

La fidélité du dosage est satisfaisante, les CV étant inférieurs à 5% sur toute la courbe, notamment en milieu de courbe où il est inférieur à 3%.

D/ Spécificité du dosage vis-à-vis des protéines du lactosérum

Nous avons testé le système de façon à vérifier l'absence de réaction croisée entre le BPg utilisé et les principales protéines du lactosérum (figure 5.4).

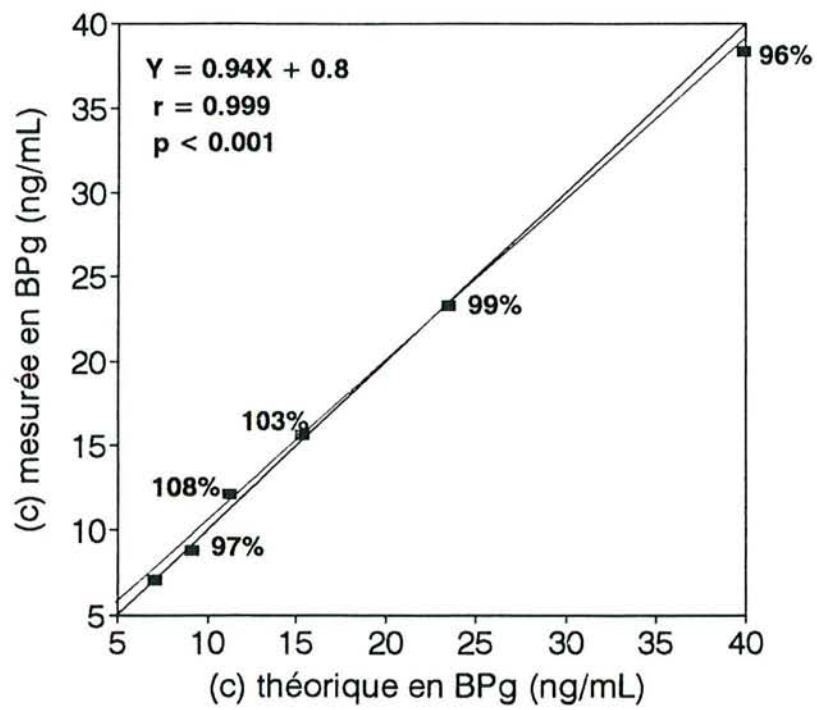
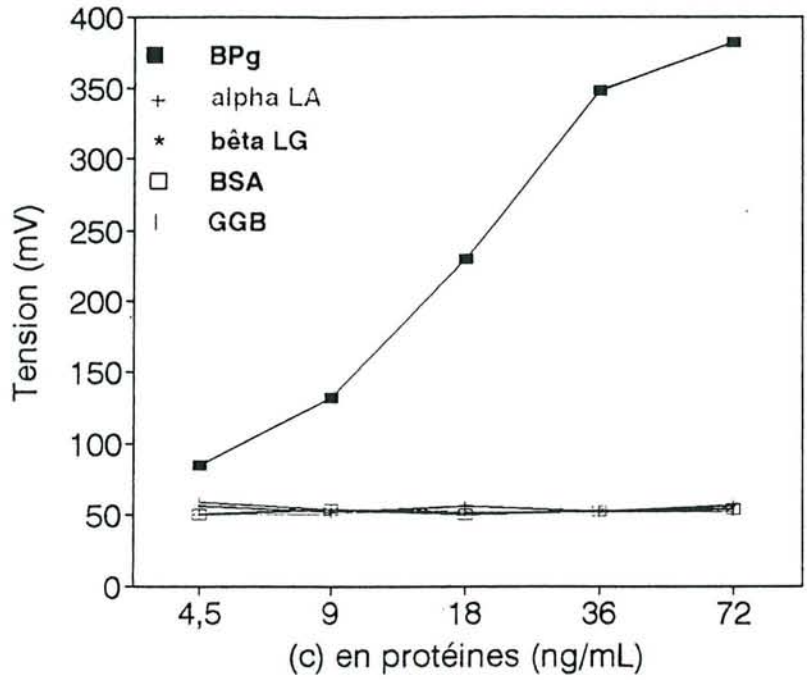


FIGURE 5.3: RECUPERATION DES SURCHARGES D'UNE SOLUTION DE BP_g PAR DU BP_g



| | BPG étalon | Protéines | MS | AS | Tampon |
|------------------|---|------------------|----------|----------|-------------------------|
| Dilution | 1/50 à 1/800 | 1/500 à 1/8000 | 1/50 | 1/400 | Borate pH 8.0 PEG 3% |
| Concentr° finale | 72 à 4.5 ng/mL | 2000 à 125 ng/mL | 80 ug/mL | 33 ug/mL | |
| Incubation | 30 min (pré-incubation) + 60 min (incubation) | | | | |
| Protocole | MsDxAcBPg + BPg alpha Lactalbumine bêta Lactoglobuline + AcBPg Albumine sérique bovine gamma Globuline bovine | | | | |

FIGURE 5.4: SPECIFICITE DU DOSAGE DU BPg PAR INM VIS-A-VIS DES PROTEINES DU LACTOSERUM

Nous n'observons aucune agglutination des MsDxAcBPg en présence d' α lactalbumine, de β lactoglobuline, d'albumine sérique bovine et de γ globulines bovines

E/ Réaction croisée avec la plasmine.

Nous avons dosé par notre système de la plasmine bovine en solution à 10 $\mu\text{g/mL}$. En référence à l'étalon BPg, la valeur obtenue pour la plasmine est de 2 $\mu\text{g/mL}$.

Il y a un facteur 5 entre la valeur réelle de la plasmine et la valeur mesurée par INM en référence à un étalon BPg.

F/ Conclusions

Le passage d'un système inter-espèces utilisant la réaction croisée entre les plasminogènes humain et bovin à un système mono-espèce entièrement bovin permet un gain du seuil de détection d'un facteur 4.

Au vu de la teneur moyenne du plasminogène dans le lait bovin, les échantillons pourront être dilués au 1/200 final. Une telle dilution en milieu sérique peut provoquer une interférence sur les réactifs microparticulaires. Qu'en est-il en milieu lait? D'autant que dans ce cas, la turbidité propre du milieu peut aussi interférer avec le dosage. L'influence du milieu lait sur le comportement des Ms polyacryliques doit donc être étudiée.

CHAPITRE 4

**INFLUENCE DU MILIEU LAIT SUR LE
COMPORTEMENT DES Ms
POLYACRYLIQUES. ETUDE SUR UN
MODELE DE Ms SENSIBILISEES PAR
DES IgG BOVINES**

CHAPITRE 4 : INFLUENCE DU MILIEU LAIT SUR LE COMPORTEMENT DES Ms POLYACRYLIQUES ETUDE SUR UN MODELE DE Ms SENSIBILISEES PAR DES IgG BOVINES

A/ Introduction

Les Ms polyacryliques synthétisées au laboratoire d'Immunologie présentent un certain nombre de propriétés qui en font le support de choix dans le cadre d'une utilisation en INM (cf. chapitre Matériel et Méthodes).

Elles sont notamment hydrophiles, grâce à des fonctions hydroxyles apportées par le 2-hydroxy éthyl méthacrylate (HEMA), et chargées négativement, par la fonction acide de l'acide méthacrylique (MA). Cette dernière est la garantie d'une bonne stabilité des Ms, évitant qu'elles ne s'agglutinent spontanément entre elles.

La grande sensibilité de cette méthode, de l'ordre du nanogramme par mL, permet de hautes dilutions des échantillons dans un tampon de réaction, étudié de façon à optimiser l'agglutination spécifique des Ms vis-à-vis de l'antigène ou de l'anticorps à doser.

L'avantage de l'INM est donc, dans le cas de molécules suffisamment concentrées, de pouvoir s'affranchir de toute influence du milieu biologique de départ.

Lorsque les molécules sont à des concentrations de l'ordre du nanogramme au microgramme par mL, les dilutions n'excéderont pas 1/1000, ce qui sera quelque fois insuffisant pour éliminer tous les facteurs susceptibles d'influencer la stabilité des Ms.

Suivant l'origine du milieu biologique, à de faibles dilutions, les Ms pourront subir une agglutination non spécifique ou au contraire une stabilisation excessive.

Un certain nombre d'influences ont été étudiées et sont maintenant bien cernées pour les Ms:

- Les pH acides provoquent une agglutination aspécifique des Ms en suspension

par diminution de leur charge; un pH neutre ou légèrement basique permet de conserver leur stabilité (pH 7 à 8,5). Un pH trop alcalin (>12) produit une hydrolyse des esters des Ms.

- Une force ionique trop élevée du milieu peut aussi provoquer une agglutination des Ms. Les tampons de réaction utilisés ont habituellement une force ionique faible (Phosphate ou Borate 0,05M).

- Certaines protéines du milieu biologique à doser se sont révélées agglutinantes pour les Ms: elles les déstabilisent en s'adsorbant à leur surface. La fibronectine, certains facteurs du complément (en particulier le C1q) et une partie des IgG sont capables d'agglutiner ainsi des Ms (CLIQUET et al, 1993).

Le sérum peu dilué est responsable d'agglutinations aspécifiques des Ms; on sait maintenant que ce sont les protéines répertoriées ci-dessus qui sont à l'origine de ces phénomènes dans le sérum. Un traitement adéquat (à base de Ms-Ethanolamine: MS-Eth) a été mis au point pour éliminer cette interférence dans le dosage (CLIQUET et al, 1993).

L'urine peut stabiliser les Ms de façon excessive. Dans ce cas, c'est l'environnement ionique qui est en cause; il suffit alors de modifier les conditions du dosage pour s'en affranchir (BESSOU, 1985).

La sensibilité des Ms à ces phénomènes dépend aussi de la molécule qui leur est couplée (taille, charge, hydrophilie). Les MsAg peuvent réagir différemment d'un Ag à l'autre pour un lot identique de Ms. C'est pourquoi nous avons choisi un modèle de Ms sensibilisées par des IgG bovines (MSIgGb), qui pourra être extrapolé à n'importe quel anticorps, plutôt qu'un couple MSAg particulier dont on ne pourrait tirer aucune règle générale.

B/ Etude de l'influence du lait sur l'agglutination des MslgGb

B.1/ Modèle utilisé

Nous utilisons un modèle de Ms sensibilisées par des IgG bovines. En effet, l'utilisation de Ms sensibilisées par des Ac d'origine léporine pourrait être perturbée par

l'éventuelle présence d'Ac anti espèce dans le lait bovin. Dans ce chapitre, mise à part dans l'expérimentation qui permet de constater l'existence du phénomène, les protéines qui interviennent sont d'origine bovine.

Ce système a été développé hors du cadre de cette thèse et a donné lieu à deux applications : le dosage des IgG de lait de vache et la mise au point d'un dosage d'adultération de laits de chèvre par du lait de vache. Cette mise au point servira de base à l'étude des interférences du milieu.

Les IgG bovines sont couplées à des Ms 16000 selon le protocole développé par MONTAGNE et al (1991). Il s'agit d'un co-couplage avec de l'albumine sérique humaine (Annexe 2). Les MslgGb sont conservées en tampon borate 0,05M pH 8,0.

Le protocole de dosage repose sur une inhibition de l'agglutination des MslgGb en présence d'Ac anti IgGb (AclgGb) par les IgGb d'un lait :

- Etape 1 : Echantillon IgGb + AclgGb
- Pré-incubation: 30 minutes
- Etape 2 : + MslgGb
- Lecture à 60 minutes d'incubation

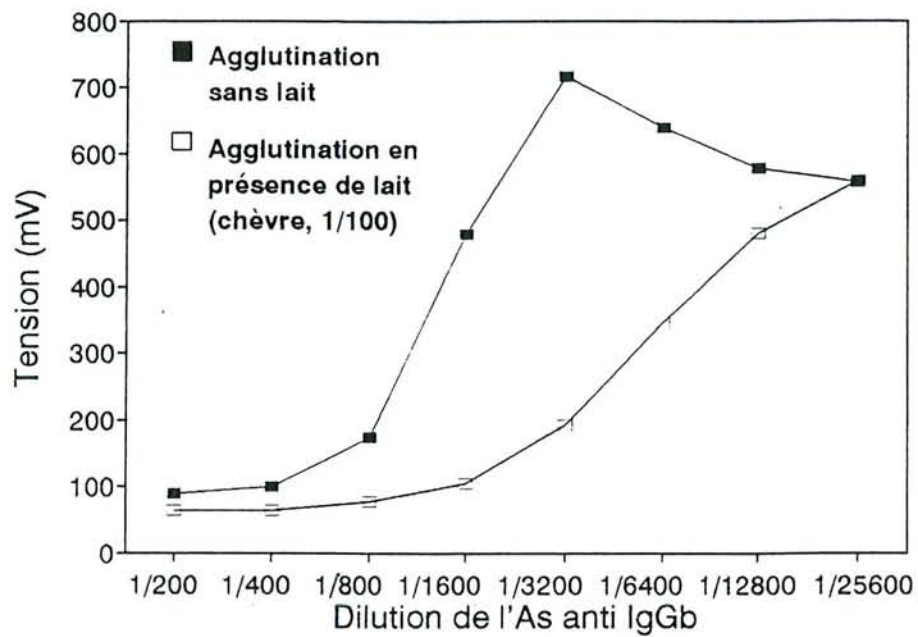
Le milieu de réaction est du borate 0,05M pH 8,0 , spécialement optimisé pour les dosages en milieu lait.

Tous les laits utilisés comme agent inhibant sont délipidés au préalable par du trichlorotrifluoroéthane (annexe 3).

B.2/ Stabilisation des MslgGb en présence de lait

Nous avons comparé l'agglutination des MslgGb par les AclgGb en milieu de réaction seul et en présence de lait de chèvre (au 1/100 final).

La figure 6.1 met en évidence une influence du milieu lait sur les MslgGb : il y a un décalage de 2 à 3 dilutions de raison 2 entre les deux courbes.



| | Lait chèvre | MS | AS |
|-------------------------|-------------------------------|-----------|------------------|
| Dilution | 1/100 | 1/100 | 1/200 à 1/25600 |
| Concentr° finale | | 100 ug/mL | 12500 à 98 ug/mL |
| Incubation | 60 minutes | | |
| Protocole | MsigGb + AcIgGb + lait chèvre | | |

FIGURE 6.1: AGGLUTINATION DES MsIgGb PAR LES AcIgGb EN PRESENCE OU NON DE LAIT DE CHEVRE

Le degré d'agglutination n'est donc pas seulement fonction de la quantité d'AclgGb, mais aussi de la présence de lait dans le milieu.

Il est vraisemblable que ce phénomène présente des variations individuelles d'un lait à l'autre, si l'on se réfère à l'exemple du sang. Pour le vérifier, nous avons provoqué l'agglutination des MslgGb par les AclgGb en présence de 15 laits individuels de chèvres (figure 6.2): les valeurs extrêmes sont séparées de 49 mV.

De ce fait, l'inhibition consécutive sera faussée par la seule présence de lait dans le milieu, et cette erreur sera d'autant moins maîtrisable que les échantillons présenteront des variations individuelles non prédictibles.

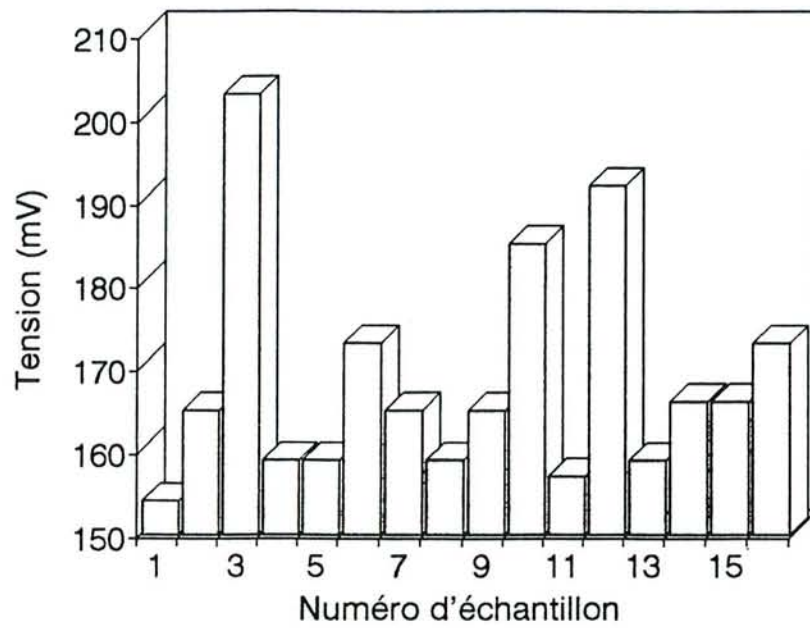
L'inhibition de l'agglutination des MslgGb/AclgGb par un lait de vache est la résultante de l'inhibition spécifique et du phénomène de stabilisation des Ms. L'inhibition observée avec un lait de chèvre ne correspond qu'au phénomène aspécifique de stabilisation des réactifs microparticulaires (figure 6.3).

Le dosage des IgGb dans le lait de vache n'est pas affecté par ce phénomène, puisque les échantillons sont dilués au 1/10 000, mais pour des dilutions inférieures, par exemple lors de la recherche d'IgGb dans des laits de chèvre (adultération des laits) où la dilution ne devra pas excéder 1/200, celui-ci sera perturbé.

Le lait influe sur la stabilité des Ms, puisque les MslgGb sont stabilisées en milieu lait peu dilué.

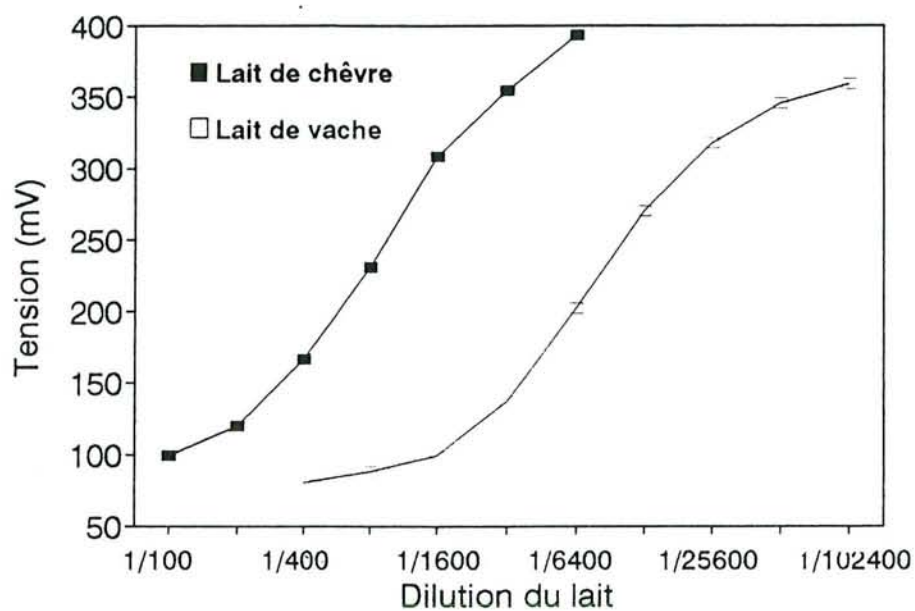
B.3/ Origine du phénomène

Le ou les facteurs responsables de ce phénomène seront identifiés en étudiant les modifications de l'agglutination en présence de chacune des principales protéines du lait ou des composants de son environnement minéralo-ionique.



| | Lait chèvre | MS | AS |
|-------------------------|-----------------------------|-----------|-----------|
| Dilution | 16 laits de chèvre 1/100 | 1/100 | 1/5000 |
| Concentr° finale | | 100 ug/mL | 500 ng/mL |
| Incubation | 60 minutes | | |
| Protocole | MsigGb + AcIgGb | | |

FIGURE 6.2: AGGLUTINATION DES MsIgGb PAR LES AcIgGb EN PRESENCE DE LAITS INDIVIDUELS DE CHEVRE



| | Laits | MS | AS |
|-------------------------|---|-----------|-----------|
| Dilution | 1:100 a 1:102400 | 1/100 | 1/5000 |
| Concentr° finale | | 100 ug/mL | 500 ng/mL |
| Incubation | 60 minutes | | |
| Protocole | MsIgGb + AclgGb + lait chèvre + lait vache | | |

FIGURE 6.3: INHIBITION DE L'AGGLUTINATION DES MsIgGb PAR UN LAIT DE VACHE OU UN LAIT DE CHEVRE

B.3.1/ Effet des caséines

B.3.1.1/ Caséine totale

En présence de caséine entière à une concentration proche de celle d'un lait (20 mg/mL), les MslgGb agglutinées par les AclgGb sont stabilisées par rapport à un témoin sans caséine (figure 6.4). Il est donc nécessaire d'étudier caséine par caséine quelles sont leurs influences respectives.

B.3.1.2/ Caséines α S, β et κ

On réalise une agglutination MslgGb/AclgGb en présence d'une dilution au 1/100 de solutions de caséines α S, β ou κ à 3 mg/mL, que l'on compare à une agglutination en tampon seul (figure 6.5). On observe une stabilisation par rapport au témoin, mais pas identique pour les trois caséines :

A concentrations égales: caséine κ > caséine α S > caséine β

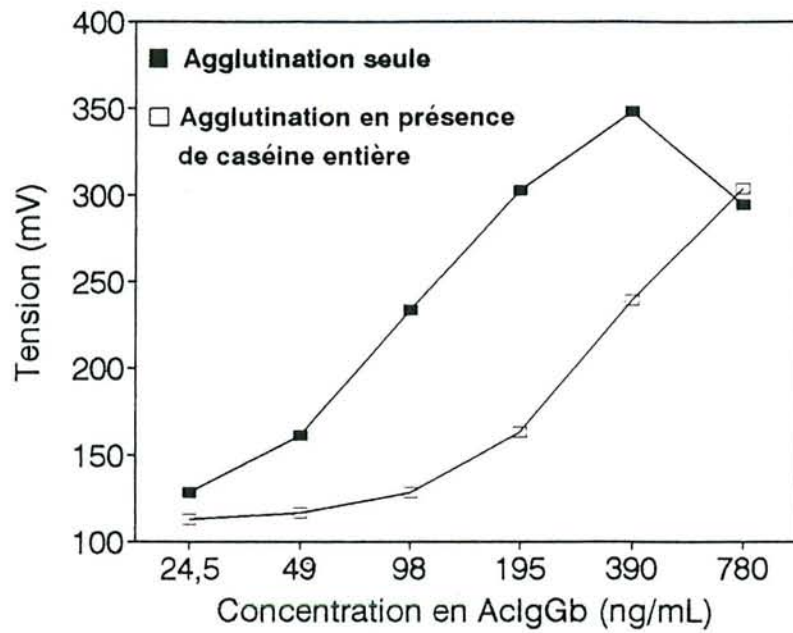
Par contre, pour des concentrations de 3 mg/ml de caséine κ , 7,5 mg/ml de caséine β et 12 mg/ml de caséine α S, l'ordre de stabilisation par les dilutions au 1/100 n'est plus le même (figure 6.6) :

Dans les proportions du lait: caséine α S > caséine β > caséine κ

Il semble donc que, dans le lait, les quantités relatives des trois protéines l'emportent sur leur influence respective pour les Ms.

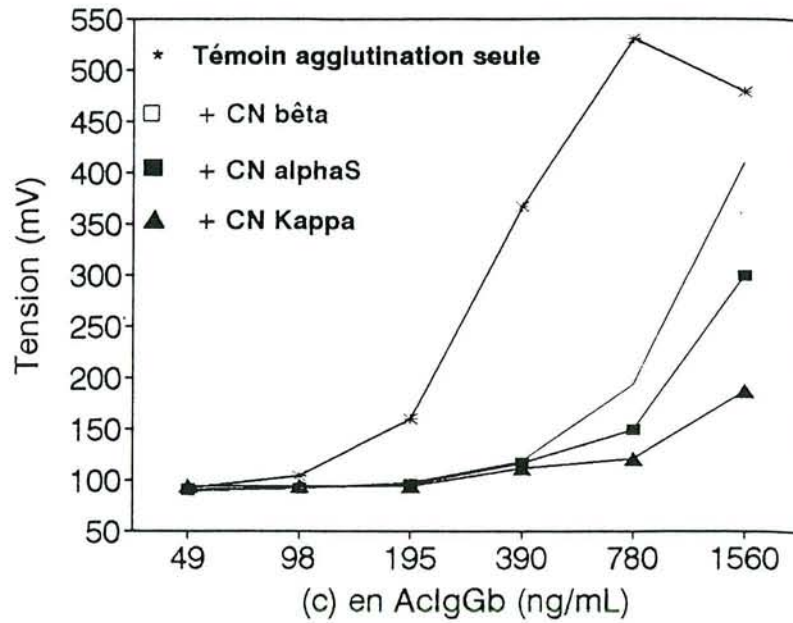
B.3.1.3/ Cinétique du phénomène

Une étude cinétique sur 18 heures a été entreprise pour suivre l'évolution de ce phénomène (à concentration égale en caséine), notamment dans l'espoir d'observer une "levée" de la stabilisation et une tendance à se rapprocher des valeurs du témoin pour des temps plus longs que 60 minutes.



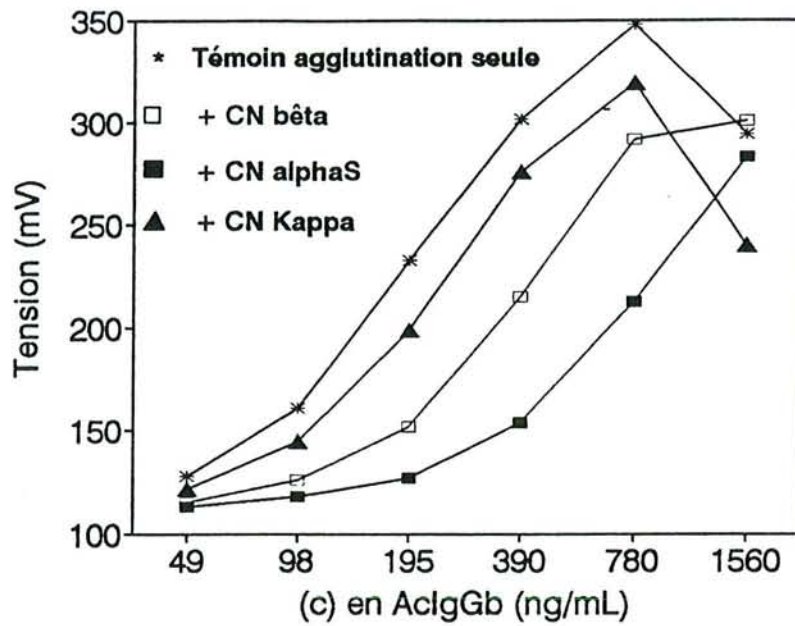
| | Caséine entière | MS | AS |
|-----------------------------|----------------------------------|-----------|-------------------|
| Dilution | 1/100 | 1/100 | 1/3200 à 1/102400 |
| Concentration finale | 200 µg/mL | 100 µg/mL | 780 à 24,5 ng/mL |
| Incubation | 60 minutes | | |
| Protocole | MsiGg + AcIgGg + caséine entière | | |

FIGURE 6.4: AGGLUTINATION DES MsiGg PAR LES AcIgGg EN PRESENCE DE CASEINE ENTIERE



| | CN α S | CN β | CN K | MS | AS |
|-----------------------------|--|------------|----------|-----------|------------------|
| Dilution | 1/100 | 1/100 | 1/100 | 1/100 | 1/1600 à 1/51200 |
| Concentration finale | 30 ug/mL | 30 ug/mL | 30 ug/mL | 100 ug/mL | 1560 à 49 ng/mL |
| Incubation | 60 minutes | | | | |
| Protocole | MsigGb + AcIgGb + CN alphaS + CN bêta + CN kappa | | | | |

FIGURE 6.5: INFLUENCE DES CASEINES α S, β ET κ A CONCENTRATION EGALE SUR L'AGGLUTINATION DES MsIgGb PAR LES AcIgGb



| | CN S | CN B | CN K | MS | AS |
|-----------------------------|--|----------|----------|-----------|------------------|
| Dilution | 1/100 | 1/100 | 1/100 | 1/100 | 1/1600 à 1/51200 |
| Concentration finale | 120 ug/mL | 75 ug/mL | 30 ug/mL | 100 ug/mL | 1560 à 49 ng/mL |
| Incubation | 60 minutes | | | | |
| Protocole | MsIgGb + AcIgGb + CN alphaS + CN bêta + CN kappa | | | | |

FIGURE 6.6: INFLUENCE DES CASEINES α S, β ET κ AUX CONCENTRATIONS DU LAIT SUR L'AGGLUTINATION DES MsIgGb PAR LES AcIgGb

Malheureusement, la figure 6.7 montre que le phénomène, bien que diminuant, stagne à un certain palier, éloigné du témoin.

