HAL
open science

Développement et transfert technologique de procédés chromatographiques destinés à la préparation de composés biologiques à usage thérapeutique : exemples de la purification du Facteur VIII et de l'immunoépuration du LDL-cholestérol

Marc De Seyssel

To cite this version:

Marc De Seyssel. Développement et transfert technologique de procédés chromatographiques destinés à la préparation de composés biologiques à usage thérapeutique : exemples de la purification du Facteur VIII et de l'immunoépuration du LDL-cholestérol. Médecine humaine et pathologie. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 1992. Français. NNT : 1992NAN19002 . tel-01747916

HAL Id: tel-01747916

https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01747916v1

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.

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

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

UNIVERSITE DE NANCY I

FACULTE DE MEDECINE
G.F.D. : GENIE BIOLOGIQUE

THESE

Présentée pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE NANCY I

Spécialité : Génie biologique

par

Mr Marc de SEYSSEL

DEVELOPPEMENT ET TRANSFERT TECHNOLOGIQUE DE PROCEDES CHROMATOGRAPHIQUES DESTINES A LA PREPARATION DE COMPOSES BIOLOGIQUES A USAGE THERAPEUTIQUE. EXEMPLES DE LA PURIFICATION DU FACTEUR VIII ET DE L'IMMUNOEPURATION DU LDL-CHOLESTEROL.

Soutenue publiquement devant la commission d'examen

le 30 Mars 1992

Membres du jury :

Président :	Pr J.F. STOLTZ
Rapporteurs :	Pr C. VIGNERON
	Dr E. DELLACHERIE
Examinateurs:	Dr C. RIVAT
	Dr F. SCHOONEMAN
	Dr F. ROBERT

A Monsieur le Professeur F. STREIFF, Directeur du C.R.T.S. de Nancy, pour m'avoir accueilli au sein de ses locaux. Qu'il trouve ici l'expression de ma gratitude et de mes sentiments respectueux.

A Monsieur le Professeur J.F. STOLTZ, Chef du Service Plasma-Fractionnement au C.R.T.S. de Nancy et Directeur de l'INSERM U. 284, pour m'avoir dirigé dans ses différents laboratoires et pour m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury. Qu'il soit assuré ici de ma sincère gratitude.

A Monsieur le Docteur C. RIVAT, Directeur de Recherche à l'unité INSERM U. 284, pour m'avoir dirigé dans ce travail et pour m'avoir accordé sa pleine confiance. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

A Monsieur le Professeur C. VIGNERON, Chef du Service Chimie au C.R.T.S. de Nancy et Madame le Docteur E. DELLACHERIE, Directeur de Recherche au CNRS, pour avoir accepté d'évaluer ce travail en tant que rapporteur. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma profonde gratitude.

A Monsieur le Docteur F. SCHOONEMAN, Chef du Service Plasmaphérèse au C.R.T.S. de Nancy et Madame le Docteur F. ROBERT, Responsable de Fabrication au CRTS de Lyon, pour avoir accepté de juger ce travail. Qu'ils soient assurés de mes sincères remerciements.

A Madame le Docteur V. REGNAULT, Chargé de Recherche à l'INSERM U.284, pour ses conseils scientifiques et son aide dans certaines phases délicates de ce travail.

A Mademoiselle le Docteur C. GESCHIER, Responsable de Fabrication du Service Plasma-Fractionnement au C.R.T.S. de Nancy, pour avoir facilité mon insertion au sein de l'équipe.

A Madame le Docteur I. ADAMOVA du Centre de Recherche Cardiologique de Moscou, Mademoiselle M. LEBRETON et Madame C. TAVERNIER, pour leur association à certaines phases de ce travail.

A toute l'équipe scientifique et technique de l'INSERM U.284 et à tout le personnel du C.R.T.S. de Nancy qui m'ont apporté leur soutient tout au long de ce travail.

Enfin, des remerciements particuliers à ma famille qui m'a permis de me lancer dans cette voie difficile mais combien passionnante qu'est la recherche scientifique.