La caséine κ est, des trois caséines, celle dont l'influence évolue le moins dans le temps, indiquant que l'équilibre entre la forme libre et la forme liée aux Ms est très rapidement atteint.

B.3.1.4/ Effet du Caséinomacroglycopeptide

Le Caséinomacroglycopeptide (CMP) est la partie C-terminale, hydrophile et de charge nette négative élevée, de la caséine κ .

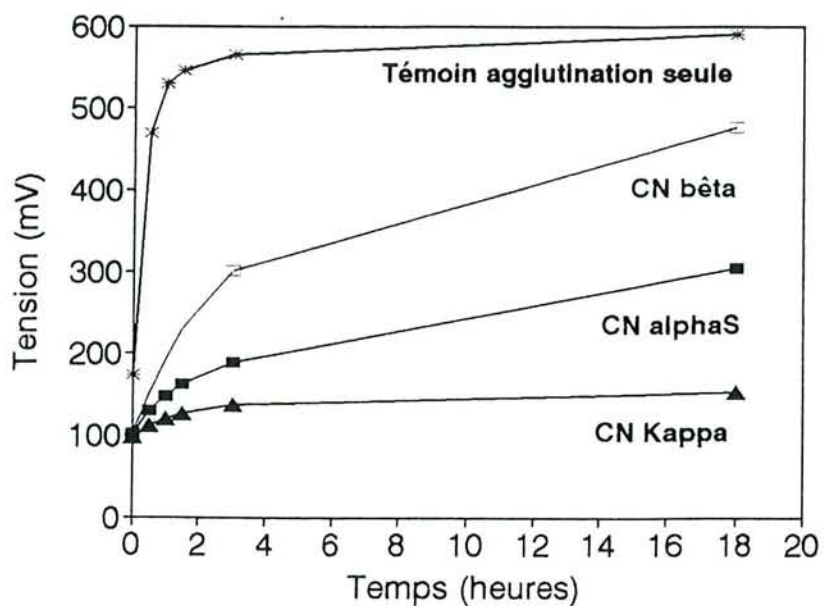
En présence de différentes dilutions de CMP, l'agglutination MslgGb/AclgGb n'est pas modifiée par rapport au témoin, alors que la caséine κ entière la stabilise fortement (figure 6.8).

Ces résultats permettent d'envisager l'hypothèse suivante: les Ms possèdent un gradient d'hydrophilie qui augmente du centre vers la surface. En effet, les différents monomères ont une cinétique de polymérisation différente. L'acide méthacrylique, qui est le plus long à se polymériser, doit donc constituer un enrobage plus chargé de la matrice centrale hydrophobe.

La caséine κ , quant à elle, possède une partie C-terminale hydrophile chargée négativement et une partie N-terminale hydrophobe.

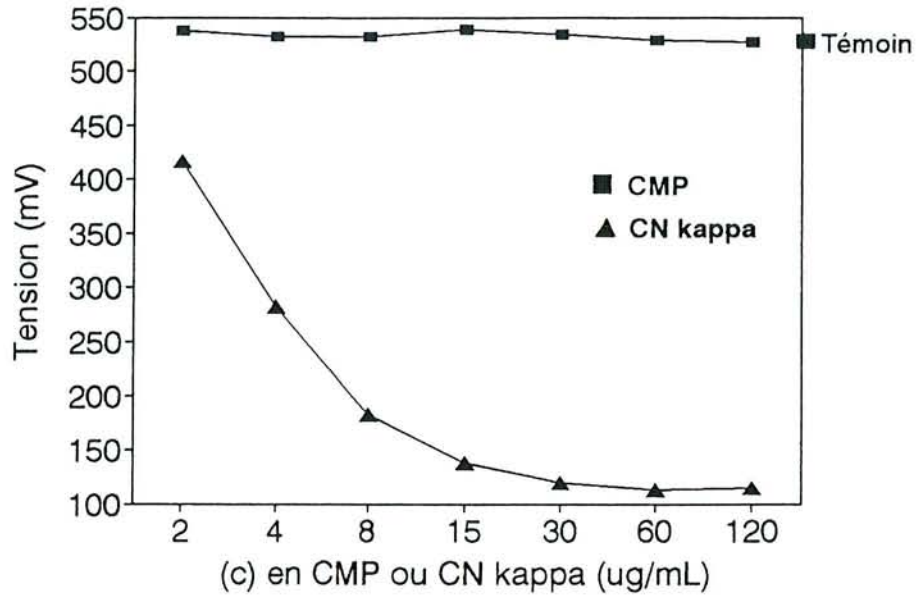
Ainsi, il pourrait se produire des interactions hydrophobes entre la partie N-terminale de la caséine κ et la matrice interne de la Ms; la partie hydrophile de la caséine, restant à l'extérieur, augmenterait fortement les charges négatives de surface, donc la stabilité de l'ensemble (figure 6.9) :

Figure 6.9: Hypothèse du mécanisme de stabilisation des Ms par la caséine κ



| | CN α S | CN β | CN K | MS | AS |
|--|---|-------------|-------------|-----------|--------------|
| Dilution | 1/100 | 1/100 | 1/100 | 1/100 | 1/6400 |
| Concentr^o finale | 30 ug/mL | 30 ug/mL | 30 ug/mL | 100 ug/mL | 390 ng/mL |
| Incubation | 3 min 45 sec à 18 heures | | | | |
| Protocole | MsigGb + AclgGb + CN alphaS + CN bêta + CN kappa | | | | |

FIGURE 6.7: CINETIQUE DE LA REACTION D'AGGLUTINATION DES MsIgGb PAR LES AcIgGb EN PRESENCE DE CASEINE α S, β OU κ



| | CMP | CN kappa | MS | AS |
|-------------------------|----------------------------------|------------------|-----------|-----------|
| Dilution | 1/25 a 1/1600 | 1/25 a 1/1600 | 1/100 | 1/6400 |
| Concentr° finale | 120 a 2 ug/mL | 120 a 2 ug/mL | 100 ug/mL | 390 ng/mL |
| Incubation | | | | |
| Protocole | MsigGb + AcIgGb + CN kappa + CMP | | | |

FIGURE 6.8: INFLUENCE DE LA CASEINE κ ET DU CMP SUR L'AGGLUTINATION DES MsIgGb PAR LES AcIgGb

B.3.2/ Effet du lactosérum

Pour déterminer l'effet du lactosérum, nous avons étudié séparément l'effet des sels minéraux et celui des protéines solubles.

B.3.2.1/ Protéines du lactosérum

Les principales protéines du lactosérum (α lactalbumine, β lactoglobuline et albumine sérique bovine), solubilisées aux concentrations du lait, sont introduites à une dilution de 1/100 lors de l'agglutination MslgGb/AclgGb: celle-ci n'est pas perturbée par leur présence (figure 6.10).

Les protéines du lactosérum n'ont aucune influence sur la stabilité des Ms.

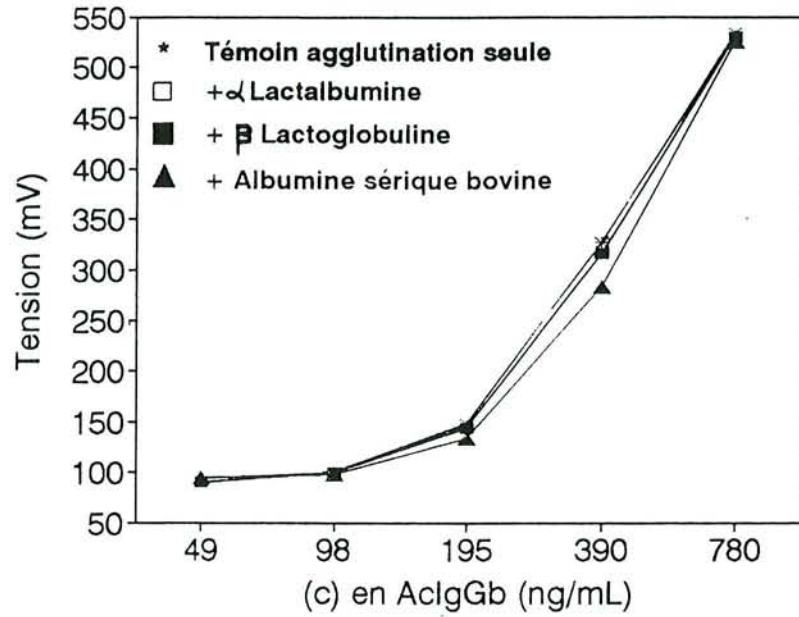
B.3.2.2/ Environnement minéral du lait

Le milieu défini par JENNESS et KOOPS en 1962 reconstitue la phase minéralo-ionique du lait (sa composition est rappelée en annexe 1). Ce milieu, dilué au 1/100, n'a aucune influence sur la stabilité des MslgGb (figure 6.11).

L'environnement ionique du lait n'est pas responsable de la stabilisation des Ms.

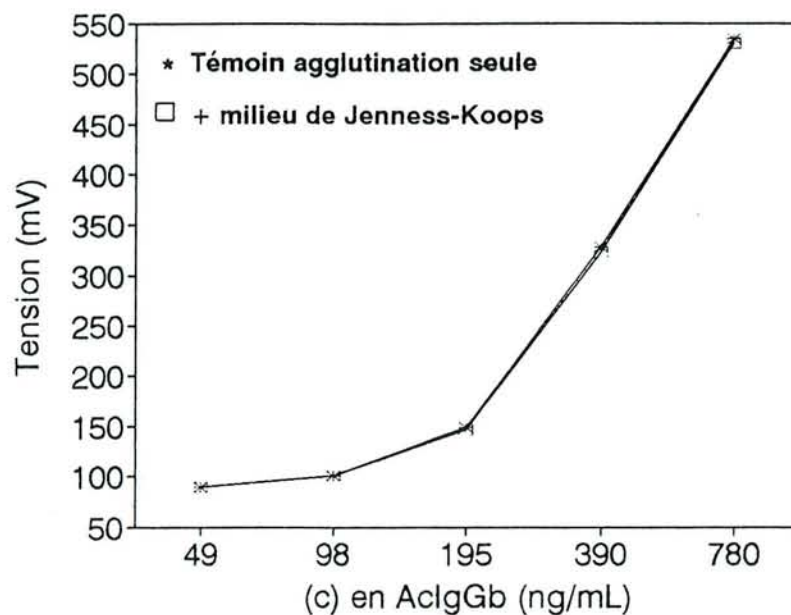
B.3.3/ Conclusion

Le phénomène de stabilisation des MslgGb par le lait est lié exclusivement à la présence des caséines. Les trois types sont impliqués, mais avec des influences différentes.



| | α LA | β LG | BSA | MS | AS |
|-------------------------|--|----------|-----------|-----------|-------------------|
| Dilution | 1/100 | 1/100 | 1/100 | 1/100 | 1/3200 à 1/102400 |
| Concentr° finale | 12 ug/mL | 27 ug/mL | 2.5 ug/mL | 100 ug/mL | 780 à 49 ng/mL |
| Incubation | 60 minutes | | | | |
| Protocole | +α Lactalbumine MslgGb + AcIgGb + β Lactoglobuline + Albumine bovine sérique | | | | |

FIGURE 6.10: INFLUENCE DES PROTEINES DU LACTOSERUM SUR L'AGGLUTINATION DES MslgGb PAR LES AcIgGb



| | Milieu de JENNESS-KOOPS | MS | AS |
|-----------------------------|--|-----------|------------------|
| Dilution | 1/100 | 1/100 | 1/3200 à 1/51200 |
| Concentration finale | | 100 ug/mL | 780 à 49 ng/mL |
| Incubation | 60 minutes | | |
| Protocole | MsigGb + AcIgGb + Milieu JENNESS-KOOPS | | |

FIGURE 6.11: INFLUENCE DU MILIEU DE JENNESS ET KOOPS SUR L'AGGLUTINATION DES MsIgGb PAR LES AcIgGb

Nous allons donc tenter d'éliminer ce phénomène, de façon à pouvoir doser des protéines faiblement concentrées dans des laits peu dilués. Il existe tout un éventail de possibilités, toutefois nous privilégierons dans un premier temps celles n'impliquant pas de séparation des phases du lait.

C/ Traitement du phénomène de stabilisation

C.1/ Traitement sans séparation de phase: utilisation d'un agent déstabilisant.

Comme nous l'avons indiqué dans l'introduction, les sérums faiblement dilués sont capables de provoquer une déstabilisation des Ms.

Nous disposons d'un sérum de chèvre (aimablement fourni par Diagnostics Pasteur) dépourvu de réaction croisée avec l'As antiIgGb, lui-même de provenance caprine. Nous allons utiliser ce sérum pour tenter d'annihiler la stabilisation induite par les caséines, de façon à ce que l'agglutination obtenue en sa présence soit proche de celle du témoin.

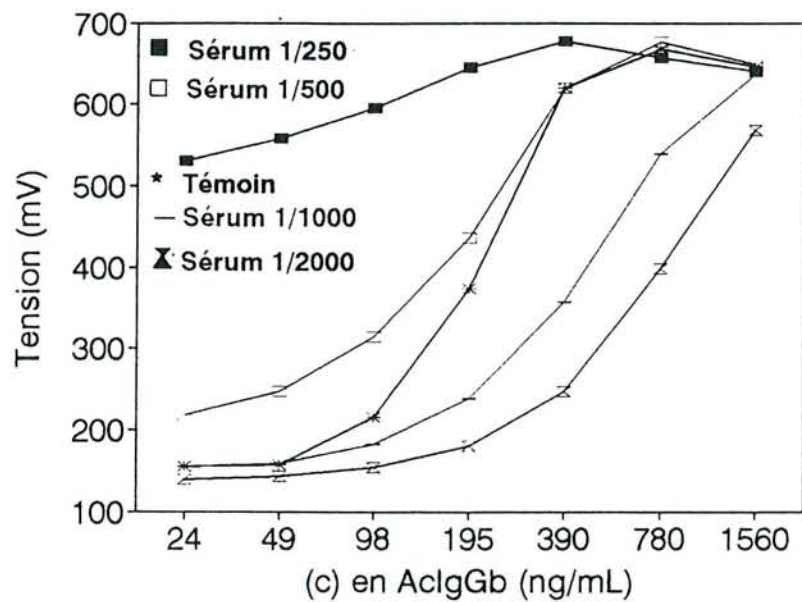
C.1.1/ Agglutination des MslgGb dans le lait de chèvre en présence de sérum de chèvre.

Différentes dilutions du sérum de chèvre sont testées, de façon à déterminer celle qui permettra d'obtenir une agglutination proche du témoin, tout en gardant un témoin Ms (BB) stable.

La figure 6.12 montre l'effet déstabilisant du sérum de chèvre sur l'agglutination en milieu lait: dilué au 1/250 et 1/500, le sérum agglutine trop les Ms, et déstabilise le BB. La dilution du sérum au 1/1000 permet d'estomper l'effet des caséines et de se rapprocher des valeurs du témoin. C'est elle que nous choisirons pour la suite de l'étude.

C.1.2/ Inhibition du système d'agglutination

Dans le modèle choisi, si l'on prend l'exemple d'un dosage d'IgG bovines dans un lait caprin, une adultération à 1% correspond à une concentration en Immunoglobulines G de 5 µg/mL de lait. La dilution d'un tel échantillon, au vu de la sensibilité du système, n'excède donc pas 1/200.



| | Lait chèvre | Sérum chèvre | MS | AS |
|-------------------------|--|----------------|-----------|-------------------|
| Dilution | 1/100 | 1/250 à 1/2000 | 1/100 | 1/1600 à 1/102400 |
| Concentr° finale | | | 100 ug/mL | 1560 à 24 ng, mL |
| Incubation | 60 minutes | | | |
| Protocole | MslgGb + AcIgGb + lait + sérum (1/250) + lait + sérum (1/500) + lait + sérum (1/1000) + lait + sérum (1/2000) | | | |

FIGURE 6.12: INFLUENCE D'UN SERUM DE CHEVRE SUR L'AGGLUTINATION DES MsIgGb PAR LES AcIgGb

La gamme d'étalonnage est constituée de mélanges de laits de vache et de chèvre en proportions variables (0 à 100%) et dont la dilution finale correspond à celle des échantillons.

Les conditions opératoires sont les suivantes:

- Gamme d'étalonnage de 0 à 100% d'adultération au 1/200
- AclgGb au 1/5000
- Sérum de chèvre au 1/1000
- MslgGb au 1/100

L'étape 1 consiste en la mise en réaction de la gamme d'étalonnage et des MslgGb, suivie d'une incubation de 30 minutes. Puis on ajoute dans une deuxième étape les AclgGb et le sérum de chèvre.

La figure 6.13 montre la courbe obtenue dans ces conditions: on observe une inhibition totale pour 50% d'adultération et une inhibition partielle jusqu'à 0,2% d'adultération (92% de l'agglutination totale, soit 16 mV d'écart), la signification de ce dernier point étant à démontrer.

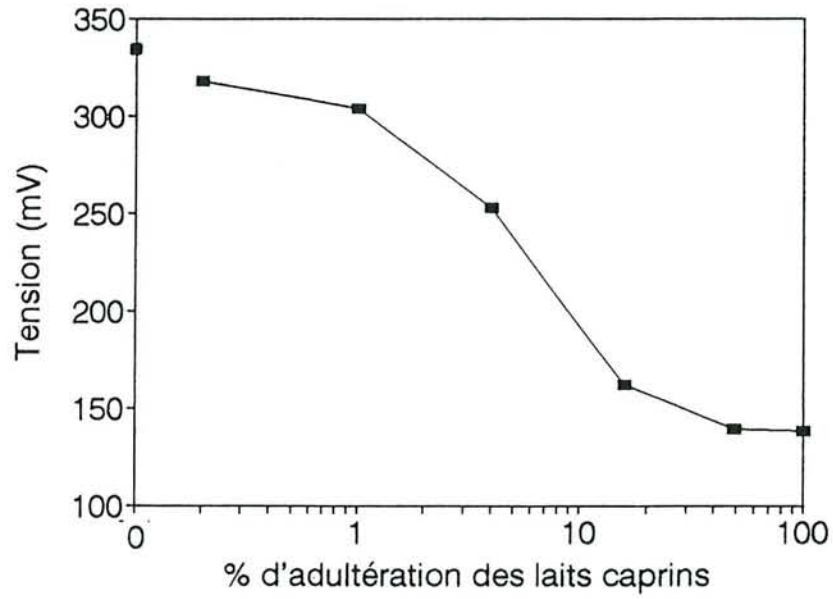
Un tel système permet donc d'évaluer une quantité d'IgG en présence de fortes quantités de caséines.

C.1.3/ Etude de récupération des IgGb dans un tel système

Différentes quantités d'IgGb sont ajoutées à un lait à 1% d'adultération. Celui-ci est alors dosé avec le protocole que nous venons d'établir et les valeurs obtenues sont comparées à celles attendues.

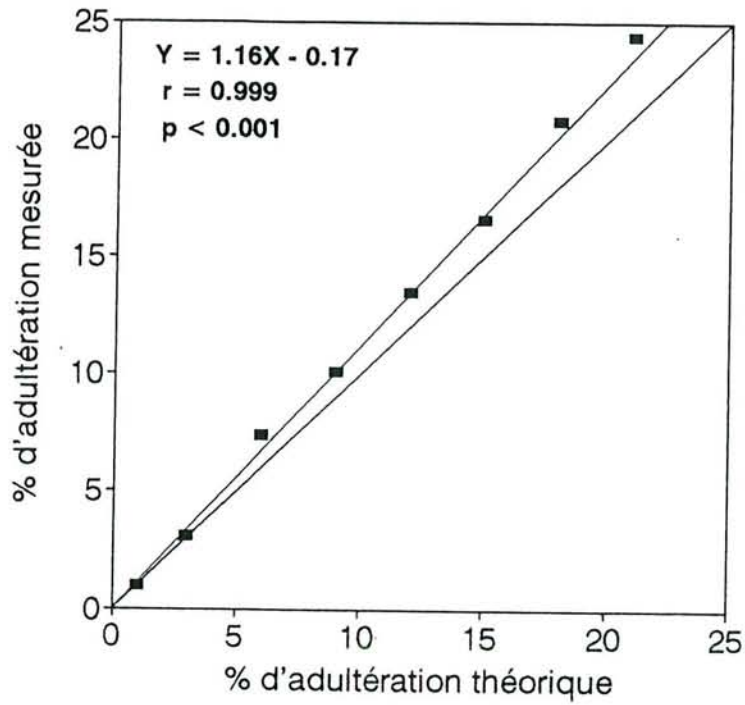
La récupération moyenne est de 112%. L'équation de la droite de régression linéaire est $Y = 1,16X - 0,17$ et $r = 0,999$ ($p < 0,001$) (figure 6.14).

Le système proposé dose spécifiquement les IgGb dans les laits fraudés, la pente de la droite de régression linéaire étant proche de 1.



| | Lait chèvre + vache | Sérum chèvre | MS | AS |
|-----------------------------|---|--------------|-----------|-----------|
| Dilution | 1/100 | 1/1000 | 1/100 | 1/5000 |
| Concentration finale | 0 à 100% d'adultération | | 100 ug/mL | 500 ng/mL |
| Incubation | 60 minutes | | | |
| Protocole | MsigGb + AcIgGb + IgGb (adultération laits) | | | |

FIGURE 6.13: INHIBITION DE L'AGGLUTINATION DES MsIgGb PAR UNE GAMME D'ADULTERATION D'UN LAIT CAPRIN



| Adultér° départ % | Adultér° surcharge % | Adultér° théorique % | Adultér° mesurée % | Récupération % |
|-------------------------|----------------------------|----------------------------|--------------------------|-------------------|
| 1 | 0 | 1 | 1 | 100 |
| 1 | 2 | 3 | 3.1 | 103 |
| 1 | 5 | 6 | 7.4 | 123 |
| 1 | 8 | 9 | 10.1 | 112 |
| 1 | 11 | 12 | 13.5 | 113 |
| 1 | 14 | 15 | 16.6 | 111 |
| 1 | 17 | 18 | 20.8 | 116 |
| 1 | 20 | 21 | 24.4 | 116 |

FIGURE 6.14: RECUPERATION DES SURCHARGES D'IgGb DANS UN LAIT CAPRIN A 1% D'ADULTERATION

C.1.4/ Problèmes rencontrés lors de l'étude des conditions expérimentales.

Ce type de système est complexe. Trois phénomènes distincts y coexistent, avec des cinétiques qui leur sont propres: une agglutination des MslgGb par des AclgGb, une stabilisation des MslgGb par des caséines et une déstabilisation des mêmes Ms par des protéines du sérum de chèvre.

La difficulté principale est de gouverner tous les paramètres qui peuvent influencer sur cette triple réaction. Ainsi, les problèmes qui sont apparus au cours des essais d'optimisation (notamment de la sensibilité du système) se sont rapidement révélés comme étant difficilement surmontables.

L'ordre d'introduction des réactifs a été étudié: on observe des différences de signal très importantes pour un même système suivant l'ordre de mise en réaction.

De plus, dans le cas où l'introduction des réactifs est la plus favorable à une élévation de la sensibilité du système, la répétabilité n'est pas satisfaisante.

De nombreux essais (non rapportés) ont confirmé l'ingouvernabilité d'un tel système, malgré l'intérêt qu'il possède de ne pas prétraiter les échantillons.

L'utilisation d'un sérum de chèvre pour annihiler la stabilité des Ms induite par les caséines ne conduit pas à un système répétable et suffisamment fiable. Elle sera abandonnée au profit d'un pré-traitement des échantillons.

C.2/ Traitement par élimination des caséines

C.2.1/ Utilisation de Ms-Ethanolamine

Nous avons vu que les protéines responsables de l'agglutination aspécificifique étaient éliminées des échantillons sériques humains par des Ms-Eth sur lesquelles elles venaient s'adsorber (CLIQUET et al, 1993).

De la même façon, nous allons chercher à éliminer l'effet des caséines en utilisant des Ms-Eth.

C.2.1.1/ Traitement standard des caséines par des Ms-Eth

Les caséines seront traitées de deux façons en utilisant le protocole mis au point pour le sérum sanguin :

| | |
|-------------------------------------|--------------------|
| Ms-Eth : | 10 mg |
| Dilutions CN kappa (3 mg/mL) : | 1 mL |
| ou Dilutions CN totale (23 mg/mL) : | 1 mL |
| --> Incubation : | 60 minutes |
| --> Centrifugation : | 10 minutes, 5000 g |

Récupération des surnageants

Le traitement 1 est effectué sur des dilutions de caséine de 1/2,5 à 1/20 (diluées dans un deuxième temps au 1/10). Le traitement 2 est effectué sur des solutions 10 fois plus diluées (1/25 à 1/200).

Les surnageants de traitement sont introduits dans une réaction d'agglutination MslgGb/AclgGb.

La figure 6.15 montre l'influence des caséines traitées sur les Ms :

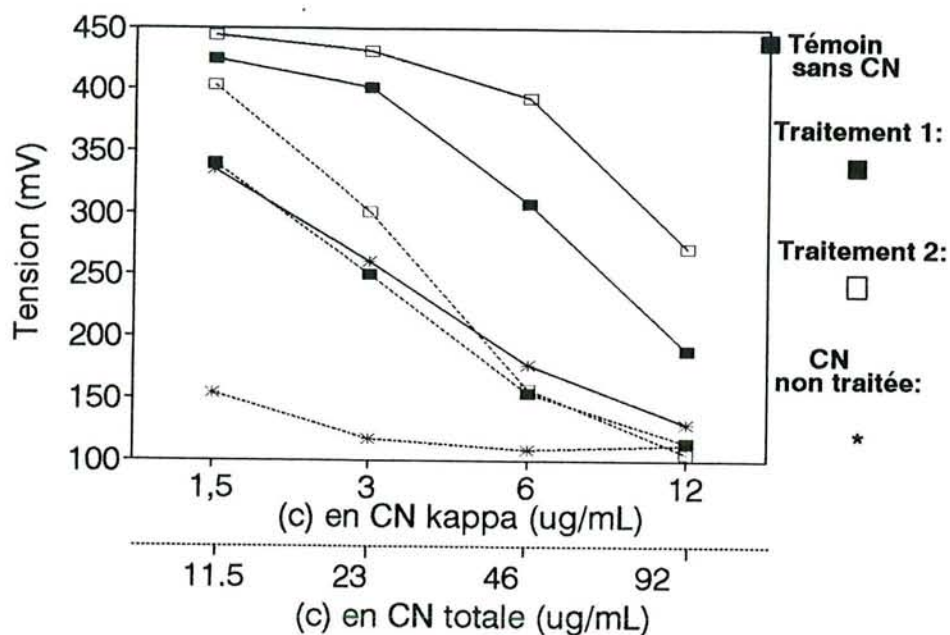
- l'efficacité du traitement est certaine, mais le phénomène n'est éliminé en grande partie que pour des concentrations en caséines correspondant à un lait dilué au 1/2000.

- On peut remarquer que le traitement est plus efficace sur des solutions plus concentrées (de 1/2,5 à 1/20) que sur des solutions 10 fois plus diluées, ce qui pourrait s'expliquer par une plus forte probabilité de rencontres entre Ms-Eth et caséines.

Dans les conditions habituelles de traitement (10 mg de Ms-Eth par mL d'échantillon à traiter), l'efficacité n'est atteinte que pour des laits dilués au 1/2000, ce qui, dans notre cas, est insuffisant.

C.2.1.2/ Traitement par des quantités croissantes de Ms-Eth

Nous allons déterminer la quantité minimale de Ms-Eth nécessaire pour éliminer totalement le phénomène à partir de solutions de caséines κ (3 mg/mL) ou totales (23 mg/mL) diluées au 1/100, c'est à dire dans les conditions recherchées pour un tel dosage.



| | CN kappa | CN totale | Ms-Eth | MS | AS |
|-------------------------|--|-----------------|--------------------|-----------|-------------------|
| Dilution | 1/250 à 1/2000 | 1/250 à 1/2000 | | 1/100 | 1/1600 à 1/102400 |
| Concentr° finale | 12 à 1.5 µg/mL | 92 à 11.5 µg/mL | 10 mg par mL de CN | 100 µg/mL | 1560 à 24 ng/mL |
| Incubation | 60 minutes | | | | |
| Traitement 1 | 10 mg Ms-Eth + 1 mL dilutions CN (1/25, 1/50, 1/100, 1/200) | | | | |
| Traitement 2 | 10 mg Ms-Eth + 1 mL dilutions CN (1/2.5, 1/5, 1/10, 1/20) | | | | |
| Protocole | MsIgGb + AcIgGb + CN kappa traitée (1) traitee (2) non traitée + CN totale traitée (1) traitee (2) non traitée | | | | |

FIGURE 6.15: INFLUENCE DE CASEINES TRAITÉES PAR DES Ms-Eth SUR L'AGGLUTINATION DES MsIgGb PAR LES AcIgGb

Les traitements sont les mêmes que précédemment, à l'exception du culot de Ms-Eth qui varie de 25 à 200 mg.

La figure 6.16 montre qu'il est sans effet, quelle que soit la concentration en Ms-Eth, pour une dilution au 1/100 de la solution de caséines totales. Quant à la caséine κ , l'utilisation de 200 mg de Ms-Eth ne réduit le phénomène que de 50%.

C.2.1.3/ Capacité d'adsorption des Ms-Eth

Les caséines α_S , β et κ ont été mesurées par INM avant et après traitement de leurs solutions par des quantités croissantes de Ms-Eth (25 à 200 mg par mL de caséine), selon le protocole défini dans le chapitre Matériel et Méthodes.

La figure 6.17 permet de faire un certain nombre de constatations :

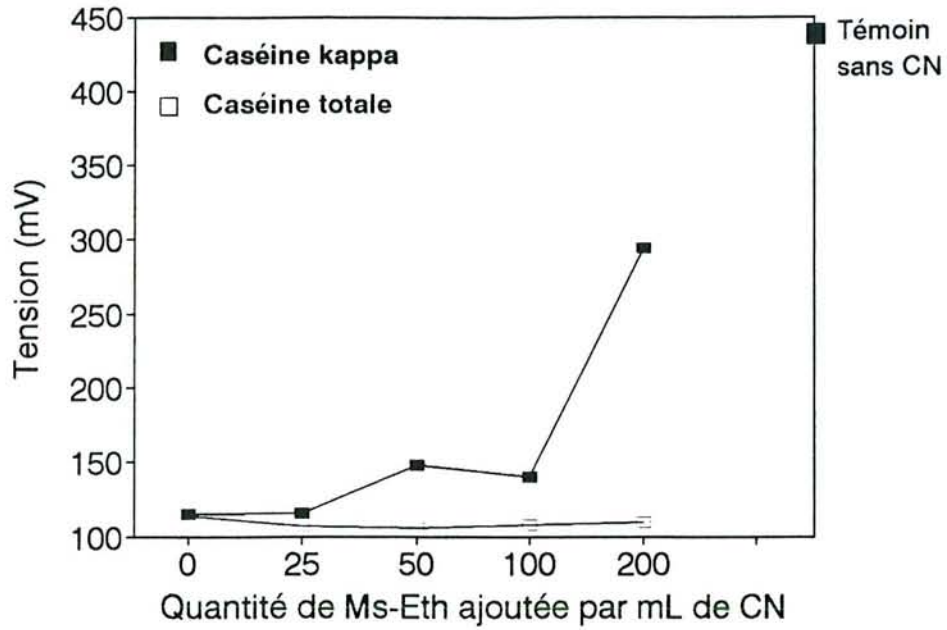
- Des quantités importantes de caséines (de 25 à 75%) sont éliminées, et ceci de façon proportionnelle à la quantité de Ms-Eth.

- La pente de la droite : caséine éliminée = f(concentration en Ms-Eth) est la même pour les trois caséines mélangées en solution (0,25) et pour la caséine κ isolée (0,25), ce qui indique que cette dernière a un comportement identique vis-à-vis des Ms-Eth, qu'elle soit seule ou en présence des autres caséines.

Si l'on prolonge ces droites, on élimine théoriquement toutes les caséines pour des concentrations de Ms-Eth supérieures à 315 mg par mL de solution de caséine, ce qui représente des quantités importantes par échantillon.

Ces résultats indiquent que les Ms-Eth ont une capacité d'adsorption identique pour les trois caséines.

Le traitement par des Ms-Eth n'a qu'un effet limité pour une consommation importante de Ms. La capacité d'adsorption est bonne, mais les quantités totales de caséines dans des laits peu dilués dépassent de loin cette capacité.



| | CN kappa | CN totale | Ms-Eth | MS | AS |
|-----------------------------|--|-----------|--------------------------|-----------|-----------|
| Dilution | 1/100 | 1/100 | | 1/100 | 1/5000 |
| Concentration finale | 30 ug/mL | 230 ug/mL | 25 à 200 mg par mL de CN | 100 ug/mL | 500 ng/mL |
| Incubation | 60 minutes | | | | |
| Protocole | MslgGb + AcIgGb + CN kappa traitée + CN totale traitée | | | | |

FIGURE 6.16: INFLUENCE DE CASEINES TRAITÉES PAR DES QUANTITÉS CROISSANTES DE Ms-Eth SUR L'AGGLUTINATION DES MsIgGb PAR LES AcIgGb

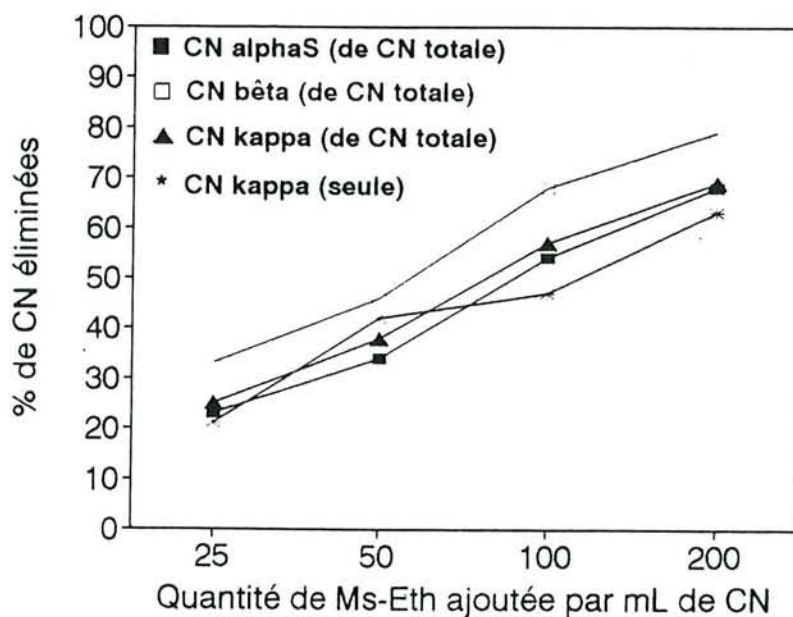


FIGURE 6.17: CAPACITE D'ADSORPTION DES CASEINES PAR LES Ms-Eth

TABLEAU 6.1 : PERTE EN IgG LORS DU TRAITEMENT DE LAITS BOVINS PAR DES Ms-Eth

| (c) en IgG de laits non traités (mg/mL) | (c) en IgG de laits traités (mg/mL) | Perte % |
|---|-------------------------------------|---------|
| 0.68 | 0.46 | 32 |
| 0.62 | 0.43 | 31 |
| 0.61 | 0.43 | 30 |
| 0.66 | 0.46 | 30 |
| 0.59 | 0.42 | 29 |
| 0.63 | 0.43 | 32 |

C.2.1.4/ Particularités de notre modèle

Dans l'introduction, nous avons recensé les molécules sériques capables de déstabiliser les Ms en s'y adsorbant. Nous avons noté le rôle non négligeable des IgG humaines dans ce phénomène.

Il est donc vraisemblable qu'un traitement du lait par des Ms-Eth élimine une partie des IgG. Cette réflexion nous a conduit à déterminer par INM la quantité d'IgG dans un lait bovin avant et après un tel traitement (200 mg/ml de Ms-Eth).

On constate dans le tableau 6.1 que ce traitement entraîne effectivement une perte d'environ 30% des IgG.

| |
|---|
| Dans le cas particulier du modèle choisi, un tel traitement est inutilisable. |
|---|

C.2.2/ Précipitation des caséines à leur pHi

C.2.2.1/ Effet d'un tel traitement sur l'élimination des caséines.

La courbe de précipitation des caséines en fonction du pH du milieu montre une solubilité minimale autour de pH 4,6.

Nous utiliserons le protocole décrit par DESNOUVEAUX (1984) pour précipiter les caséines à leur pHi (annexe 3).

La caséine α S, la plus abondante des trois, est dosée par INM selon le protocole défini par COLLARD-BOVY et al (1991) (cf. Matériel et Méthodes):

- Dans 6 échantillons de lait bovin (dilution finale au 1/35000).
- Dans les surnageants de ces mêmes échantillons (dilution finale au 1/1000), après élimination des caséines par précipitation à leur pHi.

On constate alors que les quantités de caséine α S sont, dans le surnageant, inférieures au dernier point de gamme, soit 90 μ g/mL (tableau 6.2) :

Un lait ainsi traité dilué au 1/100 en contiendra moins de 0,9 μ g par mL, ce qui, au vu des résultats précédents, est suffisant pour éliminer totalement le phénomène de stabilisation des Ms.

TABLEAU 6.2: RECUPERATION DE LA CASEINE α S DANS DES SURNAGEANTS DE LAITS BOVINS APRES PRECIPITATION DES CASEINES AU pH_i

| Caséine alphaS (mg/mL) Lait entier | Caséine alphaS (mg/mL) Surnageant | Récupération % |
|---|--|---------------------------|
| 11.2 | <0.09 | moins de 0.80% |
| 11.0 | <0.09 | moins de 0.82% |
| 12.0 | <0.09 | moins de 0.75% |
| 10.6 | <0.09 | moins de 0.85% |
| 11.8 | <0.09 | moins de 0.76% |
| 9.8 | <0.09 | moins de 0.92% |

TABLEAU 6.3: PERTE EN IgG LORS DU TRAITEMENT DE LAITS BOVINS PAR PRECIPITATION DES CASEINES AU pH_i

| (c) en IgG (mg/mL) Lait entier | (c) en IgG (mg/mL) Surnageant | Perte % |
|---|--|--------------------|
| 0.65 | 0.28 | 57 |
| 0.65 | 0.22 | 66 |
| 0.65 | 0.24 | 63 |
| 0.65 | 0.24 | 63 |
| 0.65 | 0.22 | 66 |
| 0.65 | 0.23 | 65 |
| 0.65 | 0.23 | 65 |
| 0.65 | 0.24 | 63 |
| 0.65 | 0.24 | 63 |

La précipitation des caséines au pHi en élimine de façon répétable plus de 99% du lait.

C.2.2.2/ Remarques concernant ce type de traitement

L'échantillon de lactosérum issu d'un tel traitement a un pH de 4,6 et peut déstabiliser les Ms, même à la dilution de 1/100, dans un dosage de type INM.

Si ce type de traitement est retenu pour le dosage INM d'une protéine faiblement concentrée du lait, il faudra réajuster le pH du tampon de dilution de façon que le pH final du milieu de réaction soit proche de 8.

C.2.2.3/ Particularité de notre modèle.

Le pHi des IgG bovines s'échelonne de 4,5 à 6,5. L'élimination des caséines par précipitation à leur pHi risque donc de précipiter aussi une partie des IgGb et de nuire à leur dosage.

C'est ce que nous avons vérifié en dosant les IgGb dans un lait bovin avant et après précipitation à pH acide (9 essais). Les résultats confirment que ce traitement aboutit à une perte de plus de 60% des IgGb, et ceci de façon répétable (tableau 6.3)

Le traitement par précipitation des caséines au pHi ne peut être entrepris dans le cas de notre modèle, car il entraîne une perte de 60% des IgG. Dans les autres cas, il faudra utiliser un tampon de réaction assurant un pH final de 8 au milieu de réaction.

3/ Coagulation des caséines par la présure.

L'action de la chymosine sur la caséine κ conduit à une agglutination irréversible des micelles.

Le rendement de coagulation peut être amélioré par l'addition préalable de chlorure de calcium (15 μ M par mL de lait) de façon à minimiser la fraction soluble des caséines.

L'enzyme utilisée en fromagerie pour coaguler les caséines est la présure,

mélange de chymosine et de pepsine (80-20%). C'est elle que nous emploierons dans nos essais.

La coagulation présente l'avantage sur la précipitation de ne pas faire varier le pH, mais élimine-t-elle suffisamment de caséines pour permettre un dosage sans effet stabilisant sur les Ms?

Pour le savoir, nous avons dosé la caséine α S, la plus abondante des trois, dans les mêmes laits que ceux du paragraphe précédent :

- Avant traitement (dilution au 1/35000).
- Après traitement (dilution au 1/1000), (protocole décrit en annexe 3).

Les quantités de caséine résiduelle dans le surnageant sont plus importantes qu'après un traitement par précipitation acide (tableau 6.4).

La coagulation élimine plus de 95% de la caséine α S, du moins sur ces six laits; cependant, lors d'autres essais (non rapportés), la coagulation ne s'est pas toujours révélée aussi efficace.

Les quantités résiduelles de caséines α S sont donc plus variables d'un lait à l'autre après ce type de traitement; de plus, il en reste 2 à 4 fois plus qu'après une précipitation acide.

La coagulation est un mécanisme qui dépend d'un certain nombre de facteurs, dont la concentration en caséine κ ou en calcium, ce qui n'est pas le cas d'une précipitation des caséines au pHi, où la quantité récupérée est plus constante.

Pour le dosage de protéines faiblement concentrées dans le lait, notamment du plasminogène, nous choisirons comme prétraitement une précipitation plutôt qu'une coagulation.

Par contre, dans le cas du dosage d'IgGb pris comme modèle, nous donnerons la préférence à un prétraitement par coagulation puisqu'il n'induit aucune variation du pH, donc en principe aucune perte d'IgG.

**TABLEAU 6.4: RECUPERATION DE LA CASEINE α S DANS
DES SURNAGEANTS DE LAITS BOVINS
APRES COAGULATION A LA PRESURE**

| Caséine alphaS (mg/mL) Lait entier | Caséine alphaS (mg/mL) Surnageant | Récupération % |
|---|--|---------------------------|
| 11.2 | 0.26 | 2.3% |
| 11.0 | 0.33 | 3.0% |
| 12.0 | 0.28 | 2.3% |
| 10.6 | 0.22 | 2.1% |
| 11.8 | 0.18 | 1.5% |
| 9.8 | 0.39 | 4.0% |

La coagulation entraîne une élimination importante des caséines, mais moindre que la précipitation isoélectrique et avec une plus grande variabilité.

D/ Conclusion

La stabilité des Ms est influencée par la présence de caséine dans le milieu de réaction.

L'hypothèse explicative la plus vraisemblable du mécanisme de ce phénomène se base sur la répartition de l'hydrophobicité et des charges sur les caséines, à l'exemple de la caséine κ . Celle-ci se lierait par des interactions hydrophobes à la matrice interne des microsphères, réhaussant par son extrémité C-terminale libre la charge négative de leur surface, et accroissant par conséquent leur stabilité.

De tous les moyens étudiés pour éliminer ce phénomène, la séparation des caséines par précipitation à leur pHi a été retenue. Elle permet d'éliminer plus de 99% des caséines présentes dans un lait.

L'INM est une méthode particulièrement bien adaptée au dosage des protéines dont les concentrations sont de l'ordre de 0,1 à 1 mg par mL, puisque sa sensibilité permet de hautes dilutions (1/10 000 à 1/100 000) qui évacuent tout problème de turbidité du milieu et d'interférence avec les Ms et autorisent un dosage sans prétraitement des échantillons, ce qui est une performance pour un milieu comme le lait. Pour les protéines dont les concentrations sont de l'ordre de l'ordre du $\mu\text{g/mL}$, des dilutions de l'ordre du 1/100 ou 1/200 sont requises et impliquent, outre un écrémage, une élimination des caséines. L'INM perd alors un avantage certain sur des méthodes concurrentes, mais reste compétitive par sa sensibilité et sa rapidité, le délai d'obtention des résultats ne dépassant pas 2 heures.

CHAPITRE 5

**DOSAGE DU PLASMINOGENE BOVIN
DANS DES ECHANTILLONS LAIT**

CHAPITRE 5 : DOSAGE DU PLASMINOGENE BOVIN DANS DES ECHANTILLONS LAIT

A/ Introduction

Nous allons étudier la validité d'un tel système sur des échantillons de lait traités au préalable et comparés à un étalon de notre composition.

B/ Traitement de l'échantillon

Dans le chapitre précédent, nous avons mis en évidence la supériorité en termes de rendement d'une précipitation au pHi des caséines sur une coagulation de celles-ci. L'élimination des caséines se fera donc selon un protocole de précipitation au pHi.

Il faut toutefois garder à l'esprit que la majorité du BPg se trouve dans le lait sous une forme liée aux caséines. La précipitation sera donc précédée d'une étape d'incubation en présence d' ϵ AAC, qui, selon la littérature, permet de décrocher au maximum le plasminogène des caséines.

Le traitement comporte plusieurs étapes :

--> Dissociation BPg / Caséines

Le protocole est dérivé de celui utilisé par POLITIS et al (1993) :

| | |
|--|-----------------------------|
| Lait entier | 1 mL |
| ϵ AAC (2M) | 0,025 mL (soit 50 mM final) |
| Incubation à température ambiante pendant 2 heures | |

--> Elimination des caséines

Le protocole utilisé est dérivé de celui décrit par DESNOUVEAUX (1984):

| | |
|----------------------------|----------|
| Lait/εAAC | 1,025 mL |
| Acide acétique 33,3% (v/v) | 0,030 mL |
| Incuber 10 min à 37°C | |
| Ajouter: | |
| Acétate de sodium 33,3 N | 0,030 mL |
| Incuber 3 min à 37°C | |
| Ajouter un clarifiant: | |
| Trichlorotrifluoroéthane | 0,500 mL |

Agiter sur vortex

Centrifuger 1 heure à 2000 g (+4°C)

Récupérer le surnageant

Le surnageant, qui correspond à un lactosérum contenant le BPg, sera notre échantillon. Cependant, son pH étant fortement acide, sa prédilution se fera dans un tampon borate de pH 9, ce qui ramène le pH final dans les cuves de réaction aux environs de 8 de façon à ne pas perturber les Ms lors de leur mise en réaction.

C/ Etalonnage de ce système

C.1/ Fabrication d'un lactosérum "synthétique"

La composition du milieu d'étalonnage doit être la plus proche possible de celle des échantillons, ici d'un lactosérum. C'est pourquoi celui que nous avons défini est constitué d'un mélange de BPg à 3,6 mg/mL, des principales protéines du lactosérum (α lactalbumine à 1,20 g/L, β lactoglobuline à 2,7 g/L et albumine sérique bovine à 0,25 g/L) et de milieu de Jenness-Koops, qui reproduit l'environnement iono-minéral du lactosérum (annexe 1).

Ce milieu est ensuite aliquoté et congelé, sa conservation à +4°C provoquant un trouble au bout de quelques jours.

C.2/ Agglutination des MsDxAcBPg par l'étalon.

Ce "lactosérum" étalon, contenant 3,6 µg de BPg par mL, est dilué de façon à couvrir une gamme de concentrations de 2 à 70 ng/mL environ. La courbe d'agglutination est proche de celle sans "lactosérum". Tous les témoins montrent l'absence d'agglutination aspécifique des Ms (figure 7.1) : le témoin MsDxAcBPg seules (BB) et MsDxAcBPg + AcBPg (BAs) sont à 54 mV.

Une concentration de BPg de 10 mg/L donne un signal de plus de 130 mV, soit 2,5 fois la valeur du BB. Des laits contenant 0,7 mg/L de BPg peuvent être dosés significativement.

D/ Dosage d'échantillons traités

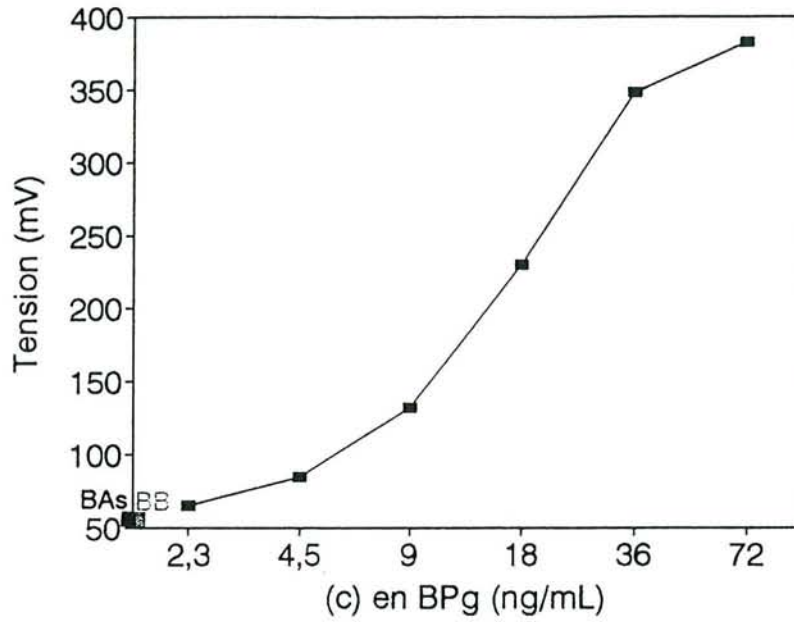
D.1/ Influence de l'εAAC sur la réaction

Le traitement comporte l'ajout d'εAAC, dont une partie entrera en compétition avec les sites d'affinité des caséines, et dont l'autre restera en solution dans l'échantillon traité.

Des études préliminaires nous ont montré que la présence d'εAAC à des concentrations supérieures à 1 mM déstabilisait les Ms.

Dans le cas de notre traitement, si tout l'εAAC se retrouve dans l'échantillon, sa concentration "optimale" serait de 0,25 mM en milieu de réaction. Nous avons donc testé l'influence de l'εAAC sur les MsDxAcBPg dans cette zone de concentration :

Un traitement est effectué avec quatre solutions d'εAAC : 5M, 2,5M, 1,25M, 0,63M sur des échantillons où le lait est remplacé par du tampon de réaction, tout le reste du protocole étant identique par ailleurs. Le surnageant du traitement est ensuite introduit dans le protocole de dosage. L'εAAC se trouve alors à des concentrations finales maximales de 0,60mM à 0,08mM.



| | BPg étalon | MS | AS | Tampon |
|-------------------------|---|-------------|-------------|----------------------------|
| Dilution | 1/50 à 1/1600 | 1/50 | 1/400 | Borate pH 8.0 PEG 3% |
| Concentr° finale | 72 à 2.3 ng/mL | 80 ug/mL | 33 ug/mL | |
| Incubation | 30 min (pré-incubation) + 60 min (incubation) | | | |
| Observation | Témoin BAs: MsDxAcBPg + AcBPg | | | |
| Protocole | MsDxAcBPg + BPg + AcBPg | | | |

FIGURE 7.1 : AGGLUTINATION DES MsDxAcBPg PAR LES DILUTIONS DU "LACTOSERUM" ETALON

Les signaux obtenus à 60 minutes d'incubation sont les suivants :

| | |
|--------------------------|-------|
| - Blanc Bille : | 55 mV |
| - ϵ AAC 5M : | 56 mV |
| - ϵ AAC 2.5M : | 55 mV |
| - ϵ AAC 1.25M : | 55 mV |
| - ϵ AAC 0.63M : | 58 mV |

L' ϵ AAC, à des concentrations de 0,60mM à 0,08mM dans le milieu de réaction, n'a aucune influence sur la stabilité des réactifs.

D.2/ Influence du milieu lactosérum peu dilué sur les Ms

Les échantillons traités ne peuvent être fortement dilués pour le dosage; de ce fait, certains facteurs, comme la force ionique, pourraient influencer la stabilité des MsDxAcBPg. Jusqu'à quelle dilution cette influence est-elle observable?

Nous avons mis en présence des MsDxAcBPg avec différentes dilutions d'échantillons et mesuré le signal néphélométrique à 4 minutes qui ne peut correspondre qu'à une réaction aspécifique (l'agglutination spécifique des MsDxAcBPg par le BPg des échantillons n'étant détectable qu'au bout de plusieurs dizaines de minutes d'incubation). Les résultats, indiqués dans le tableau 7.1, font état d'une agglutination dépendante de la dilution de l'échantillon.

L'influence de l'échantillon traité sur les Ms cesse au delà d'une dilution de celui-ci au 1/200.

D.3/ Influence sur les Ms des caséines résiduelles du surnageant.

Le traitement enlève plus de 99% des caséines. Le restant représente moins de 0,25 g/L. La dilution au 1/200 pour le dosage laisse subsister environ 1,25 μ g/mL de caséines totales dans le milieu de réaction.

Nous avons donc recherché quelles étaient les limites de l'influence des caséines sur le système de dosage du plasminogène bovin.

TABLEAU 7.1 : INFLUENCE DU MILIEU DES ECHANTILLONS SUR LES MsDxAcBPg

| Dilution des échantillons | Tension (mV) à 4 minutes | | |
|---------------------------|--------------------------|---------------|---------------|
| | Echantillon 1 | Echantillon 2 | Echantillon 3 |
| 1/25 | 266 | 314 | 370 |
| 1/33 | 130 | 156 | 195 |
| 1/50 | 89 | 98 | 106 |
| 1/100 | 65 | 72 | 75 |
| 1/200 | 55 | 52 | 53 |
| BB = 54 mV | | | |

On observe que le phénomène varie en fonction de la concentration en caséine et qu'il n'est plus visible au dessous de 4 μg de caséine totale par mL de milieu de réaction (HAISSAT, 1993).

Dans le cas du dosage du BPg dans du lait, les concentrations de caséine résiduelle sont largement inférieures à la concentration minimale risquant d'influencer l'agglutination.

D.4/ Agglutination d'échantillons traités

Nous venons de constater qu'il fallait diluer l'échantillon au moins au 1/200, ce qui correspond à une concentration en BPg de 10 à 15 ng/mL. Compte tenu du seuil de détection du système, il semble difficile de diluer plus tout en conservant une bonne précision sur le dosage. C'est pourquoi nous nous en tiendrons à une dilution au 1/200 de l'échantillon traité.

Douze laits frais de troupeaux sont traités par le protocole que nous avons établi, puis le BPg y est dosé par notre système en référence à l'étalon "lactosérum". Les 12 échantillons agglutinent les MsDxAcBPg, donnant des signaux allant de 128 à 276 mV à 60 minutes d'incubation, ce qui correspond aux concentrations indiquées dans la figure 7.2, soit une moyenne de 2,9 mg/L .

Les valeurs sont proches de celles obtenues par COLLIN et al (1988), qui variaient entre 2,6 et 4,8 mg/L, avec une moyenne à 3,7 mg/L (obtenue sur 9 laits). POLITIS et al (1992) obtenaient sur 15 laits une moyenne plus faible, de 1.10 mg/L.

Les teneurs en BPg des échantillons testés par notre méthode s'échelonnent de 2,1 à 4,9 mg/L, avec une moyenne à 2,9 mg/L.

D.5/ Effet de traitements thermiques sur le dosage

Nous avons voulu savoir s'il était possible de doser des échantillons de lait qui avaient été congelés puis décongelés par chauffage à 40°C pendant 60 minutes.