TABLE DES MATIERES

RESUME 8
ABSTRACT 9
LISTE DES ABREVIATIONS 10
LISTE DES FIGURES 11
LISTE DES TABLEAUX 13
INTRODUCTION GENERALE 14

I. RAPPELS ET DEFINITIONS 15

1. Les protéines plasmatiques 16
    1 Origine 16
    2 Extraction 17
    3 Les anticorps 17
        a Définition 17
        b Structure des anticorps 18
2. Les techniques de purification 20
    1 Techniques basées sur la solubilité 20
    2 Techniques basées sur la taille 22
    3 Techniques basées sur la charge 24
    4 Techniques basées sur l'affinité 24
3. Les techniques chromatographiques 25
    1 Historique 25
    2 Définition 25
    3 La chromatographie d'échange d'ions 26
        a Principe 26
        b Applications 28
    4 La chromatographie d'affinité 29
        a Principe 29
        b Applications 29
        c L'immunoaffinité 32
4. Industrialisation des procédés 32
    1 Historique 32
    2 Principe 33

5. Inocuité virale des produits biologiques 35
1 Historique 35
2 Méthodes d'inactivation des virus 36
3 Validation des procédés 37
4 Règlementation européenne 38

II. PURIFICATION DU FACTEUR VIII 39

A. INTRODUCTION 40
1. Généralités et nomenclature 41
2. Structure du facteur VIII 41
3. Fonction du facteur VIII 44
1 Voie intrinsèque de la coagulation sanguine 44
2 Activation du facteur VIII 46
3 Dégradation protéolytique du facteur VIII 47
4. Déficience du facteur VIII et hémophilie 47
1 Déficience génétique 47
2 Dépistage génétique 49
5. Traitement thérapeutique 50
6. Besoin et production 52
1 Le plasma 52
2 Le cryoprécipité 52
3 Les concentrés de pureté intermédiaire 53
4 Les concentrés de très haute pureté 54
5 Le facteur VIII recombinant 54
7. Objectifs de notre travail 55

B. MATERIELS ET METHODES 57
1. Techniques préparatives 57
1 Matières premières et réactifs 57
2 Prétraitement du cryoprécipité 57
a Prétraitement classique 58
b Prétraitement glycine/NaCl 58
3 Chromatographie sur échangeur d'ions 58
a Echelle laboratoire 58
b Echelle intermédiaire 60
c Echelle pilote 60

2. Techniques analytiques 62
1 Dosage de l'activité du facteur VIIIc 62
2 Dosage du facteur von Willebrand 62
3 Dosage des protéines totales 62
4 Dosage du fibrinogène 63
5 Dosage de la fibronectine 63
6 Dosage des solvant/détergent 63
a Dosage du TNBP 63
b Dosage du cholate de sodium 64
c Dosage du Tween 80 65
7 Contrôles 65
a Stérilité 65
b Pyrogénicité 66
c Toxicité 66

C. RESULTATS 67
1. Adsorption en "batch" 67
2. Adsorption en colonne 68
3. Elution par gradient NaCl 68
4. Elution discontinue 70
5. Optimisation des paramètres 71
6. Purification à l'échelle intermédiaire 72
7. Elimination des agents de l'inactivation des virus 72
8. Prétraitement glycine/NaCl 72
9. Purification à l'échelle pilote 76

D. DISCUSSION 77

E. CONCLUSION 80

III. IMMUNOEPURATION DU LDL-CHOLESTEROL 81

A. INTRODUCTION 82
1. Généralités et nomenclature 83
2. Les Apolipoprotéines B 88
1 Structure des Apolipoprotéines B 88
2 Fonction des Apolipoprotéines B 92

3 Synthèse et assemblage des LDLs 92
3. Le récepteur membranaire 92
1 Structure du récepteur 92
2 Fonction du récepteur 93
4. Pathologies liées au récepteur à Apo B/E et hypercholestérolémie 97
5. Traitement thérapeutique 100
1 Traitements à base de médicaments 100
2 Traitements chirurgicaux 101
3 Traitements par échange plasmatique 101
4 Traitements par épuration sélective 102
a Traitements physiques du plasma 102
b Traitements chromatographiques 102
6. Objectifs de notre travail 104

B. MATERIELS ET METHODES 105
1. Techniques préparatives 105
1 Sélectivité d'épuration des immunoadsorbants 105
2 Purification des anticorps anti Apo B 106
3 Diafiltration des anticorps 106
a Concentration des anticorps 107
b Dialyse des anticorps 107
c Conservation des anticorps 107
4 Couplage sur Sepharose CL-4B 108
5 Conditionnement stérile en colonnes 109
6 Contrôles 110
a Sécurité des gels préparés en réacteur 110
b Capacité des gels préparés en réacteur 110
7 Inactivation des virus par solvant/détergent 111
a Inactivation TNBP/cholate de sodium 111
b Inactivation TNBP/Tween 80 111
c Elimination des solvant/détergent 111
2. Techniques analytiques 112
1 Dosage des protéines 112
2 Dosage des Apolipoprotéines B 112
3 Dosage des anticorps anti Apo B 112
a Dosage par densité optique 112
b Dosage par E.I.D. 112