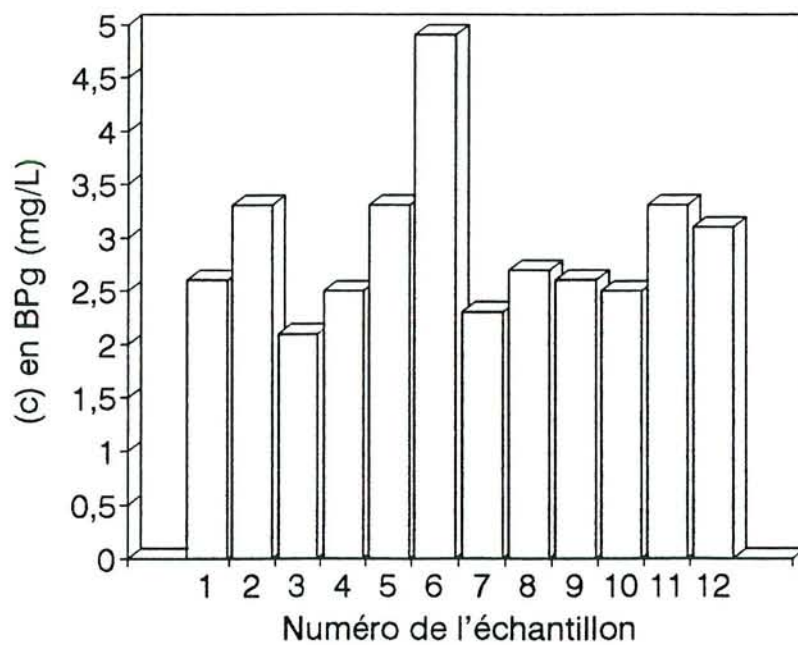


FIGURE 7.2 : TENEUR EN BP_g DE LAITS FRAIS DE TROUPEAUX SELON LA METHODE D'INM

Pour cela, cinq laits de troupeaux sont testés frais ou après congélation et thermisation à 40°C. Les résultats sont indiqués dans la figure 7.3.

On observe des différences éventuellement importantes entre les échantillons frais et congelés, et ceci dans le sens d'une sur- ou d'une sous-estimation. Seul l'échantillon numéro 4 ne semble pas être affecté par la congélation.

Le dosage de laits décongelés semble sous la dépendance de phénomènes aléatoires. Entre le passage de l'échantillon à -20°C et à +40°C, il pourrait se produire une dégradation plus ou moins grande du BPg ou une mauvaise ré-homogénéisation de celui-ci avant traitement.

Le BPg ne peut être dosé par INM que dans des échantillons de lait frais, mais non après congélation.

D.6/ Spécificité du dosage vis-à-vis de la plasmine

Nous avons observé précédemment que la plasmine croisait à 20% dans le dosage du plasminogène. La sensibilité du système étant de l'ordre de 5 ng/mL, il faut au minimum 25 ng de plasmine pour être détectée. Ce qui correspond, pour un échantillon de lait dilué au 1/200, à une valeur initiale de 5 mg/L de plasmine; en dessous de cette valeur, le système ne la détecte plus dans un lait.

La réaction croisée avec la plasmine est suffisamment faible pour que celle-ci ne soit pas détectée dans les échantillons de lait. Elle ne perturbe le dosage qu'au dessus de 5 mg/L.

E/ Validation du dosage

E. 1/ Surcharges d'échantillons laits

Les surcharges d'échantillons établissent la spécificité d'un dosage. Dans notre cas, la comparaison d'un lait surchargé puis traité à un lait traité et dont l'extrait est surchargé permet en outre d'évaluer d'éventuelles pertes de BPg lors du traitement.

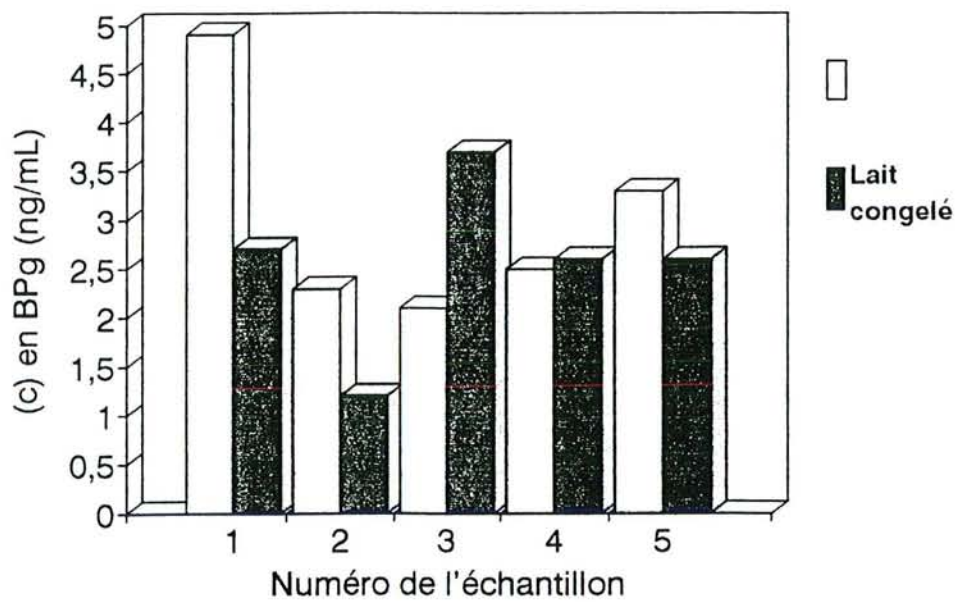


FIGURE 7.3 : TENEUR EN BPg DE LAITS DE TROUPEAUX OBTENUES SUR DES ECHANTILLONS FRAIS OU CONGELES

Les résultats sont rapportés dans le tableau 7.2 :

Tableau 7.2: Récupération des surcharges de laits ou d'extraits en BPg

| <u>Lait départ</u> (mg/L) | <u>Surcharge</u> (mg/L) | <u>(c) théorique</u> (mg/L) | <u>(c) mesurée</u> <u>S/T(mg/L)</u> | <u>(c) mesurée</u> <u>T/S(mg/L)</u> |
|------------------------------|----------------------------|--------------------------------|--|--|
| 2,6 | 0 | 2,6 | 2,6 | 2,6 |
| 2,6 | 1,5 | 4,1 | 3,6 | 3,7 |
| 2,6 | 3 | 5,6 | 4,5 | 4,8 |
| 2,6 | 6 | 8,6 | 7,9 | 8,5 |

S/T: lait surchargé puis traité

T/S: lait traité puis extrait surchargé

Comparons en premier la colonne S/T et la colonne T/S, à savoir une surcharge avant et une surcharge après traitement, la deuxième servant de témoin à la première. Dans ce cas, l'équation de la droite de régression linéaire est : $Y = 1,10X - 0,30$, avec un coefficient de corrélation r de 0,999 ($p < 0,001$) (figure 7.4).

La perte moyenne de 5% peut en partie être expliquée par le fait que l'utilisation de l' ϵ AAC ne permet pas forcément de décrocher 100% du plasminogène lié aux caséines (cf. HUMBERT, 1986, citant différents auteurs sur le sujet).

Les pertes en BPg due au pré-traitement des échantillons sont négligeables (5% en moyenne).

Intéressons nous ensuite à la comparaison de la concentration théorique avec la concentration réelle de la colonne T/S, qui fournira des indications sur la spécificité de la méthode elle-même, sans le pré-traitement. L'équation de la droite de régression linéaire est : $Y = 0,89X + 0,01$, $r = 0,990$ (figure 7.5).

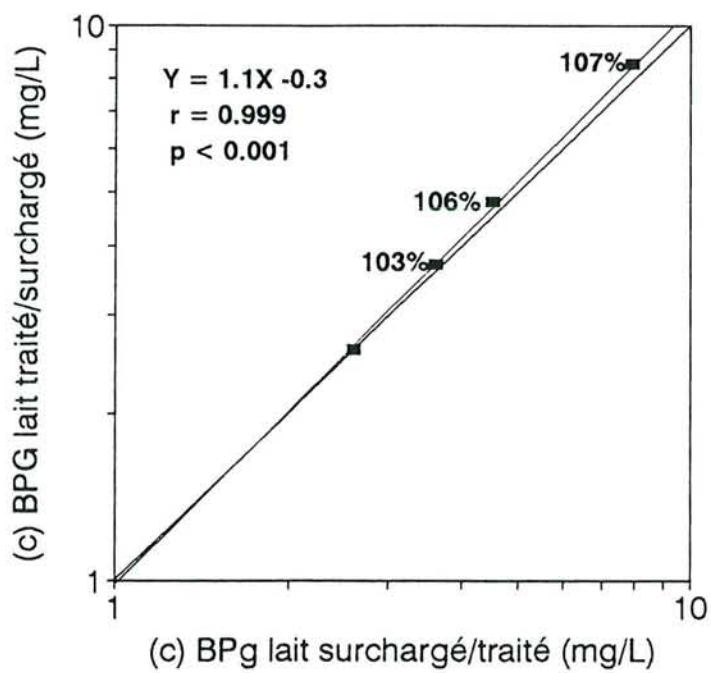


FIGURE 7.4 : RECUPERATION DES SURCHARGES DE BPg DANS UN LAIT APRES TRAITEMENT

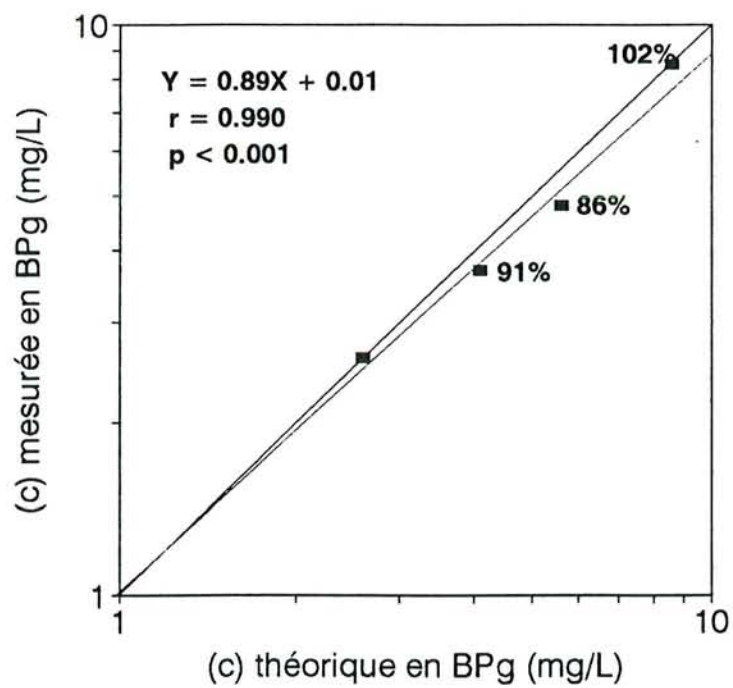


FIGURE 7.5 : RECUPERATION DES SURCHARGES DE BP_g DANS UN SURNAGEANT DE TRAITEMENT

Le recouvrement moyen est de 92%. La pente de la droite de régression linéaire est proche de 1.

Enfin, en comparant la concentration théorique à la colonne S/T, nous avons une indication globale sur le dosage et le pré-traitement. L'équation de la droite de régression linéaire est : $Y = 0,89X + 0,01$, $r = 0,988$ ($p < 0,001$).

La pente (0,89) est plus faible que lorsque l'on observe le recouvrement sur le dosage seul (0,99). Ceci est dû aux incertitudes liées au pré-traitement.

Le recouvrement moyen est de 87% et la droite de régression linéaire entre les récupérations et les valeurs théoriques a une pente de 0,89.

E.2/ Tests de répétabilité

Les fidélités intra- et inter-essais ayant été établies pour le même type de système dans les paragraphes précédents, seules les répétabilités de l'étalonnage et du traitement des échantillons seront évaluées.

E.2.1/ Reproductibilité de l'étalonnage

On compare la gamme d'étalonnage obtenue cinq fois dans des conditions de manipulation différentes (figure 7.6): les CV ne dépassent pas 4% sur tous les points de la gamme.

Dans la zone de concentrations correspondant aux valeurs des échantillons laits, le CV est inférieur à 4%.

E.2.2/ Reproductibilité de l'extraction

De façon à évaluer la fidélité de l'extraction, un lait de troupeau a été traité 10 fois avant d'être dosé par rapport à un même étalonnage.

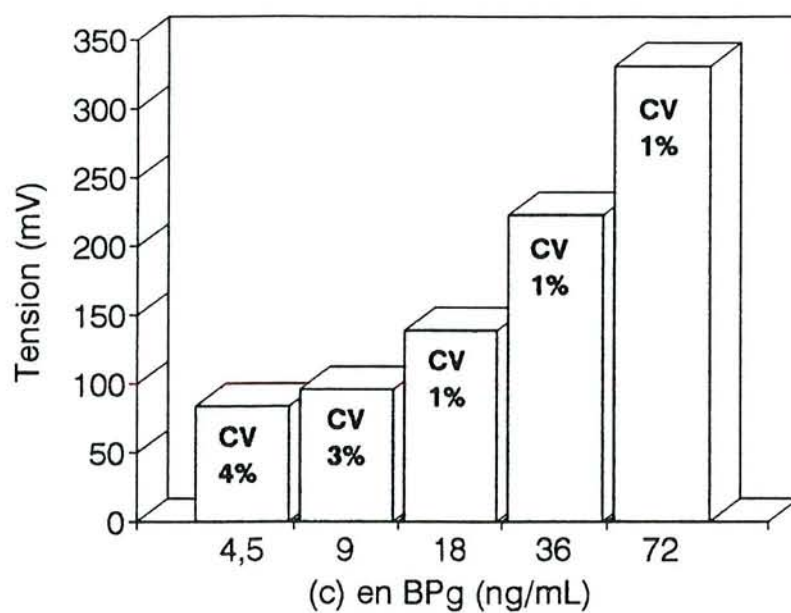


FIGURE 7.6 : REPRODUCTIBILITE DES DIFFERENTS POINTS DE LA GAMME D'ETALONNAGE DU BPg

Sa teneur moyenne en BPg sur les 10 essais est de 3,1 +/- 0,1 mg/L. Les valeurs extrêmes s'échelonnent de 3,0 à 3,3 mg/L et le CV est de 1,9%.

La fidélité du traitement de l'échantillon est satisfaisante : le CV reste inférieur à 2%.

F/ Conclusion

Le dosage du plasminogène dans le lait bovin permet d'explorer les limites de l'Immunonéphélométrie Microparticulaire. En effet, celle-ci est une méthode particulièrement bien adaptée au dosage de protéines de concentration supérieures à 0,1 mg par mL de lait, la dilution finale du milieu lait étant alors suffisante pour éviter toute interférence sur la réaction.

En revanche, pour le BPg, un traitement préalable des échantillons de lait est nécessaire. Dans ce cas, la congélation est à proscrire.

Nous avons utilisé comme standard un étalon de notre composition, reproduisant au maximum le milieu de l'échantillon pré-traité. La répétabilité de l'étalonnage nous a donné entière satisfaction. Les études de récupération confirment la validation du dosage, même si le traitement élimine de faibles quantités de plasminogène.

Les valeurs observées à l'issue de cette étude sont du même ordre que celles obtenues avec la méthode ELISA.

La qualité technique d'un lait dépend en grande partie de son système caséinolytique. Le couple caséines/plasminogène est essentiel et une amélioration de sa connaissance, notamment des facteurs pouvant influencer les teneurs de ces constituants est indispensable à son amélioration.

Grâce au développement de leurs dosages respectifs, il est maintenant possible d'évaluer leur influence dans le cadre d'une étude des paramètres de la qualité du lait.

CHAPITRE 6

**APPLICATION DU DOSAGE DU
PLASMINOGENE BOVIN PAR
IMMUNONEPHELEMETRIE
MICROPARTICULAIRE DANS LE
CADRE D'UNE ETUDE DES
PARAMETRES DE LA QUALITE DE
LAITS DE TROUPEAU**

**CHAPITRE 6 : APPLICATION DU DOSAGE DU PLASMINOGENE BOVIN PAR
IMMUNONEPHELEMETRIE MICROPARTICULAIRE DANS LE CADRE D'UNE ETUDE
DES PARAMETRES DE LA QUALITE DE LAITS DE TROUPEAU**

A/ Introduction

Cette étude a été entreprise grâce à la collaboration d'un industriel laitier. Elle porte sur 14 producteurs sélectionnés selon des critères précis (Matériel et Méthodes) et sur une durée de 4 mois. Un grand nombre de paramètres ont été testés, soit par INM (caséine β), soit par d'autres techniques (matière protéique totale, matière grasse et lactose par spectrométrie infrarouge, extrait sec total par pesée).

B/ Résultats

L'évaluation des résultats fait appel à l'analyse en régression linéaire de seconde espèce et au test t de Student à $(n_1 + n_2 - 2)$ degrés de liberté.

B.1/ Etude globale des teneurs en BPg des laits de troupeau

Chaque semaine 7 laits de troupeaux ont été testés, d'où une évaluation bi-mensuelle par troupeau.

Les résultats bruts sont indiqués dans l'annexe 4 (tableau 2). Ils sont exploités dans le tableau 8.1 :

Tableau 8.1 : Teneurs en BPg selon le type de troupeau

| <u>Troupeaux</u> | <u>Teneur en BPg (mg/L)</u> | <u>Valeurs extrêmes (mg/L)</u> |
|------------------|-----------------------------|--------------------------------|
| Tous | 1,91 | 1,05 - 3,35 |
| Normande | 1,93 | 1,12 - 3,24 |
| Frisonne | 1,88 | 1,37 - 3,35 |

Les valeurs moyennes sont très proches, quelle que soit la race dominante du troupeau. D'ailleurs, les deux populations (Normande et Frisonne) ne sont pas statistiquement différentes quant aux teneurs en BPg ($t = -0,210$).

Il faut toutefois relativiser ces résultats en raison de la faible durée de notre étude et de la forte proportion de troupeaux de race Normande dans l'échantillonnage (42% contre 30% de Frisonne).

D'autres auteurs obtiennent des valeurs moyennes relativement proches : POLITIS et al indiquent une moyenne à 1,10 mg/L (15 laits) et COLLIN et al une moyenne de 3,7 mg/L (9 laits), ce qui est proche de la gamme de valeurs obtenue dans ce travail (1,05 - 3,35 mg/L).

Les teneurs en BPg des laits de troupeau étudiés sur 4 mois sont comprises entre 1,05 et 3,35 mg/L, avec une moyenne à 1,91 mg/L.

B.2/ Etude globale des teneurs en caséine β des laits de troupeau.

Les teneurs en caséine β mesurées bi-mensuellement sur 4 mois et 14 producteurs s'échelonnent de 4,7 à 9,7 g/L. Les résultats bruts sont indiqués dans l'annexe 5 (tableau 2). Les valeurs moyennes sont les suivantes (tableau 8.2) :

Tableau 8.2 : Teneurs en caséine β selon le type de troupeau

| <u>Troupeaux</u> | <u>Teneur en caséine β (g/L)</u> | <u>Valeurs extrêmes (g/L)</u> |
|------------------|---|-------------------------------|
| Tous | 6,93 | 4,7 - 9,7 |
| Normande | 7,47 | 5,8 - 9,7 |
| Frisonne | 6,32 | 4,7 - 8,1 |

La moyenne des troupeaux de race Normande est plus élevée de 1,15 g/L (environ 20%) que celle des troupeaux de race Frisonne . Les deux populations sont statistiquement différentes quant aux teneurs en caséine β ($t = - 5.237$ au seuil de 1/1000).

De nombreux auteurs avaient déjà souligné la prééminence de la race Normande, bénéficiant d'une forte proportion de variants génétiques BB de la caséine κ , qui sont associés à des laits riches en caséine (DUPLAN, 1991).

B.3/ Evolution des teneurs en BPg et caséine β des laits de troupeau

La figure 8.1 représente les variations des moyennes mensuelles des teneurs en caséine β et BPg pour la période Juillet - Octobre 1993.

La caséine β présente un minimum en Août, suivi d'une remontée vers les mois d'automne. Le plasminogène subit une diminution pendant les 4 mois, toutefois plus marquée d'Août à Septembre.

Aucun lien statistique ne lie les deux paramètres sur la période concernée ($r = -0,173$, $n = 93$). Il en est de même pour chaque lait pris individuellement (tableau 2, annexe 4). Seul un lait de troupeau présente une corrélation significative au seuil de 10% entre les deux facteurs.

Les variations de la caséine β ont été abondamment explicitées dans la littérature. Le minimum d'Août est explicable par une diminution de l'énergie de l'herbe consécutive à la sécheresse de l'été (GRIFFIN et al, 1974).

Quant au BPg, à notre connaissance, seules des études sur les variations de l'activité ont été portées à notre connaissance. L'étude de l'ITG (1985 et 1986, cité par HUMBERT, 1986) a montré un maximum d'activité en été.

Les teneurs en BPg et caséine β évoluent de façon indépendante durant la période d'expérimentation. Ce résultat est à confirmer sur une période plus longue.

B.4/ Comparaison des deux facteurs à d'autres paramètres des laits

Parallèlement à notre étude en INM, les teneurs en matière protéique totale, matière grasse, lactose et extrait sec total des laits des 49 troupeaux ont été évalués par le laboratoire de contrôle de l'industriel laitier et dans un laboratoire du Contrôle Interprofessionnel Laitier pour la durée de l'expérimentation (annexe 5, tableau 3a à 3d).

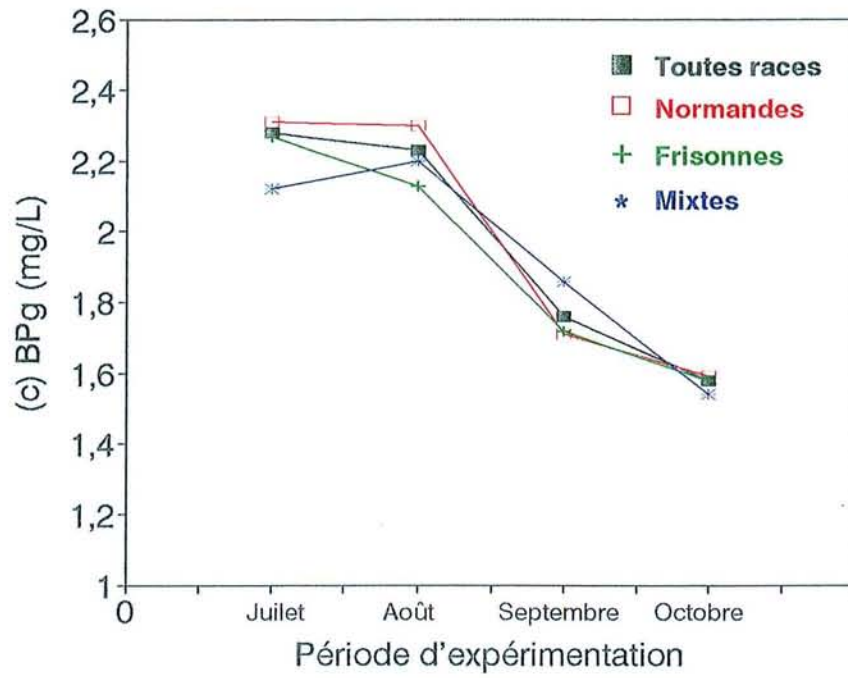


FIGURE 8.1: MOYENNES MENSUELLES DES TENEURS EN CASEINE β ET BP_g POUR LA PERIODE D'EXPERIMENTATION

B.4.1/ BPg et autres paramètres des laits

La comparaison des teneurs en BPg aux autres paramètres des laits ne révèle aucune corrélation significative (n=78), à l'exception du lactose (seuil de 5%) (tableau 8.3).

Cette signification demande à être confirmée (ou infirmée) par des études portant sur un nombre plus élevé d'échantillons, aucun lien connu à l'heure actuelle ne liant les deux paramètres.

Les teneurs en BPg et matière protéique totale, matière grasse, extrait sec total n'ont aucun lien statistique sur la période étudiée. Le faible lien observé avec le lactose demande confirmation.

B.4.2/ Caséine β et autres paramètres des laits

Les corrélations entre les teneurs en caséine β et les autres paramètres des laits ont permis d'observer un certain nombre de liens (tableau 8.3) :

On observe une corrélation au seuil de 1 pour 1000 entre la caséine β et la matière protéique totale, la matière grasse et l'extrait sec total, au seuil de 1 pour 100 entre la caséine β et le lactose (n = 14). Tous ces autres paramètres sont liés entre eux à des seuils allant de 5 pour 100 à 1 pour 1000 (n = 14).

Il est remarquable de constater que l'on obtient des corrélations au seuil de risque inférieur à 1 pour 1000 alors que les paramètres sont comparés avec des techniques d'évaluation très différentes (INM, spectrométrie infra-rouge et pesée).


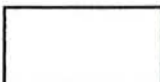
De ces résultats, on peut estimer que la qualité d'un lait est un phénomène global : un lait riche en caséine β le sera aussi en matière protéique totale, matière grasse et lactose (son extrait sec total sera par conséquent élevé).

Tous les paramètres testés sont fortement corrélés entre eux. Il n'y a donc pas de dissociation des teneurs en protéines, matières grasses et sucres : la qualité d'un lait est indivisible.

TABLEAU 8.5 : LIENS STATISTIQUES ENTRE LES TENEURS DES DIFFERENTS PARAMETRES DES LAITS ETUDIES

| | CASEINE BETA | MATIERE PROTEIQUE | MATIERE GRASSE | LACTOSE | EXTRAIT SEC TOTAL |
|-------------------|--------------|-------------------|----------------|---------|-------------------|
| PLASMINOGENE | -0,173 | -0,155 | -0,129 | 0,272 | -0,151 |
| CASEINE BETA | | 0,862 | 0,800 | 0,697 | 0,922 |
| MATIERE PROTEIQUE | | | 0,585 | 0,711 | 0,889 |
| MATIERE GRASSE | | | | 0,669 | 0,823 |
| LACTOSE | | | | | 0,803 |

SIGNIFICATION :

| | | | |
|---|----------------|---|------------------|
|  | seuil de 0,001 |  | seuil de 0,05 |
|  | seuil de 0,01 |  | Non significatif |

E/ Conclusion

Nous avons étudié les variations chronologiques des teneurs en BPg et caséine β sur une durée de 4 mois (2 mois d'été et 2 mois d'automne). Les laits testés provenaient de troupeaux sélectionnés selon la race dominante et les teneurs en caséine β des 9 mois précédant l'expérimentation.

De cette étude, il ressort les informations suivantes :

- Les troupeaux de race Normande confirment leur supériorité en termes de production de caséine β par rapport à la race Frisonne, puisque les deux populations ont un écart moyen de 1,15 g au litre.

- On n'observe aucune différence significative due à la race entre les teneurs en BPg des deux populations.

- Les deux paramètres n'ont aucun lien statistique sur les 4 mois de l'étude. Mais l'évolution des résultats doit nous inciter à beaucoup de prudence quant à leur extrapolation sur l'année.

- Les autres paramètres étudiés dans les laits sélectionnés sont statistiquement très liés à la caséine β , mais indépendants du BPg.

En conclusion, ces résultats permettent de mieux cerner l'importance de la caséine β dans l'évaluation de la qualité de laits de troupeau et de définir la qualité comme un facteur global faisant intervenir les protéines, les graisses et les sucres. Le plasminogène bovin semble, pour sa part, évoluer de façon indépendante de son substrat. Une étude annuelle permettrait de mieux évaluer ses variations saisonnières et de les comparer à celles de la caséine β pour définir les périodes les plus favorables à la production de laits de qualité supérieure.

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE

Le but de ce travail était de développer une méthode de dosage du plasminogène qui puisse s'appliquer dans divers milieux biologiques. L'immunonéphélométrie microparticulaire nous a permis de doser cette proenzyme dans le sang humain et le lait bovin, deux milieux où les conséquences de la protéolyse qu'elle implique sont très différentes. Les systèmes mis au point pour les deux milieux sont bâtis sur le même principe et le dosage du plasminogène humain a pu servir de base pour le développement du dosage du plasminogène bovin.

Dans une première partie, nous avons détaillé la mise au point du dosage du plasminogène dans le sang humain. Celui-ci est basé sur la capture du plasminogène des échantillons par des Ac anti HPg couplés à des Ms. Cette capture est révélée par un As anti HPg, différent du premier.

Les échantillons sériques sont dilués sans autre pré-traitement et les différents réactifs sont ajoutés en deux étapes séparées de 30 minutes. Les lectures sont effectuées après une incubation de 60 minutes. Ces temps peuvent être aisément réduits dans l'optique d'un dosage "rapide" de l'HPg ; la méthode autorise en effet des lectures à des temps d'incubation variables sans préjudice sur les résultats, contrairement à l'INC.

Le système atteint un seuil de détection de 50 ng/mL, 20 fois plus sensible que celui de l'INC. La gamme d'étalonnage englobe les variations physiologiques et pathologiques de l'HPg (25 à 550 ng/mL). L'histogramme de répartition des valeurs obtenues sur 130 sérums individuels présente des classes moyenne médiane et modale confondues, égales à la classe 90-110 mg/L.

L'étude de la validation fait apparaître l'exactitude de la méthode avec des récupérations de surcharges et dilutions satisfaisantes (pente de la droite de régression égale à 1,01). Il en est de même pour la fidélité dont les CV restent inférieurs à 12% sur l'ensemble de la gamme de dosage. La comparaison avec la technique d'INC met en évidence les insuffisances de cette dernière, notamment les sur-estimations fréquentes des teneurs en HPg de sérums.

Ce dosage présente un certains nombre d'intérêts :

- Associé à un dosage de l'activité enzymatique, il permet de poser un certain nombre de diagnostics, notamment dans le cas de maladies thrombolytiques; il peut être un marqueur utile et précoce de la sévérité de certaines pathologies hépatiques.

- Ce système sera utilisé comme modèle pour le dosage du plasminogène bovin.

Dans une deuxième partie, utilisant la grande homologie entre les séquences des plasminogènes humain et bovin (78% en moyenne), nous avons mis au point le dosage du plasminogène bovin dans le lait.

Ainsi, dans un premier temps, la mise au point et la validation du dosage du plasminogène bovin en milieu synthétique a été effectuée en adaptant le système précédent : immunocapture du BPg par des Ac anti HPg couplés à des Ms. Dans ce cas, la réaction est révélée par un As anti BPg. Après optimisation, le seuil de sensibilité de ce système "inter-espèces" est de 20 ng/mL.

Cette sensibilité est toutefois insuffisante compte tenu des teneurs du lait en plasminogène.

C'est pourquoi, dans un deuxième temps, un système "mono-espèce", plus performant, a été construit. Avec celui-ci, les Ac fixés sur les Ms sont des Ig anti BPg purifiés par nos soins. La capture du BPg est révélée par les mêmes Ac. Après optimisation des différents paramètres du dosage, le seuil de détection est de 5 ng/mL. Le passage à un système totalement bovin permet donc un gain d'un facteur 4, ce qui est suffisant pour des échantillons de lait, dont la dilution finale dans le milieu de dosage sera 1/200.

Cependant, l'application de ce système au lait nous a imposé une étude approfondie de l'influence d'un tel milieu sur les Ms polyacryliques et leur agglutination.

En effet, l'INM est une méthode particulièrement bien adaptée dans le cas des protéines du lait ayant des concentrations supérieures à 0.1 mg/mL, puisqu'une haute dilution permet alors de s'affranchir de toute influence du lait. Il n'en est pas de même pour le BPg, dont les teneurs dans le lait impliquent, au vu de la sensibilité du système, une plus faible dilution des échantillons. L'influence du lait à la dilution 1/200 a été étudiée sur un modèle de Ms sensibilisées par des IgG bovines.

Il en ressort que, à concentration élevée, les caséines α_S , β et κ inhibent l'agglutination des Ms de façon aspécifique. Une stabilisation des Ms par renforcement de leur charges négatives de surface, par la présence du domaine hydrophile des caséines, les portions hydrophobes de celles-ci interagissant avec la matrice interne des Ms, pourrait expliquer le phénomène observé.

Parmi les différents traitements testés, la précipitation des caséines à leur pHi (4.6) a été retenue pour le dosage du BPg, puisqu'elle en élimine de façon répétable plus de 99%.

Le dosage du BPg dans des laits bovins par INM nécessite donc un pré-traitement des échantillons. Celui-ci consiste d'abord en une séparation du plasminogène et des caséines du lait par utilisation d' ϵ AAC suivi d'une précipitation de ces dernières à leur pHi. Le surnageant constituera le milieu analysé. Un tel traitement élimine des quantités minimales de plasminogène (5% en moyenne).

L'étalon utilisé est fabriqué par nos soins. C'est un lactosérum synthétique contenant une quantité connue de BPg. Il est sensé reproduire au maximum le milieu de l'échantillon. La répétabilité de l'étalonnage présente des CV inférieurs à 4% sur tous les points de la gamme. La récupération des surcharges après pré-traitement et dosage est en moyenne de 87%.

Après avoir effectué la validation de ce dosage dans le lait, nous l'avons appliqué, ainsi que celui de la caséine β , à des laits de 14 troupeaux. Ceux-ci ont été sélectionnés selon des critères de race et de taux caséinique. L'étude s'est déroulée sur 4 mois.

La teneur en BPg des laits de troupeau varie sur cette période de 1,05 à 3,35 mg/L; elle est indépendante de la race dominante du troupeau. La caséine β varie de 4,7 à 9,7 g/L et présente une différence significative entre les troupeaux de race Normande et ceux de race Frisonne. Les valeurs sont en moyenne plus élevées de 1,15 g/L en faveur des premières.

L'évolution des teneurs en BPg est indépendante de celles en caséine β , et de celles d'autres facteurs tels que la matière protéique totale, matière grasse, lactose, extrait sec total. La caséine β est, en revanche, statistiquement liée à ces paramètres et l'on constate que la notion de qualité est un phénomène global dans le lait.

En conclusion, le dosage du plasminogène par INM a été construit en milieu synthétique, sang et lait. Ce dosage a été validé dans ces différents milieux. Il a permis, associé à celui de son substrat principal, d'évaluer leur influence sur la qualité de laits de troupeau.

Un certain nombre de perspectives peuvent être envisagées à partir de ce travail :

Tout d'abord, il serait intéressant d'affiner nos outils analytiques par l'utilisation pour le dosage d'anticorps monoclonaux. Ceux-ci pourraient peut-être permettre de

différencier le plasminogène de la plasmine de façon à avoir un état exact de l'activation du système dans le lait.

Muni de ces outils, il serait ensuite intéressant de comparer les teneurs en plasminogène et plasmine de laits pathologiques (laits mammites, par exemple) ou dans des fromages.

Enfin, l'étude des teneurs en plasminogène de laits de troupeau sur un cycle annuel pourrait faire apparaître d'éventuelles variations saisonnières et confirmer ou infirmer l'absence de liens avec la caséine β . La connaissance de maxima ou de minima pour le BPg pourrait alors intervenir dans l'évaluation de la qualité globale des laits.

D'un point de vue économique, les dosages mis au point par INM devraient permettre aux industriels de mieux définir la qualité des laits qu'ils utilisent. Il semble d'ailleurs que, grâce à l'impulsion de certains d'entre eux, l'on s'achemine dans les années à venir vers une plus grande prise en compte des teneurs en caséine, notamment pour le paiement des laits.

Toutefois, beaucoup d'obstacles restent à franchir avant la généralisation de telles perspectives. Il est par exemple dommage qu'aucun standard international n'existe pour le dosage immunochimique des protéines du lait.

Nous espérons que ce travail puisse apporter des réponses concrètes aux espérances des professionnels de la filière lait quant à l'importance des dosages immunochimiques dans ce secteur.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- AALTONEN M.L., LEHTONEN M., LEHDONKIVI T. and ANTILA V. (1988). Plasmin activity in milk. *Milchwissenschaft*, **43**, 573-576.
- AILLAUD M.F. (1993). Physiologie et exploration du système fibrinolytique: données récentes. *Revue Française des Laboratoires*, **249**, 63-66.
- AIMUTIS W.R. and EIGEL W.N. (1982). Identification of λ -casein as plasmin derived fragments of bovine α S1-casein. *J. Dairy Sci.*, **65**, 175-181.
- ALAIS C. (1984). Science du lait. Principe des techniques laitières. 4ème ed., éd. par Sepaic, Paris.
- ANDRADE-GORDON P. and STRICKLAND S. (1986). Interaction of Heparin with Plasminogen Activators and Plasminogen: Effects on the Activation of Plasminogen. *Biochemistry*, **25**, 4033-4040.
- ANDREWS A.T. (1978a). The composition, structure and origin of proteose-peptone component 5 of bovine milk. *Eur. J. Biochem.*, **90**, 59-65.
- ANDREWS A.T. (1978b). The composition, structure and origine of proteose-peptone component 8 F of bovine milk. *Eur. J. Biochem.*, **90**, 67-81.
- ANDREWS A.T. (1983). Proteinases in normal bovine milk and their action on caseins. *J. Dairy Sci.*, **50**, 45-55.
- ANDREWS A.T. and ALICHANIDIS E. (1983). Proteolysis of caseins and the proteose-peptone fraction of bovine milk. *J. Dairy Sci.*, **50**, 275-290.
- ANDREW A.T. (1993). Indigenous enzymes in milk.I: General Introduction. In "Advanced Dairy Chemistry - 1: Proteins", P.F. Fox, ed by Elsevier Applied Science, London, 286-292.
- ANGLES-CANO E., ROUY D. and LIJNEN H.R. (1992). Plasminogen binding by α 2-antiplasmin and histidin-rich glycoprotein does not inhibit plasminogen activation at the surface of fibrin. *Biochim. Biophys. Acta*, **1156**, 34-42.

AOKI N., MOROI M., SAKATA Y., YOSHIDA N. and MATSUDA M. (1977). Abnormal Plasminogen. A hereditary molecular abnormality found in a patient with recurrent thrombosis. *J. Clin. Invest.*, **61**, 1186-1195.

AOKI N. and HARPEL P.C. (1984). Inhibitors of the Fibrinolytic Enzyme System. *Sem. Thromb. Haemost.*, **10**, 24-41.

AOKI T., TOYOOKA K. and KAKO Y. (1985). Role of phosphate groups in the calcium sensitivity of α -S2 casein. *J. Dairy Sci.*, **68**, 1624-1629.

ARNDT A., MUPHY P. and HART D.A. (1992). Human HuH-7 hepatoma cells express urokinase and plasminogen activator inhibitor-1: identification, characterization and regulation by inflammatory mediators. *Biochim. Biophys. Acta*, **1138**, 149-156.

BACHMANN F. (1986). Physiologie du système fibrinolytique. In "Fibrinolyse et Thrombolyse", J.P. Caen, G. Tobelem et C. Soria, éd. par Masson, Paris, 1-29.

BANYAI L., VARADI A. and PATTHY L. (1983). Common evolutionary origin of the fibrin-binding structures of fibronectin and tissue-type plasminogen activator. *FEBS Letters*, **163**, 37-41.

BARK L.S. and HADIPRANOTO N. (1991). A rapid method for determining the casein content of milk. *Journal of Thermal Analysis*, **37**, 183-193.

BARNHART M.I. and RIDDLE J.M. (1963). Cellular localisation of Profibrinolysis (Plasminogen). *Blood*, **21**, 306-321.

BAS B.M., COSTONGS G.M.P.J. and JANSON P.C.W. (1987). Rapid Determination of Five Coagulation Parameters in One Sample with a Centrifugal Analyzer. *Haemostasis*, **17**, 260-267.

BASCH J.J., DOUGLAS JR. F.W., PROCINO L.G., HOLSINGER V.H. and FARRELL JR. H.M. (1985). Quantitation of Caseins and Whey Proteins of Processed Milks and Whey Protein Concentrates, Applications of Gel Electrophoresis, and Comparison with Harland-Ashworth Procedure. *J. Dairy Sci.*, **68**, 23-31.

- BASTIAN E.D., HANSEN K.G. and BROWN R.D. (1993). Inhibition of Plasmin by β -Lactoglobulin Using Casein and a Synthetic Substrate. *J. Dairy Sci.*, **76**, 3354-3361.
- BAUD M. (1988). Traitement informatique des courbes d'étalonnage en immuno-analyse. C.R. de l'atelier "Pièges en immuno-analyse", Colloque International de Biologie Prospective, Pont-à-Mousson.
- BELLUCCI S. (1986). Fibrinolyse et maladies hématologiques. In "Fibrinolyse et Thrombolyse", J.P. Caen, G. Tobelem et C. Soria, éd. par Masson, Paris, 79-84.
- BENSLIMANE S., DOGNIN-BERGERET M.J., BERDAGUE J.L. and GAUDEMER Y. (1990). Variation with season and lactation of plasmin and plasminogen concentration in Montbeliard cow's milk. *J. Dairy Res.*, **57**, 423-435.
- BERG W., KORSAN-BENGTSEN K. and YGGE J. (1966). Determination of plasminogen in human plasma by the lysis time method. *Thromb. Diath. Haemorrh.*, **16**, 1-17.
- BERG K., DAHLEN G. and HEIKKI FRICK M. (1974). Lp(a) lipoprotein and pre- β 1-lipoprotein in patients with coronary heart disease. *Clin. Genet.*, **6**, 230-235.
- BERTRAND O. (1986). Plasminogène humain, automatisation de la purification et études sur les interactions avec les colorants. Thèse Doctorat ès Sciences, Université Paris VII.
- BESSOU T. (1985). Immunonéphélométrie à supports microparticulaires. Thèse de Docteur-Ingénieur, Université de Nancy I.
- BLANC D. (1982). Les protéines du lait à activité enzymatique et hormonale. *Le Lait*, **62**, 350-395.
- BLASI F., VASSALLI J.D. and DANO K. (1987). Urokinase-Type Plasminogen Activator: Proenzyme, Receptor, and Inhibitors. *J. Cell Biol.*, **104**, 801-804.
- BOK R.A. and MANGEL W.F. (1985). Quantitative Characterization of the Binding of Plasminogen to Intact Fibrin Clots, Lysine-Sepharose, and Fibrin Cleaved by Plasmin. *Biochemistry*, **24**, 3279-3286.

- BONSING J. and Mac KINLAY A.G. (1987). Recent studies on nucleotide sequences encoding the caseins. *J. Dairy Res.*, **54**, 447-461.
- BOOTH N.A., ANDERSON J.A. and BENNETT B. (1984). Plasminogen activators in alcoholic cirrhosis: demonstration of increased tissue type and urokinase type activator. *J. Clin. Pathol.*, **37**, 772-777.
- BOREL J. et RANDOUX A. (1987). Méthodes chromatographiques. In "Appareils et méthodes en Biochimie", P. Kamoun, 3eme édition, éd. par Flammarion, Paris, 176 et seq.
- BORQUE L., CAMBIASO C., LAVENNE E., LEAUTAUD P., MARESCHAL J.C. and COLLET-CASSART D. (1989). Immunoassay by Particle Counting for Coagulation Testing: Application to the determination of Antithrombin III, von Willebrand Factor Antigen (vWF:Ag) and Plasminogen. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, **27**, 175-179.
- BOYADJIAN H.P. (1991). Bilirubin or plasminogen - which is better in the assessment of the severity of viral hepatitis? *Gastroenterol. J.*, **51**, 56-61.
- BRADFORD M.M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.
- BRANDEN C. and TOOGE J. (1991). An Example of Enzyme Catalysis: Serine Proteinases. In "Introduction to Protein Structure", ed. by Garland Publishing, 231-246.
- BROCKWAY W.J. and CASTELLINO F.J. (1972). Measurement of the Binding of Antifibrinolytic Amino Acids to Various Plasminogens. *Arch. Biochem. Biophys.*, **151**, 194-199.
- BURTIN P. AND FONDANECHÉ M.C. (1988). Receptor for Plasmin on Human Carcinoma Cells. *J. Natl. Cancer Inst.*, **80**, 762-765.
- CARLES C. and RIBADEAU-DUMAS B. (1986). Determination of gradient elution conditions for the separation of peptide mixtures by reverse-phase high-performance liquid chromatography: bovine β casein tryptic digest. *J. Dairy Res.*, **53**, 595-600.

- CARROLL R.J. and FARRELL JR. H.M. (1983). Immunological approach to location of κ casein in the casein micelle by electron microscopy. *J. Dairy Sci.*, **66**, 679-686.
- CASADO CIMIANO P., PENA HERRERIA J. and CARDON V. (1990). Rapid determination of casein in milk (abst.). In "Brief communication of the XXIII International Dairy Congress", Montreal, October 8-12, vol I.
- CASTELLINO F.J. (1981). Recent Advances in the Chemistry of the Fibrinolytic System. *Chemical Reviews*, **81**, 431-446.
- CASTELLINO F.J. and BEALS J.M. (1987). The genetic relationships between the kringle domains of human Plasminogen, prothrombin, tissue-type plasminogen activator, urokinase, and coagulation factor XII. *J. Mol. Evol.*, **26**, 358-369.
- CASTELLINO F.J., URANO T., DE SERRANO V., MORRIS J.P. and CHIBBER B.A.K. (1988). Control of Human Plasminogen Activation. *Haemostasis*, **18**: suppl. 1, 15-23.
- CHAMBA J.F. (1991). Protéines et rendement en fromagerie de pâte cuite. In colloque "Protéines et rendements en Industries Laitières", E.N.S.A.I.A., Nancy, 2-3 Octobre.
- CHAPMAN H.A. and STONE O.L. (1985). Characterization of a macrophage-derived plasminogen-activator inhibitor -similarity with placental urokinase inhibitor. *Biochem. J.*, **230**, 109-116.
- CHEN J.H. and LEDFORD R.A. (1971). Purification and characterization of milk protease. *J. Dairy Sci.*, **54**, 763 (abstract M70).
- CHOISY C., DESMAZEAUD M., GRIPON J.C., LAMBERET G., LENOIR J. et TOURNEUR C. (1984). Les phénomènes microbiologiques et enzymatiques et la biochimie de l'affinage. In "Le fromage" A. Eck, éd par Tec. Doc. Lavoisier, Paris.
- CHRISTENSEN U. and MOLGAARD L. (1992). Positive co-operative binding at two weak lysine-binding sites governs the Glu-plasminogen conformational change. *Biochem. J.*, **285**, 419-425.

- CHTOUROU A., BRIGNON B. and RIBADEAU-DUMAS B. (1985). Quantification of β -casein in human milk. *J. Dairy Res.*, **52**, 239-247.
- CHURCH W.R. and MESSIER T.L. (1991) Inhibition of Plasminogen Activation by Monoclonal Antibodies to the Kringle 5-B Chain Segment of Human Plasminogen. *Hybridoma*, **10**, 659-672.
- CLAEYS H., MOLLA A. and VERSTRAETE M. (1973). Conversion of NH₂-terminal glutamic acid to NH₂-terminal lysine human Plasminogen by Plasmin. *Thromb. Res.*, **3**, 515-523.
- CLIQUET F., CUILIERE M.L., MONTAGNE P. and DUHEILLE J. (1993). Interactions of complement fraction C1q, fibronectin, and immunoglobulin G with polyacrylic microparticles used as solid-phase in immunoassay. *J. Biomed. Mater. Res.*, **27**, 587-597.
- COLIN O. (1990). Taux protéique et qualité fromagère des laits. Maîtrise des facteurs de production. Thèse docteur I.N.P.L. (Institut National Polytechnique de Lorraine).
- COLIN O. et LAURENT F. (1991). Qualité du lait et transformation fromagère. In colloque "Protéines et rendements en Industries Laitières", E.N.S.A.I.A., Nancy, 2-3 Octobre.
- COLLARD-BOVY C., MARCHAL E., HUMBERT G., LINDEN G., MONTAGNE P., EL BARI N and DUHEILLE J. (1991). Microparticle Enhanced Nephelometric Immunoassay: I-Measurement of α S and κ Casein. *J Dairy Sci*, **74**, 3695-3701.
- COLLEN D., SCHLOTT B., ENGELBORGHIS Y., VAN HOEF B., HARTMANN M., LIJNEN H.R. and BEHNKE D. (1993). On the Mechanism of the Activation of Human Plasminogen by Recombinant Staphylokinase. *J. Biol. Chem.*, **268**, 8284-8289.
- COLLEN D. and VERSTRAETE M. (1975). Molecular biology of human plasminogen. II: Metabolism in physiological and some pathological conditions in man. *Thrombos. Diathes. haemorrh.*, **34**, 403-408.
- COLLEN D. and WIMAN B. (1979). Turnover of Antiplasmin, the Fast-Acting Plasmin Inhibitor of Plasma. *Blood*, **53**, 313-324.

- COLLEN D. and LIJNEN H.R. (1991). Basic and Clinical Aspects of Fibrinolysis and Thrombolysis. *Blood*, **78**, 3114-3124.
- COLLIN J.C., COMPAGNONE P., RYBA I. and BAER A. (1988). Determination of plasmin (alkaline milk proteinase) and chymosin in milk products by the ELISA assay. *Le Lait*, **68**, 235-239.
- CORREC P., KOSTNER G.M. and BURTIN P. (1990). A comparative study of the localization of plasminogen and apolipoprotein(a) in human carcinomas. *Thromb Res.*, **58**, 213-220.
- CORRIGAN J.J.Jr and JETER M.A. (1990). Histidine-Rich Glycoprotein and Plasminogen Plasma Levels in Term and Preterm Newborns. *A.J.D.C.*, **144**, 825-828.
- CUMMINGS H.S. and CASTELLINO F.J. (1984). Interaction of Human Plasmin with Human alpha2-Macroglobulin. *Biochemistry*, **23**, 105-111.
- DALGLEISH D.G., HORNE D.S. and LAW A.J.R. (1989). Size-related differences in bovine casein micelles. *Biochim. Biophys Acta*, **991**, 383-387.
- DALGLEISH D.G. (1993). The enzymatic coagulation of milk. In "Advanced Dairy Chemistry - 1: Proteins", P.F. FOX, ed by Elsevier Applied Science, London, 579-619.
- DASTRE A., cité par SORIA et al (1986).
- DAVIES D.T. and LAW A.J.R. (1977). The composition of whole casein from the milk of Ayrshire cows. *J. Dairy Res.*, **44**, 447-454.
- DAVIES D.T. and LAW A.J.R. (1980). The content and composition of protein in creamery milks in south-west Scotland. *J. Dairy Res.*, **47**, 83-90.
- De BRUIN P.A.F., GRIFFIOEN G., VERSPAGET H.W., VERHEIJEN J.H. and LAMERS C.B.H.W. (1987). Plasminogen Activators and Tumor Development in the Human Colon: Activity Levels in Normal Mucosa, Adenomatous Polyps, and Adenocarcinomas. *Cancer Res.*, **47**, 4654-4657.

- DECLERCK P.J. (1993). Immunological Methods to Study the Fibrinolytic System. *Fibrinolysis*, **4**, 9-10.
- De MUNK G.A.W. and RIJKEN D.C. (1990). Fibrinolytic Properties of Single Chain Urokinase-type Plasminogen Activator (Pro-urokinase). *Fibrinolysis*, **4**, 1-9.
- DEPOLI P., BACON-BAGULEY T., KENDRA-FRANCZAK S., CEDERHOLM M.T. and WALZ D.A. (1989). Thrombospondin Interaction With Plasminogen. Evidence for Binding to a Specific Region of the Kringle Structure of Plasminogen. *Blood*, **73**, 976-982.
- De RHAM O. and ANDREWS A.T. (1982). The roles of native milk proteinase and its zymogen during protolysis in normal bovine milk. *J. Dairy Res.*, **49**, 577-583.
- DESNOUVEAUX R. (1984). Contribution à l'étude biochimique d'un lait cru: exemple du bassin d'Isigny-sur-mer. Thèse de Docteur ès Sciences, Université de Nancy I.
- DESNOYERS P., MICHEL P.L., VAHANIAN A. et SAMAMA M. (1988). Activateurs tissulaires du plasminogène (tPA). Leur avenir dans le traitement de l'infarctus du myocarde. *Médecine / sciences*, **4**, 222-230.
- DEUTSCH D.G. and MERTZ E.T. (1970). Plasminogen: Purification from Human Plasma by Affinity Chromatography. *Science*, **170**, 1095-1096.
- DONNELLY W.J., BARRY J.G. and BUCHHEIM W. (1984). Casein micelle composition and syneretic properties of late lactation milk. *Irish Journal of Food Science and Technology*, **8**, 121-130.
- DOSQUET-BERNARD C. and CAMEZ A. (1986). Fibrinolyse des cancers. In "Fibrinolyse et Thrombolyse", J.P. Caen, G. Tobelem et C. Soria, ed par Masson, Paris, 70-74.
- DRIESSEN F.M., Van HOOYDONK A., STREUPER A. and KINGMA F. (1981). Influence of native milk proteinase on the viscosity of U.H.T.-sterilized custard during storage. *Neth. Milk Dairy J.*, **35**, 121-131.
- DRIOU A., GODBILLON G. and LINDEN G. (1984). Determination of skim milk powder content in animal foodstuffs by a rocket immunoelectrophoretic method. Special publication, *Royal Society of Chemistry*, n°**49**, 334.

DUFFY M.J. (1990). Plasminogen activators and cancer. *Blood Coag. Fibrinol.*, **1**, 681-687.

DUFFY M.J., O'GRADY P., DEVANEY D., O'SIORAIN L., FENNELLY J.J. and LIJNEN H.R. (1988). Tissue-type Plasminogen Activator, a New Pronostic Marker in Breast Cancer. *Cancer Res.*, **48**, 1348-1349.

DUHEILLE J., PAU B. and GROS P. (1982). 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*, EP00104101B.

DUPLAN J.M. (1991). Taux protéiques: facteurs génétiques et de conduite. In colloque "Protéines et rendements en Industries Laitières", E.N.S.A.I.A., Nancy, 2-3 Octobre.

DYERBERG J. and STOFFERSEN E. (1980). Recurrent Thrombosis in a Patient with Factor XII Deficiency. *Acta haemat.*, **63**, 278-282.

EATON D.L., FLESS G.M., KOHR W.J., McLEAN J.W., XU Q.-T., MILLER C.G., LAWN R.M. and SCANU A.M. (1987). Partial amino acid sequence of apolipoprotein(a) shows that it is homologous to plasminogen. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **84**, 3224-3228.

EDELBERG J.M. and PIZZO S.V. (1992). Lipoprotein(a) promotes plasmin inhibition by α 2-antiplasmin. *Biochem. J.*, **286**, 79-84.

EIGEL W.N. (1977). Effect of bovine plasmin on α S1-B and κ -A caseins. *J. Dairy Sci.*, **60**, 1399-1403.

EIGEL W.N., HOFMANN C.J., CHIBBER B.A.K., TOMICH J.M., KEENAN T.W. and MERTZ E.T. (1979). Plasmin-mediated proteolysis of casein in bovine milk. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 2244-2248.

EIGEL W.N. and KEENAN (1979). Identification of proteose peptone component 8-slow as a plasmin-derived fragment of bovine β -casein. *Int. J. Biochem.*, **10**, 529-535.

EINARSSON M., BRANDT J. and KAPLAN L. (1985). Large-scale purification of human tissue-type plasminogen activator using monoclonal antibodies. *Biochim. Biophys. Acta*, **830**, 1-10.

EI BARI N., MONTAGNE P., HUMBERT G., CUILLIERE M.L., VARCIN P., LINDEN G. and DUHEILLE J. (1991). Development of a Microparticle-enhanced Nephelometric Immunoassay for the Quantitation of β Casein in Milk. *Food and Agricultural Immunology*, **3**, 63-71.

EI HAMOUI A.K., MONTAGNE P., HUMBERT G., KITTLER H. and DUHEILLE J. (1982). Dosage immunonéphélométrique des principales protéines du lait de vache. *Ann. Biol. Clin.*, **10**, 449.

ELIASSON M., EVRIN P.E., LUNDBLAD D., ASPLUND K. and RANBY M. (1993). Influence of Gender, Age and Sampling Time on Plasma Fibrinolytic Variables and Fibrinogen. *Fibrinolysis*, **7**, 316-323.

EVANS M.T.A. and PHILLIPS M.C. (1979). The Conformation and Aggregation of Bovine β Casein A. II. Thermodynamics of Thermal Association and the Effects of Changes in Polar and Apolar Interactions on Micellization. *Biopolymers*, **18**, 1123-1140.

FARRELL H.M.Jr., BROWN E.M. and KUMOSINSKI T.F. (1993). Three-dimensional molecular modeling of bovine caseins. *Food Structure*, **12**, 235-250.

FELBER J.P. (1978). Radioimmunoassay in the clinical chemistry laboratory. *Adv. Clin. Chem.*, **20**, 130-140.

FRANCIS C.W. and MARDER V.J. (1982). A Molecular Model of Plasmic Degradation of Crosslinked Fibrin. *Sem. Thromb. Hemost.*, **8**, 25-35.

FREDENBURGH J.C. and NESHEIM M.E. (1992). Lys-plasminogen Is a Significant Intermediate in the Activation of Glu-plasminogen during Fibrinolysis in Vitro. *J. Biol. Chem.*, **267**, 26150-26156.