4 Pureté des anticorps 113
a Analyse en SDS P.A.G.E. 113
b Analyse en F.P.L.C. 115
C. RESULTATS 116
1. Sélectivité d'épuration des immunoadsorbants 116
2. Mise au point d'un dosage d'anticorps 120
3. Préparation des immunoadsorbants 123
1 Purification des anticorps polyclonaux 123
2 Diafiltration des anticorps 127
3 Couplage sur Sepharose CL-4B 128
4. Conditionnement des immunoadsorbants 128
5. Contrôles 129
1 Sécurité des supports 129
2 Capacité d'épuration des supports 129
6. Inactivation des virus dans les solutions d'anticorps 130

D. DISCUSSION 132

E. CONCLUSION 135

CONCLUSION GENERALE 136

BIBLIOGRAPHIE 138

RESUME

L'utilisation de techniques chromatographiques dans la préparation des composés biologiques à usage thérapeutique a permis d'améliorer aussi bien la purification de protéines plasmatiques que le traitement du plasma par épuration en circulation extracorporelle.

Dans le premier exemple d'application destiné à la préparation du facteur VIII antihémophilique, l'insertion d'une étape chromatographique par échangeur d'anions fort a été réalisée dans le procédé classique de purification. Cette étape permet d'obtenir un concentré de facteur VIII de très haute pureté à partir de cryoprécipité. L'optimisation de cette étape au laboratoire a permis de réaliser sa transposition à l'échelle pilote. Le facteur VIII ainsi obtenu possède une activité spécifique de 150 UI/mg de protéines pour un rendement global de 25%. De plus, ce composé a été soumis à une inactivation des virus par solvant/détergent.

Dans le second exemple d'application destiné au traitement de l'hypercholestérolémie familiale, la fabrication de supports chromatographiques à base d'anticorps polyclonaux de chèvre a été réalisée pour permettre le traitement du plasma par immunoépuration du LDL-cholestérol. Des colonnes de 300 ml ont été fabriquées par fixation de 5 mg d'anti Apo B/ ml de Sepharose CL-4B activé au BrCN dans des conditions strictes de stérilité et d'apyrogénicité. Une étude comparative réalisée *in vitro* avec 5 adsorbants utilisés en LDL-aphérèse (Héparine Sepharose, Sulfate de Dextran-Cellulose et 3 immunoadsorbants à base d'anticorps polyclonaux ou monoclonaux) révèle une capacité d'adsorption similaire (4 mg d'Apo B/ml de gel) mais une meilleure sélectivité des immunoadsorbants.

MOTS CLES : Chromatographie, Echange d'ions, Facteur VIII, Inactivation des virus, LDL-aphérèse, Immunoadsorption, Hypercholestérolémie familiale, Transfert technologique.

ABSTRACT

Affinity chromatographic processes offer a powerfull tool for either plasma protein purification or extracorporeal plasma depletion therapy. Two applications were studied, factor VIII purification and LDL-cholesterol immunodepletion.

In the first application, the insertion of an ion-exchange chromatographic step during the preparation of an intermediate purity factor VIIIc concentrate has been successfully investigated using Q Sepharose, a strong anion-exchanger. This procedure allows to obtain a high purity factor VIIIc concentrate from cryoprecipitate. An inactivation step of lipid-enveloped viruses was carried out using a solvent/detergent treatment. Laboratory scale experiments were scaled up with similar results. After diafiltration and freeze-drying, the factor VIIIc concentrate had a specific activity of 150 IU/mg and the overall recovery was of 25 %.

In the second application, the manufacturing of an immunoadsorption column containing monospecific polyclonal goat antibodies to human LDL has been successfully carried out in the treatment of familial hypercholesterolemia by an extracorporeal procedure. The 300 ml columns were prepared by immobilizing 5 mg of antibodies/ml of CNBr-activated Sepharose CL-4B in apyrogenic and sterile conditions. A comparative *in vitro* study achieved with five affinity sorbents used in LDL-Apheresis (Heparin Sepharose, Dextran Sulfate Cellulose, and three immunosorbents containing polyclonal or monoclonal antibodies) reveals similar adsorption capacity (4 mg of Apo B/ml of gel) and a better selectivity of immunosorbents.

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : Acide Désoxyribonucléique
ADNc : ADN copie
Apo A : Apolipoprotéines A
Apo B : Apolipoprotéines B
BrCN : Bromure de cyanogène
CM : Chylomicron
Da : Dalton
° C : Degré Celcius
D.O. : Densité Optique
F.P.L.C. : Fast Protein Liquid Chromatography
F VIII : Facteur VIII
g : gramme
g/l : gramme par litre
G : accélération de la pesanteur
HDL : High Density Lipoprotein
IED : Immuno-électro-diffusion
IgG : Immunoglobuline de classe G
J : jour
kb : kilobase
kDa : kiloDalton
kg : kilogramme
l : litre
l/h : litre/heure
LDL : Low Density Lipoprotein
mA : milliAmpère
min : minute
ml : millilitre
mS : milliSiemens
M : Molaire
µ : force ionique
NaCl : Chlorure de sodium
nm : nanomètre
P.A.G.E. : PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
PBS : Phosphate Buffer Saline (Tampon Phosphate)
PDC : Plasma Dépourvu de Cryoprécipité
PFC : Plasma Frais Congelé
pH : potentiel d'hydrogène
pHi : pH au point isoélectrique
% : pour cent
PPI : Pour Préparation Injectable
ppm : partie par million
rdt : rendement
SDS : Sodium Dodecyl Sulphate
TNBP : Tri-normal Butyl Phosphate
U B : Unité Bethesda
U I : Unité Internationale
U.V. : Ultra Violets
VHB : Virus de l'Hépatite B
VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine
VLDL : Very Low Density Lipoprotein
vWf : von Willebrand factor

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Structure d'une IgG Humaine. 19
Figure 2 : Fractionnement du plasma par la méthode 6 de Cohn. 21
Figure 3 : Principe de l'ultrafiltration. 23
Figure 4 : Principe de la gel filtration. 23
Figure 5 : Principe de la chromatographie d'échange d'ions. 27
Figure 6 : Schéma des principales matrices d'échange d'ions. 28
Figure 7 : Mécanisme de couplage des protéines sur Sepharose Cl-4B par le bromure de cyanogène. 30
Figure 8 : Principe de la chromatographie d'affinité. 31
Figure 9 : Exemple d'automatisation d'une procédure chromatographique à l'échelle industrielle. 34
Figure 10 : Modèle de la forme active du facteur VIII. 42
Figure 11 : Domaines structuraux et activation du facteur VIII. 43
Figure 12 : Représentation schématique de la voie intrinsèque de la coagulation sanguine. 45
Figure 13 : Transmission de l'hémophilie. 48
Figure 14 : Détection de l'hémophilie par sondes d'ADN radiomarquées. 50
Figure 15 : Protocoles de prétraitement du cryoprécipité en vue de la purification du facteur VIII sur Q Sepharose. 57
Figure 16 : Schéma de purification du facteur VIII sur Q Sepharose après prétraitement glycine/NaCl. 61
Figure 17 : PH optimal d'adsorption du Q Sepharose. 67
Figure 18 : Capacité d'adsorption du Q Sepharose en colonne. 68
Figure 19 : Profil d'élution en gradient NaCl. 69
Figure 20 : Influence du citrate de sodium sur le profil chromatographique. 74
Figure 21 : Métabolisme des lipides endogènes et exogènes. 85
Figure 22 : Structure du gène de l'apolipoprotéine B. 89
Figure 23 : Structure de l'apolipoprotéine B 100. 91
Figure 24 : Structure du récepteur des LDL et organisation du gène. 93
Figure 25 : Internalisation cellulaire du LDL-cholesterol. 94
Figure 26 : Déficience des récepteurs à Apo B/E. 96
Figure 27 : Classification des mutations du gène du récepteur à Apo B/E. 98

Figure 28 : Formation de la plaque d'athérome. 99
Figure 29 : Elimination du LDL-cholestérol en circulation extracorporelle. 103
Figure 30 : Profil d'élution de différentes matrices capable d'épurer le LDL-cholestérol. 117
Figure 31 : Sélectivité d'épuration des anticorps anti Apo B (1). 118
Figure 32 : Sélectivité d'épuration des anticorps anti Apo B (2). 119
Figure 33 : Courbes d'étalonnage par électroimmunodiffusion. 121
Figure 34 : Droites d'étalonnage après ajustement logarithmique. 121
Figure 35 : Relation entre l'estimation de la concentration des anticorps par Laurell et par Densité Optique. 122
Figure 36 : Capacité d'adsorption du LDL-Sepharose. 124
Figure 37 : Analyse en SDS-P.A.G.E. des fractions d'anticorps. 125
Figure 38 : Analyse en F.P.L.C. des anticorps purifiés. 126
Figure 39 : Capacité d'épuration des immunoadsorbants préparés en réacteur. 129
Figure 40 : Evaluation des pertes d'anticorps après inactivation des virus. 130
Figure 41 : Capacité d'épuration des anticorps après inactivation des virus. 131