FRIBERGER P. and KNOS M. (1979). Plasminogen determination in human plasma. In "Chromogenic peptide substrates", M.F. Scully and V.V. Kakkar, ed by Churchill Livingstone, Edinburgh, 128-140.

FUKUYAMA Y., KODAMA M., MIURA I., KINZYO Z., MORI H., NAKAYAMA Y. and TAKAHASHI M. (1990). Anti-plasmin Inhibitor. VI: Structure of Phlorofucofuroeckol A, a Novel Phlorotannin with Both Dibenzo-1,4-dioxin and Dibenzofuran Elements, from *Ecklonia kurome* OKAMURA. *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 133-135.

GAFFNEY P.J. (1988). Standardization of Plasminogen Assays. *Haemostasis*, **18**: suppl. 1, 47-60.

GALAUP F. (1991). Les techniques expérimentales à valeur prédictive. In colloque "Protéines et rendements en industries laitières". E.N.S.A.I.A., Nancy, 2-3 octobre.

GALLAGHER J.T., LYON M. and STEWARD W.P. (1986). Structure and function of heparan sulphate proteoglycans. *Biochem J.*, **236**, 313-325.

GAVRILOVIC J. and MURPHY G. (1989). The role of Plasminogen in Cell-mediated Collagen. *Cell Biol. Int. Rep.*, **13**, 367-375.

GED J. et ALAIS C. (1976). Activité protéasique persistant dans les laits stérilisés. *Le Lait*, **56**, 645-656.

GONZALEZ-GRONOW M., GRENETT H.E., FULLER G.M. and PIZZO S.V. (1990). The role of carbohydrate in the function of human plasminogen: comparison of the protein obtained from molecular cloning and expression in *Escherichia coli* and COS cells. *Biochim. Biophys. Acta*, **1039**, 269-276.

GORELIK U., LINDNER A. and MAYER M. (1990). Protease and Plasminogen Activator Activity in Human Bladder Carcinoma. *Br. J. Urol.*, **66**, 170-174.

GRANGE J., ROCH A.M. and QUASH G.A. (1977). Nephelometric assay of antigens and antibodies with latex particles. *J. Immunol. Methods*, **18**, 365-375.

GRAPPIN R. (1986). Guide pour l'évaluation des méthodes de routine. *Le Lait*, **66**, 608-621.

GRAPPIN R. ET RIBADEAU-DUMAS B. (1993). Analytical methods for milk proteins. In "Advanced Dairy Chemistry -1: Proteins", P.F. Fox, ed by Elsevier Applied Science, London, 310-321.

GREENBERG R. and GROVES M.L. (1984). Plasmin cleaves human β -casein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **125**, 463-468.

GRIFFIN A.T., HICKEY M.W. and Mac LEAN D.M. (1974). Variations saisonnières dans les constituants protéiques du lait utilisé pour la fabrication. XIX° Int. Dairy Congr., Dehli., Vol.3, 111-112.

GRONDAHL-HANSEN J., AGERLIN N., MUNKHOLM-LARSEN P., BACH F., NIELSEN L.S., DOMBERNOWSKY P. and DANO K. (1987). Sensitive and specific enzyme-linked immunosorbent assay for urokinase-type plasminogen activator and its application to plasma from patients with breast cancer. *J. Lab. Clin. Med.*, **111**, 42-51.

GRUFFERTY M.B. (1986). Alkaline Milk Proteinase: some of its characteristics and its influence and that of milk salts on some processing properties of milk. Ph. D. thesis, National University of Ireland.

GRUFFERTY M.B. and FOX P.F. (1988a). Milk alkaline proteinase. *J. Dairy res.*, **55**, 609-630.

GRUFFERTY M.B. and FOX P.F. (1988b). Factors affecting the release of plasmin activity from casein micelles. *N.Z. J. Dairy Sci. Technol.*, **23**, 153-164.

GUILLOU H., MIRANDA G. et PELISSIER J.P. (1987). Analyse quantitative des caséines dans le lait de vache par chromatographie liquide rapide d'échange d'ions (FPLC). *Lait*, **67**, 135-148.

GUPTA B.B. (1983). Determination of native and denatured milk proteins by high-performance size-exclusion chromatography. *J. Chromatogr.*, **282**, 463-475.

HAENLEIN G.F.W., SCHULTZ L.H. and ZIKAKIS J.P. (1973). Composition of proteins in milk with varying leukocytes contents. *J. Dairy Sci.*, **56**, 1017-1024.

HAISSAT S. (1993). Etude des interactions moléculaires entre le pasminogène et les caséines du lait. DEA de microbiologie-enzymologie nutrition, Université de Nancy I.

HAJJAR K.A., HARPEL P.C., JAFFE E.A. and NACHMAN R.L. (1986). Binding of Plasminogen to Cultured Human Endothelial Cells. *J. Biol. Chem.*, **261**, 11656-11662.

HALL S.W., BRAUD L.L. and GONIAS S.L. (1989). Binding of bovine, ovine, porcine, canine, and rat plasminogen to rat hepatocytes and rat C6 glioma cells in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **164**, 1288-1294.

HALPAAP I., REIMERDES E.H. and KLOSTERMEYER H. (1977). Milchproteinasen. IV. Vergleichende Isolierung von plasminogen aus Rinderblut und einer Proteinase aus Kuhmilch. *Milchwissenschaft*, **32**, 341.

HARDY J. (1984). L'activité de l'eau et le salage des fromages. In "Le fromage" A. Eck, éd par Tec. Doc. Lavoisier, Paris.

HARPEL P.C. (1983). Protease inhibitors - a precarious balance (editorial). *N. Engl. J. Med.*, **309**, 725-726.

HARPEL P.C., SULLIVAN R. and CHANG T.-S. (1989). Binding and Activation of Plasminogen on Immobilized Immunoglobulin G. Identification of the plasmin-derived Fab as the plasminogen-binding fragment. *J. Biol. Chem.*, **264**, 616-624.

HAYES M.L. and CASTELLINO F.J. (1979a). Carbohydrate of the Human Plasminogen Variants. I. Carbohydrate composition, glycopeptide isolation, and characterization. *J. Biol. Chem.*, **254**, 8768-8771.

HAYES M.L. and CASTELLINO F.J. (1979b). Carbohydrate of the Human Plasminogen Variants. III. Structure of the O-glycosidically linked oligosaccharide unit. *J. Biol. Chem.*, **254**, 8777-8780.

HEDNER U. and NILSSON I.M. (1965). Determination of Plasminogen in Human Plasma by a Casein Method. *Thromb. Diath. Haemorrh.*, **14**, 545-561.

HEDNER U. and TENGBORN L. (1988). Characterizing Hereditary and Acquired Defects of Plasminogen. *Haemostasis*, **18**: suppl. 1, 87-92.

HENKIN J., MARCOTTE P. and YANG H. (1991). The Plasminogen-Plasmin System. *Progress in Cardiovascular Diseases*, **34**, 135-164.

HERSCH S.L., KUNELIS T. and FRANCIS R.B.Jr. (1987). The Pathogenesis of Accelerated Fibrinolysis in Liver Cirrhosis: A Critical Role for Tissue Plasminogen Activator Inhibitor. *Blood*, **69**, 1315-1319.

- HIEMENZ P.C. (1986). Light scattering. In "Principles of colloid and surface chemistry", Second Edition, Ed. by M. Dekker, New-York and Basel, 223-286.
- HIGHSMITH R.F. and KLINE D.L. (1971). Kidney : Primary Source of Plasminogen after Acute Depletion in the Cat. *Science*, **174**, 141-142.
- HOFMANN C.J., KEENAN T.W. and EIGEL W.N. (1979). Association of Plasminogen with Bovine Milk Fat Globule Membrane. *Int. J. Biochem.*, **10**, 909-917.
- HOLMES W.E., PENNICA D. and BLABER M. (1985). Cloning and expression of the gene for pro-urokinase in *Escherichia coli*. *Biotechnology*, **3**, 923-929.
- HOLLAR C.M., LAW A.J.R., DALGLEISH D.G. MEDRANO J.F. and BROWN R.J. (1991). Separation of β Casein A1, A2, and B Using Cation-Exchange Fast Protein Liquid Chromatography. *J. Dairy Sci.*, **74**, 3308-3313.
- HOLT C. and SAWYER L. (1988). Primary and predicted secondary structures of the caseins in relation to their biological functions. *Protein Eng.*, **2**, 251-259.
- HONKANEN-BUZALSKI T. and SANDHOLM M. (1981). Trypsin-inhibitors in mastitic milk and colostrum: correlation between trypsin-inhibitor capacity, bovine serum albumin and somatic cell contents. *J. Dairy Res.*, **48**, 213-223.
- HORIE N., OKAMOTO U. and TOGAWA C. (1982). Studies on the Plasminogen Activating System in Human Milk: VI. Differences in Properties Between Milk Activator and Glandular Kallikrein. *Acta Haematol. Jpn.*, **45**, 1099-1106.
- HORISBERGER M. and VAUTHEY M. (1984). Localization of κ casein in thin sections of casein micelles by the gold method. *Histochemistry*, **80**, 9-12.
- HORTIN G.L., GIBSON B.L. and FOK K.F. (1988). α 2-Antiplasmin's carboxy-terminal lysine residue is a major site of interaction with Plasmin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **155**, 591-596.
- HOYLAERTS M., RIJKEN D.C., LIJNEN H.R. and COLLEN D. (1982). Kinetics of the Activation of Plasminogen by Human Tissue Plasminogen Activator. Role of fibrin. *J. Biol. Chem.*, **257**, 2912-2919.

HUBER K., KIRCHHEIMER J.C., ERMLER D., BELL C. and BINDER B.R. (1992). Determination of Plasma Urokinase-type Plasminogen Activator Antigen in Patients with Primary Liver Cancer: Characterization as Tumor-associated Antigen and Comparison with α -Fetoprotein. *Cancer res.*, **52**, 1717-1720.

HUMBERT G. (1986). La protéase alcaline (plasmine) du lait: dosage, purification et implications en technologie laitière. Thèse Docteur ès Sciences, Université de Nancy I.

HUMBERT G. et LINDEN G. (1987). Influence de traitements des conditions technologiques sur le comportement de la plasmine et du plasminogène (protéase alcaline du lait). *Sci. Aliments*, **7**, Hors série VIII, 213.

HUMBERT G., BERBAR A., GODBILLON G., Le DEAUT J.Y. and LINDEN G. (1990). Purification of bovine milk alkaline proteinase and comparison with purified bovine blood plasminogen or plasmin. *Le lait*, **70**, 191-203.

HUMBERT G. (1991). Activité et implications technologiques de la plasmine. In colloque "Protéines et rendements en Industries Laitières", E.N.S.A.I.A., Nancy, 2-3 Octobre.

HUMBERT G., COLLARD-BOVY C., MARCHAL E., LINDEN G., MONTAGNE P., DUHEILLE J. (1991). Microparticle Enhanced Nephelometric Immunoassay: III- Applications to Milk and Dairy Products. *J. Dairy Sci.*, **74**, 3709-3715.

ICHINOSE A., TAKIO K. and FUJIKAWA K. (1986). Localization of the Binding Site of Tissue-Type Plasminogen Activator to Fibrin. *J. Clin. Invest.*, **78**, 163-169.

IGARASHI Y. (1989). A method for determination of γ casein and its use for investigating proteolysis in bovine milk. *J. Dairy Res.*, **56**, 619-629.

ISIS-2 (1988). Randomised trial of intravenous streptokinase, oral aspirine, both, or neither among 17 187 cases of suspected acute myocardial infarction. *The Lancet*, **ii**, 349-360.

ISIS-3 (1992). A randomised comparison of streptokinase vs tissue PA vs anistreplase and of aspirin plus heparin vs aspirin alone among 41299 cases of suspected acute myocardial infarction. *The Lancet*, **339**, 753-773.

ITG (Institut Technique du Gruyère) (1985 et 1986). Rapport d'activité. Groupe Régional Emmental Nord.

JENNESS R. and KOOPS J. (1962). Preparation and properties of a salt solution which simulates milk ultrafiltrate. *Neth. Milk Dairy J.*, **16**, 153-164.

JENSEN P.J., BAIRD J., MORIOKA S., LESSIN S. and LAZARUS G.S. (1988). Epidermal Plasminogen Activator is Abnormal in Cutaneous Lesions. *J. Invest. Dermatol.*, **90**, 777-782.

JOLLES P., LEVY-TOLEDANO S., FIAT A.M., SORIA C., GILLESSEN D., THOMAIDIS A., DUNN F.W. and CAEN P. (1986). Analogy between fibrinogen and casein. Effect of an undecapeptide isolated from kappa casein on platelet function. *Eur. J. Biochem.*, **158**, 379-382.

JORGENSEN M., MORTENSEN J.Z., MADSEN A.G., THORSEN S. and JACOBSEN B. (1982). A family with Reduced Plasminogen Activator Activity in Blood Associated with Recurrent Venous Thrombosis. *Scand. J. Haematol.*, **29**, 217-223.

JUHAN-VAGUE I., AILLAUD M.F., PHILIP-JOET C., ALESSI M.C. et ANSALDI J. (1986). L'activateur tissulaire du plasminogène. Applications cliniques du dosage immunologique. *Feuillets de Biologie*, **27**, 149, 33-38.

JUSTUS C., MÜLLER S. and KRAMER M.D. (1987). A monoclonal antibody recognizing plasminogen and plasmin - altered reactivity in psoriatic lesions. *Br. J. Dermatol.*, **117**, 687-694.

KAARTINEN L., VEIDALEINEN K., KUOSA P.L., PYORALA S. and SANDHOLM M. (1988). Endotoxin-induced mastitis: inhibition of casein synthesis and activation of the caseinolytic system. *Journal of Veterinary Medicine*, **B, 35**, 353-360.

KAMINOGAWA S., SATO F. and YAMAUCHI K. (1971). Purification and some properties of milk proteases. *Agric. Biol. Chem.*, **35**, 1465-1467.

KAMINOGAWA S. and YAMAUCHI K. (1972). Acid protease of bovine milk. *Agr. Biol. Chem.*, **36**, 2351-2356.

- KAMINOGAWA S., SATO F. and YAMAUCHI K. (1972). Comparison of bovine milk protease with plasmin. *Agric. Biol. Chem.*, **36**, 2163-2169.
- KARADI I., KOSTNER G.M., GRIES A., NIMPF J., ROMICS L. and MALLE E. (1988). Lipoprotein (a) and plasminogen are immunochemically related. *Biochim. Biophys. Acta*, **960**, 91-97.
- KARMAN A.H. and Van BOEKEL M.A.J.S. (1986). Evaluation of the Kjeldahl factor for conversion on the nitrogen content of milk and milk products to protein content. *Neth. Milk Dairy J.*, **40**, 315-336.
- KASAI S., ARIMURA H., NISHIDA M. and SUYAMA T. (1985). Proteolytic Cleavage of Single-chain Pro-urokinase Induces Conformational Change Which Follows Activation of the Zymogen and Reduction of Its High Affinity for Fibrin. *J. Biol. Chem.*, **260**, 12377-12381.
- KIKUCHI H., TANAKA S. and MATSUO O. (1987). Plasminogen Activator in Synovial Fluid from Patients with Rheumatoid Arthritis. *J. Rheumatol.*, **14**, 439-445.
- KIRCHHEIMER J.C., PFLUGER H., RITSCHL P., HIENERT G. and BINDER B.R. (1985). Plasminogen Activator Activity in Bone Metastases of Prostatic Carcinomas as Compared to Primary Tumors. *Invasion Metastasis*, **5**, 344-355.
- KLUFT C., TRUMPI-KALSHOVEN M.M., JIE A.F.H. and VELDHUYZEN-STOLK E.C. (1979). Factor XII-Dependent Fibrinolysis: A Double Function of Plasma Kallikrein and the Occurrence of a Previously Undescribed Factor XII- and Kallikrein-Dependent Plasminogen Proactivator. *Thrombos. Haemostas.*, **41**, 756-773.
- KLUFT C., JIE A.F.H., LOS P., DE WIT E. and HAVEKES L. (1989). Functional analogy between lipoprotein(a) and plasminogen in the binding to the Kringle 4 binding protein, tetranectin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **161**, 427-433.
- KOIE K., OGATA K., KAMIYA T. and TAKAMATSU J. (1978). α 2-Plasmin Inhibitor deficiency (Miyasato disease). *The Lancet*, **ii**, 1334-1336.

KOPITAR M., ROZMAN B., BABNIK J., TURK V., MULLINS D.E. and WUN T.C. (1985). Human leukocyte urokinase inhibitor -purification, characterization and comparative studies against different plasminogen activators. *Thromb. Hemost.*, **54**, 750-755.

KORNINGER C., STASSEN J.M. and COLLEN D. (1981). Turnover of Human Extrinsic (tissue-type) Plasminogen activator in Rabbits. *Thromb. Haemostas.*, **46**, 658-661.

KORYCKA-DAHL M., RIBADEAU-DUMAS B., CHENE N. and MARTIAL J. (1983). Plasmin Activity in Milk. *J. Dairy Sci.*, **66**, 704-711.

KREMPLER F., KOSTNER G., BOLZANO K. and SANDHOFER F. (1979). Lipoprotein(a) is not a metabolic product of other lipoproteins containing apolipoprotein B. *Biochim. Biophys. Acta*, **575**, 63-70.

KULSETH M.A. and HELGELAND L. (1992). A Highly Sensitive Chromogenic Microplate Assay for Quantification of Rat and Human Plasminogen. *Analyt. Biochem.*, **210**, 314-317.

KWAAN H.C., KEER H.N., RADOSEVICH J.A., CAJOT J.-F. and ERNST R. (1991). Components of the Plasminogen-Plasmin System in Human Tumor Cell Lines. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, **17**, 175-182.

KWAAN H.C. and KEER H.N. (1990). Fibrinolysis and Cancer. *Semin. Thromb. Hemost.*, **16**, 230-235.

LAEMMLI U.K. and FAVRE M. (1973). Maturation of the head of bacteriophage T4. I: DNA packaging events. *J. Mol. Biol.*, **80**, 575-599.

LAURELL C.B. (1966). Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies. *Anal. Biochem.*, **15**, 45-52.

LAURENT F., PARASSIN P.R. et GARDEUR J.N. (1991). Influence de facteurs alimentaires sur l'évolution du taux protéique et la qualité des protéines laitières. In colloque "Protéines et rendements en Industries Laitières", E.N.S.A.I.A., Nancy, 2-3 Octobre.

LAW B.A. (1979). Reviews of the progress of Dairy Sciences: Enzymes of psychrotrophic bacteria and their effects on milk and milk products. *J. Dairy Res.*, **46**, 573-588.

LE BARS D. and GRIPON J.C. (1989). Specificity of plasmin towards bovine α S2 casein. *J. Dairy Res.*, **56**, 817-821.

LEIPNITZ G., MIYASHITA C., HEIDEN M., BLOHN G., KÖHLER M. and WENZEL E. (1988). Reference Values and Variability of Plasminogen in Healthy Blood Donors and Its Relation to Parameters of the Fibrinolytic System. *Haemostasis*, **18**: suppl.1, 61-68.

LERCH P.G. and RICKLI E.E. (1980). Studies on the chemical nature of lysine-binding sites and on their localization in human plasminogen. *Biochim. Biophys. Acta*, **625**, 374-378.

LIJNEN H.R., HOYLAERTS M. and COLLEN D. (1980). Isolation and characterization of a human plasma protein with affinity for the lysine binding site in plasminogen. Role in the regulation of fibrinolysis and identification as histidin-rich glycoprotein. *J. Biol. Chem.*, **255**, 10214-10222.

LIJNEN H.R., van HOEF B., MATSUO O. and COLLEN D. (1992). On the molecular interactions between plasminogen-staphylokinase, α 2-antiplasmin and fibrin. *Biochim. Biophys. Acta*, **1118**, 144-148.

LIJNEN H.R., van HOEF B. and COLLEN D. (1993). Interaction of staphylokinase with different molecular forms of plasminogen. *Eur. J. Biochem.*, **211**, 91-97.

LINDEN G. (1971). Dosage du calcium par spectrophotométrie d'absorption atomique. *Industr. Alim. Agric.*, **88**, 793-797.

LINDMARK A., PERSSON A.M. and OLSSON I. (1990). Biosynthesis and processing of cathepsin G and neutrophil elastase in the leukemic myeloid cell line U-937. *Blood*, **76**, 2374-2380.

LIOTTA L.A., GOLDFARB R.H. and TERRANOVA V.P. (1981). Cleavage of Laminin by Thrombin and Plasmin: α Thrombin selectively cleaves the β chain of Laminin. *Thromb. Res.*, **21**, 663-673.

- LORIENT D. (1991). Données récentes sur les protéines laitières. In colloque "Protéines et rendements en Industries Laitières", E.N.S.A.I.A., Nancy, 2-3 Octobre.
- LOW D.A., BAKER J.B., KOONCE W.C. and CUNNINGHAM D.D. (1981). Released protease-nexin regulates cellular binding, internalization, and degradation of serine proteases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 2340-2344.
- LU D.D. and NIELSEN S.S. (1993a). Assays for Native Plasminogen Activators in Bovine Milk. *J. Dairy Sci.*, **76**, 3362-3368.
- LU D.D. and NIELSEN S.S. (1993b). Isolation and Characterization of Native Bovine Milk Plasminogen Activators. *J. Dairy Sci.*, **76**, 3369-3383.
- LUCAS M.A., FRETTO L.J. and MacKEE P.A. (1983). The Binding of Human Plasminogen to Fibrin and Fibrinogen. *J. Biol. Chem.*, **258**, 4249-4256.
- Mac GREGOR I.R., HARGREAVE T.B. and ELTON R.A. (1987). Seminal Plasma Plasminogen Activator and Fertility. *Andrologia*, **19**, 452-455.
- Mac KELLAR R.C. (1981). Development of Off-flavor in Ultra-High Temperature and pasteurized Milk as a function of Proteolysis. *J. Dairy Sci.*, **64**, 2138-2145.
- Mac LEAN D.M., GRAHAM E.R.B. and PONZONI R.W. (1984). Effects of milk protein genetic variants on milk yield and composition. *J. Dairy Res.*, **51**, 531-546.
- Mac LEAN J.W., TOMLINSON J.E., KUANG W.-J., EATON D.L., CHEN E.Y., FLESS G.M., SCANU A.M. and LAWN R.M. (1987). cDNA sequence of human apolipoprotein(a) is homologous to plasminogen. *Nature*, **300**, 132-137.
- MAIER U., KIRCHHEIMER J.C., HIENERT G., CHRIST G. and BINDER B.R. (1991). Fibrinolytic parameters in spermatozoas and seminal plasma. *J. Urol.*, **146**, 906-908.
- MANJI B. and KAKUDA Y. (1986). Isolation and characterization of alkaline milk proteinase from raw bovine milk. *J. Dairy Sci.*, **69**, supp.1, 71 (abstract D 64).
- MARCHAL E., COLLARD-BOVY C., HUMBERT G., LINDEN G., MONTAGNE P. and DUHEILLE J. (1991). Microparticle Enhanced Nephelometric Immunoassay: II- Measurement of α Lactalbumin and β Lactoglobulin. *J. Dairy Sci.*, **74**, 3702-3708.

MARCHAND J., VARCIN P., RIOCHET D., MONTAGNE P., CUILLIÈRE M.L., DUHEILLE J. and PAU B. (1992). Synthesis of New Hydrophilic Microspheres: Optimized Carriers for Microparticle-Enhanced Nephelometric Immunoassays. *Biopolymers*, **32**, 971-980.

MARKUS G., DePASQUALE J.L. and WISSLER F.C. (1978). Quantitative Determination of the Binding of ϵ -Aminocaproic Acid to Native Plasminogen. *J. Biol. Chem.*, **253**, 727-732.

MARKUS G., TAKITA H., CAMIOLO S.M., CORASANTI J.G., EVERS J.L. and HOBICA G.H. (1980). Content and Characterization of Plasminogen Activators in Human Lung Tumors and Normal Lung Tissue. *Cancer Res.*, **40**, 841-848.

MARKUS G. (1988). The Relevance of Plasminogen Activators to Neoplastic Growth. A Review of Recent Literature. *Enzyme*, **40**, 158-172.

MARKUS G., HITT S., HARVEY S.R. and TRITSCH G.L. (1993). Casein, a Powerful Enhancer of the Rate of Plasminogen Activation. *Fibrinolysis*, **7**, 229-236.

MARONGIU F., MAMUSA A.M., MAMELI G., MULAS G., SOLINAS A., DEMELIA L. and CONTU L. (1985). α 2-Antiplasmin and disseminated intravascular coagulation in liver cirrhosis. *Thromb. Res.*, **37**, 287-294.

MARTI T., SCHALLER J. and RICKLI E.E. (1985). Determination of the complete amino-acid sequence of porcine miniplasminogen. *Eur. J. Biochem.*, **149**, 279-285.

MAUBOIS J.L., RICORDEAU G. et MOCQUOT G. (1970). Etude des rendements en fromagerie de Camemberts et de Saint Paulin. *Lait*, **50**, 351-373.

MEHNERT E. and HUDEC R. (1989). Determination and interpretation of the casein content of cow milk (abst.). *Monatshefte für Veterinärmedizin*, **44**, 789-792.

MERCIER J.C., MAUBOIS J.L., POZNANSKI S. et RIBADEAU-DUMAS B. (1968). Fractionnement préparatif des caséines de vache et de brebis par chromatographie sur D.E.A.E. cellulose, en milieu urée et 2-mercaptoéthanol. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **50**, 521-530.

MIETTON B. (1991). Techniques de compensation et de supplémentation. In colloque "Protéines et rendements en Industries Laitières", E.N.S.A.I.A., Nancy, 2-3 Octobre.

MIHALYI E. (1972). In "Application of Proteolytic Enzymes to Protein Structure Studies". Ed by CRC Press, Cleveland, pp 198-200.

MILES L.A. and PLOW E.F. (1985). Binding and activation of plasminogen on the platelet surface. *J. Biol. Chem.*, **260**, 4303-4311.

MILES L.A. and PLOW E.F. (1986). Topography of the High-Affinity Lysine Binding Site of Plasminogen As Defined with a Specific Antibody Probe. *Biochemistry*, **25**, 6926-6933.

MILES L.A. and PLOW E.F. (1987). Receptor Mediated Binding of the Fibrinolytic Components, Plasminogen and Urokinase, to Peripheral Blood Cells. *Thromb. Haemost.*, **58**, 936-942.

MILES L.A., DAHLBERG C.M. and PLOW E.F. (1988a). The Cell-binding Domains of Plasminogen and Their Function in Plasma. *J. Biol. Chem.*, **263**, 11928-11934.

MILES L.A., LEVIN E.G., PLESCIA J., COLLEN D. and PLOW E.F. (1988b). Plasminogen Receptors, Urokinase receptors, and Their Modulation on Human Endothelial Cells. *Blood*, **72**, 628-635.

MILES L.A., FLESS G.M., LEVIN E.G., SCANU A.M. and PLOW E.F. (1989). A potential basis for the thrombotic risks associated with lipoprotein (a). *Nature*, **339**, 301-303.

MIRANDA G. (1983). Etude cinétique de la protéolyse in vivo des lactoprotéines bovines dans l'estomac du rat: effet du traitement thermique. Thèse, Université de Paris VII.

MIRA-Y-LOPEZ R., JOSEPH-SILVERSTEIN J., RIFKIN D.B. and OSSOWSKI L. (1986). Identification of a pituitary factor responsible for enhancement of plasminogen activator activity in breast tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **83**, 7780-7784.