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Récapitulatif des méthodes de couplage de ligand sur support solide. 30

Tableau II : Elution discontinue du facteur VIII sur Q Sepharose en chlorure de sodium. 70

Tableau III : Influence de la concentration en sel de la solution de lavage sur les rendements d'élution du facteur VIII. 71

Tableau IV : Chromatographie sur Q Sepharose après prétraitement glycine/NaCl. 73

Tableau V : Variation des résultats chromatographiques en fonction de la solution de redissolution de la "pâte NaCl". 73

Tableau VI : Influence de la conductivité et de la nature de l'ion sur les rendements d'élution fractionnée du F VIII sur Q Sepharose. 75

Tableau VII : Propriétés et composition des lipoprotéines. 84

Tableau VIII : Classification des hyperlipidémies. 87

Tableau IX : Limitations dans le titrage par E.I.D. des plasmas hyperimmunisés. 122

Tableau X : Purification des anticorps sur LDL-Sepharose. 123

Tableau XI : Evaluation protéique des anticorps purifiés. 125

Tableau XII : Diafiltration des anticorps. 127

Tableau XIII : Couplage des anticorps sur Sepharose CL-4B. 128

INTRODUCTION GENERALE

Les techniques de purification des protéines dans le domaine des biotechnologies se sont considérablement développées ces dix dernières années, notamment dans le secteur biomédical, avec toujours pour objectif principal l'amélioration des procédés en vue de l'obtention de composés à usage thérapeutique possédant des caractéristiques de plus en plus affinées, suivant au plus près l'avancement de nos connaissances dans les différents domaines impliqués et permettant ainsi à l'utilisateur potentiel une sécurité accrue jamais atteinte jusqu'alors.

Ce souci constant d'amélioration ne peut s'obtenir sans une concertation pluridisciplinaire mettant en relation des fondamentalistes, des médecins, des ingénieurs, des commerciaux et des techniciens sans oublier les patients. Cependant, il ne faut pas pour autant négliger l'aspect économique qui intervient pour une grande part lors de la mise au point de tels procédés. Et si l'investissement personnel au départ s'avère des plus risqués, la stimulation n'en est que plus grande, et l'aboutissement n'en est que plus méritoire.

Dans ce travail, nous présentons deux exemples d'application développés récemment l'un au Centre Régional de Transfusion Sanguine de Brabois, l'autre à l'Unité INSERM U 284. Ces deux exemples illustrent l'intégration de la chromatographie dans le secteur Biomédical, le premier comme support technique pour la préparation d'un composé sanguin destiné au traitement de l'hémophilie de type A, le deuxième comme support technique pour l'épuration du plasma humain en circulation extracorporelle destiné au traitement de l'hypercholestérolémie familiale.

I. RAPPELS ET DEFINITIONS

Des progrès majeurs ont été réalisés durant ces 50 dernières années dans la compréhension des mécanismes fondamentaux qui régissent le fonctionnement du corps humain. Ces progrès ont permis en particulier la mise au point et le développement rapide de tout un ensemble de techniques, réunies sous le terme de biotechnologies, qui a complètement révolutionné les moyens d'investigations mis à la disposition des médecins et des biologistes dans la compréhension, la détection et le traitement des anomalies du fonctionnement du corps humain. Aussi, un rappel de quelques uns des faits marquants qui ont permis un tel développement est résumé dans la première partie de ce travail.

La voie classique pour obtenir un nombre de plus en plus croissant de protéines d'intérêt thérapeutique, consiste à les extraire de leur milieu naturel et en cela le sang humain constitue l'une des principales sources qui permet l'obtention de ces protéines qui y sont secrétées en plus ou moins grande quantité selon les besoins de l'organisme. Aussi, de nombreuses techniques du purification ont été développées dans ce but et les plus courantes d'entre elles, qui ont été utilisées dans ce travail, font l'objet d'un rapide tour d'horizon après un rappel de l'origine des protéines plasmatiques.