- MIYASHITA C., WENZEL E. and HEIDEN M. (1988). Plasminogen: A Brief Introduction into Its Biochemistry and Function. *Haemostasis*, **18**: suppl.1, 7-13.
- MONTAGNE P., LAROCHE P., BESSOU T., CUILIERE M.L., VARCIN P. and DUHEILLE J. (1992a). Measurement of Eleven Serum Proteins by Microparticle-Enhanced Nephelometric Immunoassay. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, **30**, 217-222.
- MONTAGNE P., VARCIN P., CUILIERE M.L. AND DUHEILLE J. (1992b). Microparticle-Enhanced Nephelometric Immunoassay with Microsphere-Antigen Conjugates. *Bioconjugate Chem.*, **3**, 187-193.
- MONTAGNE P., EL OMARI R., CLIQUET F., CUILIERE M.L. and DUHEILLE J. (1992c). Use of Microsphere-Antibody Conjugates in Microparticle-Enhanced Nephelometric Immunoassay. *Bioconjugate Chem.*, **3**, 504-509.
- MONTAGNE P., GAVRILOFF C., HUMBERT G., CUILIERE M.L., DUHEILLE J. and LINDEN G. (1991). Microparticle-enhanced Nephelometric immunoassay of Immunoglobulins G in Cow Milk. *Lait*, **71**, 493-499.
- MORRIS J.P. and CASTELLINO F.J. (1983). The role of the lysine binding sites of human plasmin in the hydrolysis of human fibrinogen. *Biochim. Biophys. Acta*, **744**, 99-104.
- MOSCATELLI D., RIFKIN D.B., ISSEROFF R.R. and JAFFE E.A. (1980). Plasminogen Activator, Plasmin, and Collagenase Interactions. In "Proteinases and Tumor Invasion", P. STRAULI et al., ed by Raven Press, New York. Vol 6, p. 143-152.
- MOTTA A., LAURSEN R.A., LLINAS M., TULINSKY A. and PARK C.H. (1987). Complete Assignment of the Aromatic Proton Magnetic Resonance Spectrum of the Kringle 1 Domain from Human Plasminogen: Structure of the Ligand-Binding Site. *Biochemistry*, **26**, 3827-3836.
- MUELLBACHER W., MAIER M. and BINDER B.R. (1989). Regulation of plasminogen activation in isolated perfused rat kidney. *Am. J. Physiol.*, **256**, 787-793.

MURRAY J.C., BUETOW K.H., DONOVAN M., HORNING S., MOTULSKY A.G., DISTECHE A.G., DYER K., SWISSHELM K., ANDERSON J., GIBLETT E., SADLER E., EDDY R. and SHOWS T.B. (1987). Linkage disequilibrium of plasminogen polymorphisms and assignment of the gene to human chromosome 6q26-6q27. *Am. J. Hum. Genet.*, **40**, 338-350.

MUSSONI L. and BENEDETTA D. (1988). Expression of Plasminogen Activator as a Marker of Stimulation in Tumor-Associated Macrophages. *Haemostasis*, **18**, 66-71.

MUSCHICK P., ZEGGERT D., DONNER P. and WITT W. (1993). Thrombolytic Properties of Desmodus (Vampire Bat) Salivary Plasminogen Activator DSPA 1, Alteplase and Streptokinase Following Intravenous Bolus Injection in a Rabbit Model of Carotid Artery Thrombosis. *Fibrinolysis*, **7**, 284-290.

NIKLISSON O., SVANBERG L., THORELL J., LECANDER I. and ASTEDT B. (1981). Urokinase-Like Plasminogen Activator as a Marker of Endometrial Neoplasia. *Cancer*, **48**, 1484-1486.

NILSSON I.M., LJUNGNER H. and TENGBORN L. (1985). Two different mechanisms in patients with venous thrombosis and defective fibrinolysis: low concentration of plasminogen activator inhibitor. *Br. Med. J.*, **290**, 1453-1456.

NOOMEN A. (1975). Proteolytic activity of milk protease in raw and pasteurized cow's milk. *Neth. Milk Dairy J.*, **29**, 153-161.

OKIGBO L.M., RICHARDSON G.H., BROWN R.J. and ERNSTROM C.A. (1985). Effects of pH, calcium chloride and chymosin concentration on coagulation properties of abnormal and normal milk. *J. Dairy Sci.*, **68**, 2527-2533.

OLIVER J.M., GRUEL Y. and BACQ Y. (1991). Anomalies de l'hémostase au cours des hépatopathies. *Gastroenterol. Clin. Biol.*, **15**, 679-688.

OLOFSSON B.O. and NILSSON T.K. (1990). Reduced Levels of Tissue Plasminogen Activator and Plasminogen Activator Inhibitor in Plasma of Patients with Familial Amyloidotic Polyneuropathy. *Haemostasis*, **20**, 31-36.

ONO T., YAHAGI M. and ODAGIRI S. (1980). The binding of calcium to κ casein and para- κ casein. *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 1499-1503.

- OWENS M.R. and CIMINO C.D. (1985). Biosynthesis of plasminogen by the perfused rat liver. *J. Lab. Clin. Med.*, **105**, 368-373.
- PADILLA S.L., GALLE P.C., ELLEGOOD J.O., MAHESH V.B. and Mac DONOUGH P.G. (1986). Plasminogen in peritoneal fluid: a possible nonsteroidal indicator of ovulation. *Fertil. Steril.*, **46**, 1071-1076.
- PARVEZ Z., FAREED J., MESSMORE H.L. and BERMES E.W. (1979). Laser and rate nephelometric methods for the quantitation of coagulation proteins. In "Seminars on biochemical hematology", Ed. by Sunderman F.W., 404 et seq..
- PAYENS T.A.J. and Van MARKWIJK B.W. (1963). Some features of the association of β casein. *Biochim. Biophys. Acta*, **71**, 517-530.
- PEARCE M.J., LINKLATER P.M., HALL R.J. and Mac KINLEY A.G. (1986). Extensive degradation of casein by plasmin does not impede subsequent curd formation and syneresis. *J. Dairy Res.*, **53**, 477-480.
- PENNICA D., HOLMES W.E., KOHR W.J., HARKINS R.N., VEHAR G.A., WARD C.A., BENNETT W.F., YELVERTON E., SEEBURG P.H., HEYNEKER H.L., GOEDDEL D.V. and COLLEN D. (1983). Cloning and expression of human tissue-type plasminogen activator cDNA in *E. Coli*. *Nature*, **301**, 214-221.
- PLOW E.F., FREANEY D.E., PLESCIA D.E. and MILES L.A. (1986). The plasminogen system and cell surfaces: Evidence for plasminogen and urokinase receptors on the same cell type. *J. Cell Biol.*, **103**, 2411-2420.
- POCHRON S.P., MITCHELL G.A., ALBAREDA I., HUSEBY R.M. and GARGIULO R.J. (1978). A fluorescent substrate assay for plasminogen. *Thromb. Res.*, **13**, 733-739.
- POHL G., KALLSTROM M., BERGSDORF N., WALLEN P. and JORNVALL H. (1984). Tissue Plasminogen Activator: Peptide Analyses Confirm an Indirectly Derived Amino Acid Sequence, Identify the Active Site Serine Residue, Establish Glycosylation Sites, and Localize Variant Differences. *Biochemistry*, **23**, 3701-3707.
- POLITIS I. and KWAI HANG K.F. (1989). Effects of environmental factors on plasmin activity. *J. Dairy Sci.*, **72**, 1713-1718.

- POLITIS I., LACHANCE E., BLOCK E. and TURNER J.D. (1989). Plasmin and plasminogen in bovine milk: a relationship with involution. *J. Dairy Sci.*, **72**, 900-906.
- POLITIS I., BLOCK E. and TURNER J.D. (1990). Effect of somatotropin on the plasminogen and plasmin system in the mammary gland: proposed mechanism of action for somatotropin on the mammary gland. *J. Dairy Sci.*, **73**, 1494-1499.
- POLITIS I., ZHAO X., Mac BRIDE B.W., BURTON J.H. and TURNER J.D. (1991). Plasminogen activator production by bovine milk macrophages and blood monocytes. *Am. J. Vet. Res.*, **52**, 1208-1213.
- POLITIS I., BARBANO D.M. and GOREWIT R.C. (1992). Distribution of Plasminogen and Plasmin in Fractions of Bovine Milk. *J. Dairy Sci.*, **75**, 1402-1410.
- POLITIS I., ZAVIZION B., BARBANO D.M. and GOREWIT R.C. (1993). Enzymatic Assay for the Combined Determination of Plasmin Plus Plasminogen in Milk: Revisited. *J. Dairy Sci.*, **76**, 1260-1267.
- PONTING C.P., HOLLAND S.K., CEDERHOLM-WILLIAMS S.A., MARSHALL J.M., BROWN A.J., SPRAGGON G. and BLAKE C.C.F. (1992). The compact domain conformation of human Glu-plasminogen in solution. *Biochim. Biophys. Acta*, **1159**, 155-161.
- POTRON G. (1986). Physiopathologie des hyperfibrinolyse. In "Fibrinolyse et Thrombolyse", J.P. Caen, G. Tobelem et C. Soria, éd. par Masson, Paris, 31-37.
- POULSEN O.M. and HAU J. (1988). Interaction between pregnancy zone protein and plasmin. *Arch. Gynecol. Obstet.*, **243**, 157-164.
- PREISSNER K.T. (1990). Specific binding of plasminogen to vitronectin. Evidence for a modulatory role of vitronectin on fibrin(ogen)-induced plasmin formation by tissue plasminogen activator. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **168**, 966-971.
- RADCLIFFE R. and HEINZE T. (1978). Isolation of Plasminogen Activator from Human Plasminogen by Chromatographie on Lysine-Sepharose. *Arch. Biochem. Biophys.*, **189**, 185-194.

RAMESH V., PETROS A.M., LLINAS M., TULINSKY A. and PARK C.H. (1987). Proton Magnetic Resonance Study of Lysine-binding to the Kringle 4 Domain of Human Plasminogen. The Structure of the Binding Site. *J. Mol. Biol.*, **198**, 481-498.

RANBY M. (1982). Studies on the kinetics of plasminogen activation by tissue plasminogen activator. *Biochim. Biophys. Acta*, **704**, 461-469.

REBOUD-RAVAUX M. (1985). Les activateurs du plasminogène: aspects généraux et développements récents. *Biochimie*, **67**, 1197-1216.

REDDY K.N. (1976). Kinetics of active center formation in dog plasminogen by streptokinase and activity of a modified streptokinase. *J. Biol. Chem.*, **251**, 6624-6629.

REIMERDES E.H. (1983). New aspects of naturally occurring proteases in bovine milk. *J. Dairy Res.*, **53**, 477-480.

REINARTZ J., NAHER H., MAI H. and KRAMER M.D. (1993). Plasminogen activation in lesional skin of pemphigus vulgaris type Neumann. *Arch. Dermatol. Res.*, **284**, 432-439.

REITER B., SOROKIN Y., PICKERING A. and HALL A.J. (1969). Hydrolysis of fat and protein in small cheeses made under aseptic conditions. *J. Dairy Res.*, **36**, 65-69.

REMEUF F. et HURTAUD C. (1991). Liaisons entre les caractéristiques physicochimiques des laits et leur aptitude fromagère. Colloque INRA-ENSA Rennes, 23-24 Janvier.

RICHARDSON B.C. and PEARCE K.N. (1981). The determination of plasmin in dairy products. *N.Z. J. Dairy Sci. Technol.*, **16**, 209-220 .

RICHARDSON B.C. (1983a). The proteinases of bovine milk and the effect of pasteurization on their activity. *New Zealand J. Dairy Sci. Technol.*, **18**, 233-245.

RICHARDSON B.C. (1983b). Variation of the concentration of plasmin and plasminogen in bovine milk with lactation. *New Zealand J. Dairy Sci. Technol.*, **18**, 247-252.

RIJKEN D.C., HOYLAERTS M. and COLLEN D. (1982). Fibrinolytic Properties of One-chain and Two-chain Human Extrinsic (Tissue-type) Plasminogen Activator. *J. Biol. Chem.*, **257**, 2920-2925.

ROBBINS K.C., BERNABE P., ARZADON L. and SUMMARIA L. (1973). NH₂-Terminal Sequences of Mammalian Plasminogens and Plasmin S-Carboxymethyl Heavy (A) and light (B) Chain Derivatives. *J. Biol. Chem.*, **248**, 7242-7246.

ROBINSON B.W.S. (1988). Production of plasminogen activator by alveolar macrophages in normal subjects and patients with interstitial lung disease. *Thorax*, **43**, 508-515.

RODZYNEK J.J., URBAIN D., LEAUTAUD P., WETTENDORFF P. and DELCOURT A. (1984). Antithrombin III, plasminogen and α 2 antiplasmin in jaundice. Clinical usefulness and prognostic significance. *Gut*, **25**, 1050-1056.

ROLLAND M.P., BITRI L. and BESANCON P. (1993). Polyclonal antibodies with predetermined specificity against bovine α S1 casein: application to the detection of bovine milk in ovine milk and cheese. *J. Dairy Res.*, **60**, 413-420.

ROLLEMA H.S., VISSER S. and POLL J.K. (1981). On the determination, purification and characterization of the alkaline proteinase from bovine milk. *Neth. Milk Dairy J.*, **35**, 396-399.

ROLLEMA H.S., VISSER S. and POLL J.K. (1983). Spectrophotometric assay of plasmin and plasminogen in bovine milk. *Milchwissenschaft*, **38**, 214-217.

ROLLEMA H.S. (1993). Casein association and micelle formation. In "Advanced Dairy Chemistry - 1: Proteins", P.F. Fox, ed by Elsevier Applied Science, London, 111-140.

SAINT-MARTIN M. and PAQUIN P. (1990). Ion-exchange fast protein liquid chromatography: optimization of the purification of caseins using a non-denaturing detergent. *J. Dairy Res.*, **57**, 63-68.

SAMAMA M. (1990a). Physiologie de la fibrinolyse. In "Physiologie et exploration de l'hémostase", éd par Doin, Paris, 177-207.

SAMAMA M. (1990b). Biochimie de la coagulation. In "Physiologie et exploration de l'hémostase", éd par Doin, Paris, 123-141.

- SAKSELA O. and VIHKO K.K. (1986). Local synthesis of plasminogen by the seminiferous tubules of the testis. *Febs Letters*, **204**, 193-197.
- SANOGO T., PAQUET D., AUBERT F. and LINDEN G. (1989). Purification of α S1 casein by fast protein liquid chromatography. *J. Dairy Sci.*, **72**, 2242-2246.
- SAPORTA G. (1990). In "Probabilités. Analyse des données et statistiques" ed par Technip, Paris, 131-157.
- SCHAAR J. (1985). Plasmin activity and proteose-peptone content of individual milk. *J. Dairy Res.*, **52**, 369-378.
- SCHALLER J., MOSER P.W., DANNEGGER-MULLER G.A.K., ROSSELET S., KAMPFER U. and RICKLI E.E. (1985). Complete amino acid sequence of bovine plasminogen. Comparison with human plasminogen. *Eur. J. Biochem.*, **149**, 267-278.
- SCHALLER J. and RICKLI E.E. (1988). Structural aspects of the plasminogen of various species. *Enzyme*, **40**, 63-69.
- SCHER J. (1988). Contribution à l'étude de l'influence de la composition du lait et de la taille des micelles sur la coagulation enzymatique: approche statistique et phénoménologique. Thèse Docteur I.N.P.L. (Institut National Polytechnique de Lorraine).
- SCHICK L.A. and CASTELLINO F.J. (1973). Interaction of streptokinase and rabbit plasminogen. *Biochemistry*, **12**, 4315-4321.
- SCHLEGEL N., BEAUFILS F., MAROTTE R. et MERCIER J.C. (1986). Le système fibrinolytique et les traitements thrombolytiques chez le nouveau-né et l'enfant. In "Fibrinolyse et Thrombolyse", J.P. Caen, G. Tobelem et C. Soria, éd. par Masson, Paris, 45-47.
- SCHMIDT D.G. (1970a). Differences between the association of the genetic variants B, C and D of α S1 casein.. *Biochim. Biophys. Acta*, **221**, 140-142.
- SCHMIDT D.G. (1970b). The association of α S1 casein B at pH 6.6. *Biochim. Biophys. Acta*, **207**, 130-138.

- SCHMIDT D.G. and BOTH P. (1982). Location of α S1, β and κ casein in artificial casein micelles. *Milchwissenschaft*, **37**, 336-337.
- SCOTT R.W., BERGMAN B.L., BAJPAI A., HERSH R.T., RODRIGUEZ H., JONES B.N., BARREDA C., WATTS S. and BAKER J.B. (1985). Protease nexin. Properties and a modified purification procedure. *J. Biol. Chem.*, **260**, 7029-7034.
- SEIBERT B., ERHARDT B. and SENFT B. (1985). Procedure for simultaneous phenotyping of genetic variants in cow's milk by using isoelectric focusing. *Anim. Blood Groups Biochem. Genet.*, **16**, 183-191.
- SHI G.Y. and WU H.L. (1988). Isolation and characterization of microplasminogen. A low molecular weight form of plasminogen. *J. Biol. Chem.*, **263**, 17071-17075.
- SIEFRING JR.G.E. and CASTELLINO F.J. (1974). The role of sialic acid in the determination of distinct properties of the isozymes of rabbit plasminogen. *J. Biol. Chem.*, **249**, 7742-7746.
- SIEFRING G.E. and CASTELLINO F.J. (1976). Interaction of streptokinase with plasminogen. Isolation and characterization of a streptokinase degradation product. *J. Biol. Chem.*, **251**, 3913-3920.
- SILVERSTEIN R.L., FRIEDLANDER JR.R.J., NICHOLAS R.L. and NACHMAN R.L. (1988). Binding of lys-Plasminogen to Monocytes/Macrophages. *J. Clin. Invest.*, **82**, 1948-1955.
- SJOHOLM I., WIMAN B. and WALLEN P. (1973). Studies on the Conformational Changes of Plasminogen Induced during Activation to Plasmin and by 6-Aminohexanoic Acid. *Eur. J. Biochem.*, **39**, 471-479.
- SLATTERY C.W. and EVARD R. (1973). A model for the formation and structure of casein micelles from subunits of variable composition. *Biochim. Biophys. Acta*, **317**, 529-538.
- SNOEREN T.H.M. and Van RIEL J.A.M. (1979). Milk proteinase, its isolation and action on α S2 and β casein. *Milchwissenschaft*, **34**, 528-531.

SNOEREN T.H.M., Van MARKWIJK B. and Van MONTFORT R. (1980). Some physicochemical properties of bovine α S₂-casein. *Biochim. Biophys. Acta*, **622**, 268-276.

SOEDA S., KAKIKI M., SHIMENO H. and NAGAMATSU A. (1986). Rapid and high-yield purification of porcine heart tissue-type plasminogen activator by heparin-sepharose chromatography. *Life Sciences*, **39**, 1317-1324.

SOEDA S., KAKIKI M., SHIMENO H. and NAGAMATSU A. (1987). Localization of the binding sites of porcine tissue-type plasminogen activator and plasminogen to heparin. *Biochim. Biophys. Acta*, **916**, 279-287.

SOEDA S., OHKI H., SHIMENO H. and NAGAMATSU (1989). Further characterization of the binding of plasminogen to heparin: evidence for the involvement of lysine residues. *Biochim. Biophys. Acta*, **999**, 29-35.

SORIA J., SORIA C. and CAEN J.P. (1983). A new type of congenital dysfibrinogenaemia with defective fibrin lysis -Dusard syndrome: possible relation to thrombosis. *Br. J. Haematol.*, **53**, 575-586.

SORIA J., SORIA C. et DUNN F. (1986). Physiopathologie des états d'hypofibrinolyse. In "Fibrinolyse et Thrombolyse", J.P. Caen, G. Tobelem et C. Soria, éd. par Masson, Paris, 38-44.

SOTTRUP-JENSEN L., CLAEYS H., ZAJDEL M., PETERSEN T.E. and MAGNUSSON S. (1978). The primary structure of human plasminogen: isolation of two lysine-binding fragments and one "mini-plasminogen" by elastase-catalyzed specific limited proteolysis. In:"Progress in chemical fibrinolysis and thrombolysis", vol.3, ed by Raven Press, New-York, 191-209.

STACK M.S., PIZZO S.V. and GONZALEZ-GRONOW M. (1992a). Effect of desialylation on the biological properties of human plasminogen. *Biochem. J.*, **284**, 81-86.

STACK M.S., MOSER T.L. and PIZZO S.V. (1992b). Binding of human plasminogen to basement-membrane (type IV) collagen. *Biochem. J.*, **284**, 103-108.

- STOTHART P.H. (1989). Subunit structure of casein micelles from small-angle neutron-scattering. *J. Mol. Biol.*, **208**, 635-638.
- STRANGE E.D., MALIN E.L., van HEKKEN D.L. and BASCH J.J. (1992). Chromatographic and electrophoretic methods used for analysis of milk proteins. *J. Chromatogr.*, **624**, 81-102.
- STRATTON J.R., CHANDLER W.L., SCHWARTZ R.S., CERQUEIRA M.D., LEVY W.C., KAHN S.E., LARSON V.G., CAIN K.C., BEARD J.C. and ABRASS I.B. (1991). Effects of Physical Conditioning on Fibrinolytic Variables and Fibrinogen in Young and Old Healthy Adults. *Circulation*, **83**, 1692-1697.
- STRICKLAND S., REICH E. and SHERMAN M.I. (1976). Plasminogen activator in early embryogenesis: enzyme production by trophoblast and parietal endoderm. *Cell*, **9**, 231-240.
- SUENSON E. and THORSEN S. (1981). Secondary-site binding of Glu-plasmin, Lys-Plasmin and miniplasmin to fibrin. *Biochem. J.*, **197**, 619-628.
- SUGIYAMA N., SASAKI T., IWAMOTO M. and ABIKO Y. (1988). Binding site of α 2-plasmin inhibitor to plasminogen. *Biochim. Biophys. Acta*, **952**, 1-7.
- SULTAN Y. (1986). In "Physiopathologie de l'hémostase et de la thrombose", éd par Doin, Paris, 111-115.
- SUMMARIA L. (1989). Comparison of Human Normal, Full-Term, Fetal and Adult Plasminogen by Physical and Chemical Analyses. *Haemostasis*, **19**, 266-273.
- SWAISGOOD H.E. (1989). In "Milk Proteins", ed. by C.A. Barth and E. Schlimme. Steinkopff Verlag Darmstadt (Springer-Verlag, New-York), 192-210.
- SWAISGOOD H.E. (1993). Chemistry of the caseins. In "Advanced Dairy Chemistry - 1: Proteins", P.F. Fox, ed by Elsevier Applied Science, London, 63-110.
- TAKADA A. and TAKADA Y. (1988). Physiology of Plasminogen: With Special Reference to Activation and Degradation. *Haemostasis*, **18**, suppl.1, 25-35.

TAKADA Y. and TAKADA A. (1990). The mechanisms of the activation of plasminogen by streptokinase and urokinase. In: "Advances in experimental Medicine and Biology", C.Y.Liu and S. Chien, ed by Plenum Press, New-York, vol 281, 223-234.

TAKADA A., URANO T. and TAKADA Y. (1990b). The regulation of the activation of the fibrinolysis system. In: "Advances in experimental Medicine and Biology", C.Y.Liu and S. Chien, ed by Plenum Press, New-York, vol 281, 209-222.

TARODO de la FUENTE B., ALAIS C. et FRENTZ R. (1969). Etude de la coagulation du lait et de la synérèse par la méthode de thrombélastographie. *Lait*, **49**, 400-405.

TENO N., WANAKA K., OKADA Y., TAGUCHI H., OKAMOTO U., HIJIKATA-OKUNOMIYA A. and OKAMOTO S. (1993). Development of Active Center-Directed Plasmin and Plasma Kallikrein Inhibitors and Studies on the Structure-Inhibitory Activity Relationship. *Chem. Pharm. Bull.*, **41**, 1079-1090.

TERVO T., Van SETTEN G.B., ANDERSSON R. (1989). Contact lens wear is associated with the appearance of plasmin in the tear fluid. Preliminary results. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, **227**, 42-44.

TEUTEN A.J., COOPER A., SMITH R.A.G. and DOBSON C.M. (1993). Binding of a substrate analogue can induce co-operative structure in the plasmin serine-proteinase domain. *Biochem. J.*, **293**, 567-572.

THEWES T., RAMESH V., SIMPLACEANU E.L. and LLINAS M. (1987). Isolation, purification and H-NMR characterization of a kringle 5 domain fragment from human plasminogen. *Biochim. Biophys. Acta*, **912**, 254-269.

THEWES T., CONSTANTINE K., BYEON I.J.L. and LLINAS M. (1990). Ligand Interactions with the Kringle 5 Domain of Plasminogen. A study by H NMR Spectroscopy. *J. Biol. Chem.*, **265**, 3906-3915.

THORSEN S. (1975). Differences in the binding to fibrin of native plasminogen and plasminogen modified by proteolytic degradation influence of aminocarboxylic acids. *Biochim. Biophys. Acta*, **393**, 55-65.

- TINGUELY P. et PERNODET G. (1985). In "Laits et produits laitiers -2: Les produits laitiers" éd par Tec. Doc. Lavoisier, Paris, 69-86.
- TOKI N., TSUSHIMA H., YAMASAKI M., YAMASAKI R. and YAMURA T. (1982). Isolation of Tissue Plasminogen Activator from Skin Lesion with Allergic Vasculitis. *J. Invest. Dermatol.*, **78**, 18-23.
- TORR S.R., NACHOWIAK D.A., FUJII S. and SOBEL B.E. (1992). "Plasminogen Steal" and Clot Lysis. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **19**, 1085-1090.
- TRANQUI L., PRANDINI M.H. and CHAPEL A. (1979). The Structure of Plasminogen Studied by Electron Microscopy. *Biol. Cellulaire*, **34**, 39-42.
- TREXLER M., VALI Z. and PATTHY L. (1982). Structure of the ω aminocarboxylic acid-binding sites of human plasminogen. *J. Biol. Chem.*, **257**, 7401-7406.
- TRIPATHI R.C., PARK J.K., TRIPATHI B.J. and MILLARD C.B. (1988). Tissue Plasminogen Activator in Human Aqueous Humor and its Possible Therapeutic Significance. *Am. J. Ophthalmol.*, **106**, 719-722.
- ULLBERG M., KRONVALL G., KARLSSON I. and WIMAN B. (1990). Receptors for Human Plasminogen on Gram-Negative Bacteria. *Infect. Immun.*, **58**, 21-25.
- ULLBERG M., KUUSELA P., KRISTIANSEN B.E. and KRONVALL G. (1992). Binding of Plasminogen to *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae* and Formation of Surface-Associated plasmin. *J. Infect. Dis.*, **166**, 1329-1334.
- UNKELESS J.C., DANO K., KELLERMAN G.M. AND REICH E. (1974). Fibrinolysis associated with oncogenic transformation. Partial purification and characterization of cell factor, a plasminogen activator. *J. Biol. Chem.*, **249**, 4295-4305.
- URANO T., CHIBBER B.A.K. and CASTELLINO F.J. (1987). The reciprocal effects of ϵ aminohexanoic acid and chloride ion on the activation of human (Glu1) plasminogen by human urokinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 4031-4034.
- VAHERI A., VARTIO T., STENMAN S., SAKSELA O., HEDMAN K. and ALITALO K. (1980). Fibronectin and Proteinases in Tumor Invasion. In "Proteinases and tumor invasion", P. Straüli et al., ed by Raven Press, New-York, 49-57.

VALI Z. and PATTHY L. (1982). Location of the Intermediate and High Affinity Aminocarboxylic Acid-binding Sites in Human Plasminogen. *J. Biol. Chem.*, **257**, 2104-2110.

Van der HOEK Y.Y., WITTEKOEK M.E., BEISIEGEL U., KASTELEIN J.J.P. and KOSCHINSKY M.L. (1993). The apolipoprotein(a) kringle IV repeats which differ from the major repeat kringle are present in variably-sized isoforms. *Hum. Mol. Genet.*, **2**, 361-366.

Van de WERF F. (1991). L'infarctus du myocarde et la thrombolyse. *La Recherche*, **231**, 424-433.

Van MOURIK J.A., LAWRENCE D.A. and LOSKUTOFF D.J. (1984). Purification of an inhibitor of plasminogen activator (antiactivator) synthesized by endothelial cells. *J. Biol. Chem.*, **259**, 14914-14921.

VARADI A. AND PATTHY L. (1981). Kringle 5 of human plasminogen carries a benzamidine-binding site. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **103**, 97-102.

VEGARUD G.E., MOLLAND T.S., BROVOLD M.J., DEVOLD T.G., ALESTROM P., STEINE T., ROGNE S. and LANGSRUD T. (1989). Rapid separation of genetic variants of caseins and whey proteins using urea-modified gels and fast electrophoresis. *Milchwissenschaft*, **44**, 689-691.

VIOLAND B.N. and CASTELLINO F.J. (1976). Mechanism of the Urokinase-catalysed Activation of Human Plasminogen. *J. Biol. Chem.*, **251**, 3906-3912.

VISSER S., SLANGEN K.J. and ROLLEMA H.S. (1986). High-performance liquid chromatography of bovine caseins with the application of various stationary phases. *Milchwissenschaft*, **41**, 559-562.

VOIRIN A. (1991). Analyse de peptides dans le lait et les produits laitiers. Application à l'étude de l'action de la plasmine et de ses conséquences technologiques. Thèse de Doctorat ès Sciences, Université de Paris VI.

Von SCHULTHESS G.K., COHEN R.J. and BENEDEK G.B. (1976). Laser light scattering spectroscopic immunoassay in the agglutination-inhibition mode for human chorionic gonadotropin (hcG) and human luteinizing hormone (hLH). *Immunochemistry*, **13**, 963-966.

VREEMAN H.J. (1979). The association of bovine SH- κ casein at pH 7.0. *J. Dairy Res.*, **46**, 271-276.

WALDENSTROM M., HOLMGREN E., ATTERSAND A., KALDEREN C., LOWENADLER B., RADEN B., HANSSON L. and POHL G. (1991). Synthesis and secretion of a fibrinolytically active tissue-type plasminogen activator variant in *Escheria Coli*. *Gene*, **99**, 243-248.

WALLEN P. and WIMAN B. (1970). Characterization of human plasminogen. I: On the relationship between different molecular forms of plasminogen demonstrated in plasma and found in purified preparations. *Biochim. Biophys. Acta*, **221**, 20-30.

WALLEN P., CHENG X.F. and OHLSSON P.I. (1990). Effects of structural modifications on the properties of tissue plasminogen activator (tPA). In "Advances in experimental Medicine and Biology", C.Y. Liu and S. Chien, ed by Plenum Press, New-York, vol 281, 185-194.

WALSTRA P. (1990). On the stability of casein micelles. *J. Dairy Sci.*, **73**, 1965-1979.

WEBER F. (1984). L'égouttage du coagulum. In "Le fromage" A. Eck, éd par Tec. Doc. Lavoisier, Paris.

WEINSTEIN M.J. and DOOLITTLE R.F. (1972). Differential specificities of thrombin, plasmin and trypsin with regard to synthetic and natural substrates and inhibitors. *Biochim. Biophys. Acta*, **258**, 577-590.

WESTERMAIR T. (1984). Zur Spezificität der Plasmin-Bestimmung in Milch fluorogene Peptidsubstrate mit Kollagen-Charakter. Thèse Université de Munich.

WILCOX R.G., C.G. OLSSON, SKENE A.M., VON DER LIPPE G., JENSEN G. and HAMPTON J.R. (1988). Trial of tissue Plasminogen Activator for mortality reduction in acute myocardial infarction (ASSET). *The Lancet*, **ii**, 525-533.

WILHELM O., HAFTER R., HENSCHEN A., SCHMITT M. and GRAEFF H. (1990). Role of plasmin in the Degradation of the Stroma-Derived Fibrin in Human Ovarian Carcinoma. *Blood*, **75**, 1673-1678.

WIMAN B. and COLLEN D. (1977). Purification and characterization of Human Antiplasmin, the Fast-Acting Plasmin Inhibitor in Plasma. *Eur. J. Biochem.* **78**, 19-26.

WIMAN B. and COLLEN D. (1978). On the Kinetics of the Reaction between Human Antiplasmin and Plasmin. *Eur. J. Biochem.*, **84**, 573-578.

WIMAN B., LIJNEN H.R. and COLLEN D. (1979). On the specific interaction between the lysine-binding sites in plasmin and complementary sites in α 2-antiplasmin and in fibrinogen. *Biochim. Biophys. Acta*, **579**, 142-154.

WIMAN B. (1980). On the reaction of plasmin or plasmin-streptokinase complex with aprotinin or α 2-antiplasmin. *Thromb. Res.*, **17**, 143-152.

WIMAN B., MELLBRING G. and RANBY M. (1983). Plasminogen activator release during venous stasis and exercise as determined by a new specific assay. *Clin. Chim. Acta*, **127**, 279-288.

WU H.L., SHI G.Y., WOHL R.C. and BENDER M.L. (1987). Structure and formation of microplasmin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 8793-8795.

WUN T.C. (1988). Plasminogen activation: biochemistry, physiology, and therapeutics. *Crit. Rev. Biotechnol.*, **8**, 131-148.

YUEN P. and KWAAN H.C. (1983). Fibrinolytic Activity in Human Tumor Tissues. *Cancer Invest.*, **1**, 369-378.

ANNEXES

ANNEXE 1: COMPOSITION DES TAMPONS

A/ TAMPON BORATE

| | |
|----------------------------|---------------------------------------|
| Acide borique: | 0,05 M (soit 3.09 g) |
| EDTA-Na ₂ : | 1,5.10 ⁻³ M (soit 0.558 g) |
| Na ₃ N: | 0.03 M (soit 1.95 g) |
| Triton X-100: | 0.03 M (soit 2.0 g) |
| PEG 6000: | 5.10 ⁻³ M (soit 30.0 g) |
| H ₂ O distillée | qsp 1000 mL |

Le pH est ajusté à 8 à l'aide de NaOH 3N

B/ MILIEU DE JENNESS ET KOOPS (1962)

| | |
|---|-----------------------|
| KH ₂ PO ₄ | 11.6 mM (soit 1.58 g) |
| K ₃ citrate, H ₂ O | 1.6 mM (soit 0.51 g) |
| Na ₃ citrate, 5 H ₂ O | 6.1 mM (soit 2.12 g) |
| K ₂ SO ₄ | 1 mM (soit 0.18 g) |
| CaCl ₂ , 2 H ₂ O | 9 mM (soit 1.32 g) |
| Mg ₃ citrate, H ₂ O | 1.8 mM (soit 0.50 g) |
| K ₂ CO ₃ | 2.2 mM (soit 0.30 g) |
| KCl | 14.5 mM (soit 1.08 g) |
| Lactose | 147 mM (soit 50 g) |
| H ₂ O | qsp 1000 mL |

Le pH est ajusté à 6.60 par KOH 1 N

ANNEXE 2: PROTOCOLES DE COUPLAGE

A/ COUPLAGE Ms ET ETHANOLAMINE (CLIQUET et al, 1993)

Ms: lot 16000 (38.9 mg/mL)

Solution d'éthanolamine (A):

- | | |
|-----------------------------|------------|
| - Ethanolamine | 3 mL |
| - Acide borique 0.05 M pH 8 | 15 mL |
| - Acide acétique | qsp pH 7.8 |

Tampon de couplage: acide borique 0.05 M, pH 8, dégazé et saturé en Argon

Le couplage se fait suivant le protocole suivant:

1/ Couplage:

- | | |
|----------------------|----------|
| - Ms | 10 mg |
| - Solution A | 0.050 mL |
| - Tampon de couplage | qsp 1 mL |

—> Incubation 24 heures à température ambiante

2/ Récupération:

- Centrifuger 10 minutes à 5000 g
- Récupérer le précipité et le redissoudre dans 1 mL d'acide borique 0.05 M pH 8.

Après trois lavages successifs dans l'acide borique, reprendre les Ms-Eth dans un volume du même tampon, de façon à ce que leur concentration finale soit de 20 mg/mL.

B/ COUPLAGE Ms ET IMMUNOGLOBULINES G (MONTAGNE et al, 1991)

Ms: lot 16000 (38.9 mg/mL)

Solution de gamma Globulines bovines (GGB): 14 mg/mL en tampon de couplage

Solution d'Albumine sérique humaine (ASH): 6 mg/mL en tampon de couplage

Tampon de couplage: acide borique 0.05 M pH 8, dégazé et saturé en Argon

Solution d'éthanolamine (A):

| | |
|-----------------------------|------------|
| - Ethanolamine | 3 mL |
| - Acide borique 0.05 M pH 8 | 15 mL |
| - Acide acétique | qsp pH 7.8 |

Le protocole de couplage est le suivant:

1/ Couplage:

| | |
|----------------------|----------|
| - Ms | 10 mg |
| - ASH | 1.2 mg |
| - GGB | 0.361 mg |
| - Tampon de couplage | qsp 1 mL |

---> Incubation 2 heures à température ambiante, puis 14 heures à +4°C

2/ Saturation:

Ajouter au mélange du couplage:

| | |
|---------------|----------|
| - Solution A: | 0.050 mL |
|---------------|----------|

---> Incubation 2 heures à température ambiante

3/ Récupération:

Les Ms sensibilisées et les ligands non couplés sont séparés par centrifugation sur gradient discontinu de saccharose (20%-80%) préparé dans le tampon de couplage (1 heure à 15000 g).

Les Ms couplées sont récupérées à l'interface des deux solutions. Un volume de tampon A égal à celui récupéré est ensuite ajouté aux microsphères.

ANNEXE 3: TRAITEMENT DES ECHANTILLONS

A/ TRAITEMENT PAR DES Ms-ETHANOLAMINE (CLIQUET et al, 1993)

Ms-Ethanolamine (MsEth): solution à 20 mg/mL en tampon borate
0.05M, pH 8.0

Echantillons: sérums, laits, solutions de caséines

Le protocole est le suivant:

- MsEth: 20 mg
- Echantillon 1 mL

—> Temps d'incubation: 1 heure

—> Centrifugation 10 minutes à 5000 g

Récupération du surnageant, correspondant à l'échantillon traité.

B/ TRAITEMENT AU TRIFLUOROTRICHLORETHANE

Le trichlorotrifluoroéthane (lipoclean®, Behring) est un clarifiant, constitué d'une phase organique, qui permet de séparer les lipides des autres constituants d'un sérum ou d'un lait.

Le protocole est le suivant:

- Trichlorotrifluoroéthane: 1 volume
- Echantillon: 1 volume

Agiter 1 minute de façon à mélanger les deux phases.

Centrifuger 10 minutes à 5000 g. Les deux phases sont séparées et les graisses se situent à la limite supérieure de la phase organique.

C/ PRECIPITATION DES CASEINES D'UN LAIT AU pH ISOELECTRIQUE

Le protocole, décrit par DESNOUVEAUX (1984), est le suivant:

- Lait frais 1 mL
- Acide acétique 33.3% (v/v) 0.030 mL

—> Incuber 10 minutes à 37°C

Ajouter:

- Acétate de sodium 33.3 N 0.030 mL

—> Incuber 3 minutes à 37°C

Les caséines sont ensuite séparées du surnageant par centrifugation 1 heure à 2000 g.

ANNEXE 4: TABLEAUX RELATIFS AU DOSAGE DU BPg PAR INM

**TABLEAU 1: EFFET DE LA COMPOSITION DU TAMPON SUR
L'AGGLUTINATION MsDxAChP_g/BP_g/AsBP_g***

| BP_g (ng/mL) | 131 | | | 263 | | | 525 | | | 1050 | | |
|-----------------------------------|------------|-----|-----|------------|-----|-----|------------|-----|-----|-------------|-----|-----|
| PEG | 3 | 4 | 5 | 3 | 4 | 5 | 3 | 4 | 3 | 4 | 5 | |
| pH↓ | | | | | | | | | | | | |
| 6.5 | 182 | 216 | 237 | 262 | 275 | 267 | 283 | 274 | 271 | 296 | 295 | 277 |
| 7 | 145 | 184 | 203 | 236 | 263 | 250 | 280 | 285 | 265 | 303 | 289 | 274 |
| 7.5 | 126 | 156 | 187 | 193 | 238 | 249 | 263 | 274 | 264 | 301 | 295 | 267 |
| 8 | 115 | 122 | 92 | 164 | 193 | 218 | 236 | 247 | 264 | 268 | 275 | 280 |

| Troupeau | 1 jul | 8 jul | 21 jul | 28 jul | 5 aoû | 12 aoû | 2 sep | 8 sep | 22 sep | 29 sep | 7 oct | 14 oct | 20 oct | 28 oct | Moyenne troupeau | Corrél° CN bêta (r) |
|-----------------|------------------|------------------|-------------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|------------------|-------------------|-------------------|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-----------------------------|--------------------------------|
| 1 (F) | 3.35 | | 1.85 | | 2.13 | | 1.78 | | 1.59 | | 1.49 | | 1.37 | | 1.94 | -0.293 NS à 0.1 |
| 2 (N) | 2.68 | | 1.75 | | 2.39 | | 1.83 | | 1.85 | | 1.65 | | 1.78 | | 1.99 | -0.339 NS à 0.1 |
| 3 (M) | 2.05 | | 1.8 | | 2.39 | | 1.85 | | 2.36 | | 2.05 | | 1.46 | | 2.02 | -0.406 NS à 0.1 |
| 4 (F) | 2.36 | | 1.62 | | 1.93 | | 1.9 | | 1.41 | | 1.65 | | 1.75 | | 1.80 | -0.208 NS à 0.1 |
| 5 (N) | 3.24 | | 1.83 | | 2.41 | | 1.85 | | 1.65 | | 1.7 | | 1.37 | | 2.01 | -0.682 p=0.1 |
| 6 (N) | 3.16 | | 1.59 | | 2.25 | | 1.46 | | 1.59 | | 1.8 | | 1.12 | | 1.85 | -0.663 NS à 0.1 |
| 7 (N) | | 2.25 | | 1.49 | | 2.07 | | 1.51 | | 1.22 | | 1.22 | | 1.54 | 1.61 | 0.406 NS à 0.1 |
| 8 (N) | | 3.12 | | 1.88 | | 2.34 | | 1.95 | | 1.88 | | 1.7 | | 1.62 | 2.07 | 0.454 NS à 0.1 |
| 9 (M) | | 2.9 | | 1.83 | | 2 | | 1.8 | | 1.98 | | 1.67 | | 1.05 | 1.89 | -0.091 NS à 0.1 |
| 10 (N) | | 2.88 | | 1.8 | | 2.36 | | 1.88 | | 1.85 | | 1.73 | | 1.80 | 2.04 | 0.542 NS à 0.1 |
| 11 (F) | | | | 1.73 | | 2.27 | | 1.51 | | 1.73 | | 1.67 | | 1.59 | 1.75 | -0.574 NS à 0.1 |
| 12 (M) | | 2.41 | | 1.75 | | 2.22 | | 1.43 | | 1.9 | | 1.54 | | 1.51 | 1.82 | 0.414 NS à 0.1 |
| 13 (F) | | 3.33 | | 1.65 | | 2.17 | | 1.62 | | 2.18 | | 1.62 | | 1.49 | 2.01 | 0.191 NS à 0.1 |
| 14 (M) | | | | | | | 1.62 | | 2.08 | 1.75 | | | 1.49 | | 1.74 | |
| MOYENNE | 2.81 | 2.82 | 1.77 | 1.73 | 2.25 | 2.20 | 1.76 | 1.67 | 1.79 | 1.81 | 1.72 | 1.59 | 1.48 | 1.51 | 1.90 | |

Tableau 2: Teneurs en BPg des laits sélectionnés et corrélation avec les teneurs en caséine β

| | |
|---|-----|
| <u>Tableau 1</u> : Caractéristiques des troupeaux sélectionnés pour l'étude | 266 |
| <u>Tableau 2</u> : Teneurs en caséine β des laits de troupeau | 267 |
| <u>Tableau 3a</u> : Teneurs en matière protéique totale des laits de troupeau | 268 |
| <u>Tableau 3b</u> : Teneurs en matière grasse des laits de troupeau | 269 |
| <u>Tableau 3c</u> : Teneurs en lactose des laits de troupeau | 270 |
| <u>Tableau 3d</u> : Teneurs en extrait sec total des laits de troupeau | 271 |

Tableau 1 : Caractéristiques des troupeaux sélectionnés pour l'étude

| <u>Producteur</u> | <u>Race du troupeau</u> | <u>Caséine β (g/L)</u> |
|-------------------|-------------------------|---|
| 1 | Frisonne | 6,3 |
| 2 | Normande | 6,5 |
| 3 | Mixte | 5,8 |
| 4 | Frisonne | 6,0 |
| 5 | Normande | 7,2 |
| 6 | Normande | 6,9 |
| 7 | Normande | 7,9 |
| 8 | Normande | 6,8 |
| 9 | Mixte | 6,7 |
| 10 | Normande | 6,6 |
| 11 | Frisonne | 6,3 |
| 12 | Mixte | 6,4 |
| 13 | Frisonne | 6,3 |
| 14 | Mixte | 6,5 |

Le classement se fait selon trois groupes : troupeaux de race Normande ou Française Frisonne Pie Noire (au moins 85% du cheptel) et troupeaux mixtes (Mx) (de 35 à 75% de l'une ou l'autre des races).

Les lundis et mardis de chaque semaine, les laits de 7 troupeaux sont collectés chez les producteurs. Chaque échantillon, représentant 2 à 4 traites successives, est additionné d'azide de sodium (0.2%) et conservé entre 1 et 4°C jusqu'au dosage qui a lieu le jeudi. L'étude a été menée du premier juillet 1993 au 31 octobre 1993.

Tableau 2 : Teneurs en caséine β des laits de troupeau

| <u>Producteur</u> | <u>Juillet</u> | | <u>Août</u> | <u>Septembre</u> | | <u>Octobre</u> | | <u>Moyenne</u> |
|-------------------|----------------|-----|-------------|------------------|-----|----------------|-----|----------------|
| 1 | 6,4 | 6,0 | 6,4 | 6,8 | 5,3 | 7,5 | 8,1 | 6,6 |
| 2 | 6,5 | 6,5 | 6,7 | 6,4 | 5,9 | 8,0 | 8,0 | 6,9 |
| 3 | 5,3 | 5,3 | 5,5 | 6,0 | 7,3 | 6,9 | 8,0 | 6,3 |
| 4 | 6,0 | 6,6 | 5,3 | 6,4 | 5,7 | 7,0 | 7,1 | 6,3 |
| 5 | 6,9 | 7,6 | 7,4 | 7,3 | 7,4 | 8,9 | 9,0 | 7,8 |
| 6 | 6,3 | 7,4 | 5,8 | 7,3 | 6,3 | 7,2 | 7,5 | 6,8 |
| 7 | 9,7 | 8,6 | 8,9 | 8,8 | 9,7 | 8,1 | 8,8 | 8,9 |
| 8 | 8,3 | 7,1 | 6,4 | 6,5 | 7,6 | 6,9 | 7,5 | 7,2 |
| 9 | 7,4 | 6,6 | 5,9 | 6,9 | 7,7 | 6,6 | 7,8 | 7,0 |
| 10 | 8,0 | 6,7 | 7,0 | 7,4 | 7,9 | 6,9 | 7,0 | 7,3 |
| 11 | | 6,1 | 5,8 | 6,9 | 7,3 | 5,9 | 6,9 | 6,5 |
| 12 | 7,8 | 6,2 | 6,0 | 6,2 | 6,4 | 6,5 | 6,9 | 6,6 |
| 13 | 6,4 | 6,4 | 4,7 | 5,6 | 6,3 | 5,7 | 6,1 | 5,9 |
| 14 | | | | 6,6 | 7,7 | 7,7 | | 7,3 |

Tableau 3a : Teneurs en matière protéique totale des laits de troupeau

| <u>Producteur</u> | <u>Juillet</u> | <u>Août</u> | <u>Septembre</u> | <u>Octobre</u> | <u>Moyenne</u> |
|-------------------|----------------|-------------|------------------|----------------|----------------|
| 1 | 32,3 | 31,7 | 31,5 | 32,7 | 32,1 |
| 2 | 32,8 | 32,7 | 34,7 | 33,8 | 33,5 |
| 3 | 31,5 | 31,7 | 33,8 | 35,1 | 33,0 |
| 4 | 31,8 | 31,6 | 33,1 | 33,2 | 32,4 |
| 5 | 32,9 | 33,7 | 34,6 | 35,0 | 34,1 |
| 6 | 34,3 | 34,0 | 34,8 | 33,8 | 34,2 |
| 7 | 36,7 | 36,8 | 37,6 | 38,1 | 37,8 |
| 8 | 35,0 | 33,1 | 33,5 | 33,5 | 33,8 |
| 9 | 32,3 | 33,0 | 33,9 | 33,9 | 33,3 |
| 10 | 32,4 | 32,2 | 34,5 | 34,2 | 33,3 |
| 11 | 30,7 | 29,9 | 30,8 | 31,5 | 30,7 |
| 12 | 30,2 | 30,3 | 31,8 | 32,0 | 31,1 |
| 13 | 31,9 | 30,9 | 31,3 | 29,2 | 30,8 |
| 14 | 32,5 | 33,0 | 33,5 | 31,1 | 32,5 |

Tableau 3b : Teneurs en matière grasse des laits de troupeau

| <u>Producteur</u> | <u>Juillet</u> | <u>Août</u> | <u>Septembre</u> | <u>Octobre</u> | <u>Moyenne</u> |
|-------------------|----------------|-------------|------------------|----------------|----------------|
| 1 | 38,6 | 38,4 | 39,6 | 44,5 | 40,3 |
| 2 | 36,3 | 37,3 | 39,4 | 40,8 | 38,5 |
| 3 | 38,9 | 37,8 | 39,6 | 45,4 | 40,4 |
| 4 | 38,3 | 38,1 | 40,5 | 42,6 | 39,9 |
| 5 | 49,1 | 49,7 | 53,3 | 49,6 | 50,4 |
| 6 | 41,9 | 41,8 | 42,5 | 42,2 | 42,1 |
| 7 | 52,2 | 51,8 | 53,9 | 54,0 | 53,0 |
| 8 | 42,7 | 42,4 | 41,2 | 44,4 | 42,7 |
| 9 | 41,5 | 40,7 | 43,3 | 44,5 | 42,5 |
| 10 | 39,0 | 39,3 | 44,0 | 41,8 | 41,0 |
| 11 | 40,0 | 39,9 | 39,9 | 40,7 | 40,1 |
| 12 | 39,9 | 39,8 | 42,0 | 43,7 | 41,4 |
| 13 | 41,1 | 40,3 | 42,4 | 41,5 | 41,3 |
| 14 | 39,6 | 41,5 | 42,5 | 40,8 | 41,1 |

Tableau 3c : Teneurs en lactose des laits de troupeau

| <u>Producteur</u> | <u>Juillet</u> | <u>Août</u> | <u>Septembre</u> | <u>Octobre</u> | <u>Moyenne</u> |
|-------------------|----------------|-------------|------------------|----------------|----------------|
| 1 | 48,5 | 47,1 | 46,2 | 48,1 | 47,5 |
| 2 | 48,6 | 49,0 | 47,0 | 47,2 | 48,0 |
| 3 | 49,6 | 49,9 | 48,6 | 47,9 | 49,0 |
| 4 | 48,8 | 47,7 | 46,8 | 47,0 | 47,6 |
| 5 | 50,6 | 48,5 | 48,1 | 49,4 | 49,1 |
| 6 | 47,5 | 47,1 | 46,5 | 46,0 | 46,8 |
| 7 | 51,2 | 50,4 | 49,4 | 49,2 | 50,1 |
| 8 | 49,1 | 47,8 | 47,2 | 47,4 | 47,9 |
| 9 | 48,0 | 47,2 | 47,5 | 47,8 | 47,6 |
| 10 | 47,5 | 46,7 | 45,8 | 46,8 | 46,7 |
| 11 | 46,9 | 47,2 | 47,5 | 47,2 | 47,2 |
| 12 | 48,2 | 46,8 | 45,5 | 45,6 | 46,5 |
| 13 | 46,8 | 45,8 | 45,0 | 47,9 | 46,4 |
| 14 | 48,8 | 47,4 | 48,2 | 48,9 | 48,3 |

Tableau 3d : Teneurs en extrait sec total des laits de troupeau

| <u>Producteur</u> | <u>Juillet</u> | <u>Août</u> | <u>Septembre</u> | <u>Octobre</u> | <u>Moyenne</u> |
|-------------------|----------------|-------------|------------------|----------------|----------------|
| 1 | 127,5 | 125,1 | 125,3 | 134,5 | 128,1 |
| 2 | 124,3 | 127,0 | 128,0 | 131,9 | 127,8 |
| 3 | 126,8 | 126,4 | 129,4 | 135,5 | 129,5 |
| 4 | 126,1 | 125,7 | 128,3 | 132,1 | 128,1 |
| 5 | 138,9 | 138,2 | 141,1 | 140,4 | 139,7 |
| 6 | 131,1 | 130,8 | 131,9 | 130,4 | 131,1 |
| 7 | 147,1 | 146,5 | 147,7 | 149,2 | 147,6 |
| 8 | 134,0 | 130,1 | 129,2 | 130,8 | 131,0 |
| 9 | 129,5 | 127,4 | 132,3 | 133,5 | 130,7 |
| 10 | 127,2 | 126,9 | 131,8 | 130,8 | 129,2 |
| 11 | 125,2 | 125,1 | 125,9 | 127,1 | 125,8 |
| 12 | 125,6 | 124,2 | 126,8 | 129,6 | 126,6 |
| 13 | 126,0 | 125,6 | 125,4 | 125,7 | 125,7 |
| 14 | 128,7 | 128,8 | 131,8 | 128,2 | 129,4 |

**PUBLICATIONS
ET
COMMUNICATIONS**

Notre recherche, dont cette thèse en est une partie, a conduit aux publications et communications suivantes :

PUBLICATIONS

1- Microparticle Enhanced Nephelometric Immunoassay: I- Measurement of α S and κ Casein (1991). COLLARD-BOVY C., MARCHAL E., HUMBERT G., LINDEN G., MONTAGNE P., EL BARI N. and DUHEILLE J. . *J. Dairy Sci.*, **74**, 3695-3701.

2- Microparticle Enhanced Nephelometric Immunoassay: II- Measurement of α Lactalbumin and β Lactoglobulin (1991). MARCHAL E., COLLARD-BOVY C., HUMBERT G., LINDEN G., MONTAGNE P. and DUHEILLE J. . *J Dairy Sci.*, **74**, 3702-3708.

3- Microparticle Enhanced Nephelometric Immunoassay: III- Applications to Milk and Dairy Products (1991). HUMBERT G., COLLARD-BOVY C., MARCHAL E., LINDEN G., MONTAGNE P. and DUHEILLE J. *J Dairy Sci.*, **74**, 3709-3715.

COMMUNICATIONS

1- Rapid measurement of the cow milk alkaline proteinase by a new microparticular Immunonephelometric inhibition assay. MARCHAL E., MONTAGNE P., HUMBERT G., DUHEILLE J. and LINDEN G. (1989). In "Agriculture, Food chemistry and the consumer", Proceedings of Euro Food Chem V, Versailles, **Vol I**, 346-350.

2- Applications on Milk and Dairy Products of a new Microparticular Enhanced Nephelometric Immunoassay (NEPHELIA®). COLLARD-BOVY C., HUMBERT G., MARCHAL E., MONTAGNE P., DUHEILLE J. and LINDEN G. (1990). XXIII° Intern. Dairy Congress, Montreal, 8-12 Oct., **Vol I**, 223, abstract 416.



IMMUNONEPHELEMETRIE MICROPARTICULAIRE :
SYSTEME PROTEOLYTIQUE DU PLASMINOGENE DANS LE SANG HUMAIN ET
LE LAIT BOVIN

RESUME

Le but de ce travail est de développer une méthode de dosage du plasminogène qui puisse s'appliquer dans divers milieux biologiques.

L'immunonéphélémétrie microparticulaire permet de doser cette proenzyme dans le sang humain et le lait bovin, deux milieux où les conséquences de la protéolyse qu'elle implique sont très différentes.

Les systèmes mis au point pour les deux milieux sont bâtis sur le même principe d'immunocapture et le dosage du plasminogène humain a pu servir de base pour le développement du dosage du plasminogène bovin. La sensibilité optimale de tels systèmes est de 5 ng/mL.

Le dosage d'échantillons de lait nécessite un pré-traitement de ceux-ci afin d'éliminer l'influence des caséines sur les réactifs microparticulaires.

L'étude sur 4 mois des teneurs en plasminogène et caséine β de 14 troupeaux sélectionnés montre leurs variations saisonnières et l'absence de liens entre les deux paramètres.

MOTS -CLES

PLASMINOGENE, HOMME, SANG, BOVIN, LAIT, DOSAGE, NEPHELOMETRIE,
IMMUNCOMPLEXE, PARTICULE, AGGLUTINATION, CASEINE BETA,
CORRELATION