I.1. LES PROTEINES PLASMATIQUES

I.1.1 Origine

Le sang est un liquide biologique très complexe qui assure, par l'intermédiaire du coeur et des vaisseaux sanguins, la fonction circulatoire de l'homme en particulier et des vertébrés en général.

Ce principe de la circulation sanguine fut admis dès 1628 par l'anglais W. HARVEY. Le sang est constitué d'une partie liquide appelée plasma, composé principalement d'eau, de sels minéraux et de protéines. Il est constitué également d'une partie solide, composée de cellules dont des globules rouges, assurant le transport de l'oxygène, des globules blancs, assurant la défense de l'organisme et des plaquettes, assurant la réparation

de la paroi des vaisseaux sanguins en cas de lésion.

I.1.2 Extraction

Lorsqu'il est prélevé sans précaution particulière, le sang coagule, entraînant la précipitation de sa composante cellulaire et laissant en suspension un liquide appelé sérum qui contient tous les composants du plasma sauf le fibrinogène et les éléments de la coagulation qui ont servi à la formation du caillot sanguin.

De ce fait, si on veut préserver l'intégrité du plasma, le sang doit être prélevé sur un anticoagulant. L'anticoagulant le plus couramment utilisé, mis en évidence dès 1914 par HUSTIN, est le citrate de sodium incorporé au volume sanguin prélevé à raison de 9°/∞ en final. Ce prélèvement est à la base de toute purification de protéines plasmatiques possédant un intérêt thérapeutique certain.

I.1.3. Les anticorps

I.1.3.a Définition

De même que le sang participe à l'apport nutritionnel et énergétique de l'organisme, il participe également à la défense de cet organisme vis-à-vis des agressions extérieures. Ces défenses sont assurées par un système appelé système immunitaire, révélé pour la première fois par E. JENNER dans les années 1790 lorsqu'il inocula à l'homme la vaccine, une maladie bénigne provenant de la vache et qui avait la particularité de protéger l'homme contre la variole.

Ce système de défense spécifique se divise en deux sous systèmes distincts mais complémentaires. D'une part le système immunitaire humoral et d'autre part le système immunitaire à médiation cellulaire (8).

Le système immunitaire humoral est composé principalement d'une classe de protéines appelées immunoglobulines ou anticorps, secrétés chez

l'homme par une lignée cellulaire de la moelle osseuse appelée lymphocytes B et qui circulent dans le sang et les tissus lymphatiques. Ces anticorps ont la propriété de reconnaître spécifiquement les protéines étrangères à l'organisme, dénommées dans ce cas antigènes et de permettre ensuite, par différents processus biologiques, de les éliminer de l'organisme. Cette première défense est réalisée par reconnaissance et formation d'un complexe immun macromoléculaire Antigène-Anticorps qui permet, par la suite, soit l'activation du complément qui est un système enzymatique qui, après reconnaissance du complexe immun, permet la lyse cellulaire, soit l'activation de la fonction phagocytaire des macrophages qui sont des cellules spécialisées dans le nettoyage des débris cellulaires de l'organisme, soit enfin l'activation des cellules tueuses qui sont d'autres lymphocytes participant à la réponse immunitaire.

Le système à médiation cellulaire est, quant à lui, composé d'un ensemble de cellules spécialisées, provenant également de la moelle osseuse mais ayant subi une maturation dans le thymus. Ces cellules spécialisées ou lymphocytes T ont été au préalable sensibilisées à l'antigène et peuvent intercommuniquer entre elles soit directement soit par échange de signaux afin de permettre une lutte localisée efficace et durable contre l'agent agresseur qui peut être aussi bien une grosse molécule qu'une cellule, isolée, voire une population cellulaire entière non reconnue par l'organisme.

I.1.3.b Structure des anticorps

Comme l'ont soupçonné en 1926 L.D. FELTON et G.H. BAILEY, les anticorps ou immunoglobulines sont des protéines qui possèdent une structure en forme de Y composée de 2 moitiés identiques (35) (36) (116) (figure 1). Chaque moitié est constituée d'une chaîne lourde et d'une chaîne légère plus courte. Ces quatre chaînes sont reliées entre elles par des ponts disulfures pour former à la base, une région constante identique à tous les anticorps de même classe et au sommet, une région variable constituant le site de fixation de l'anticorps à l'antigène associé, et dont la structure dans l'espace, définies par une séquence particulière d'acides aminés, est complémentaire de l'antigène associé.

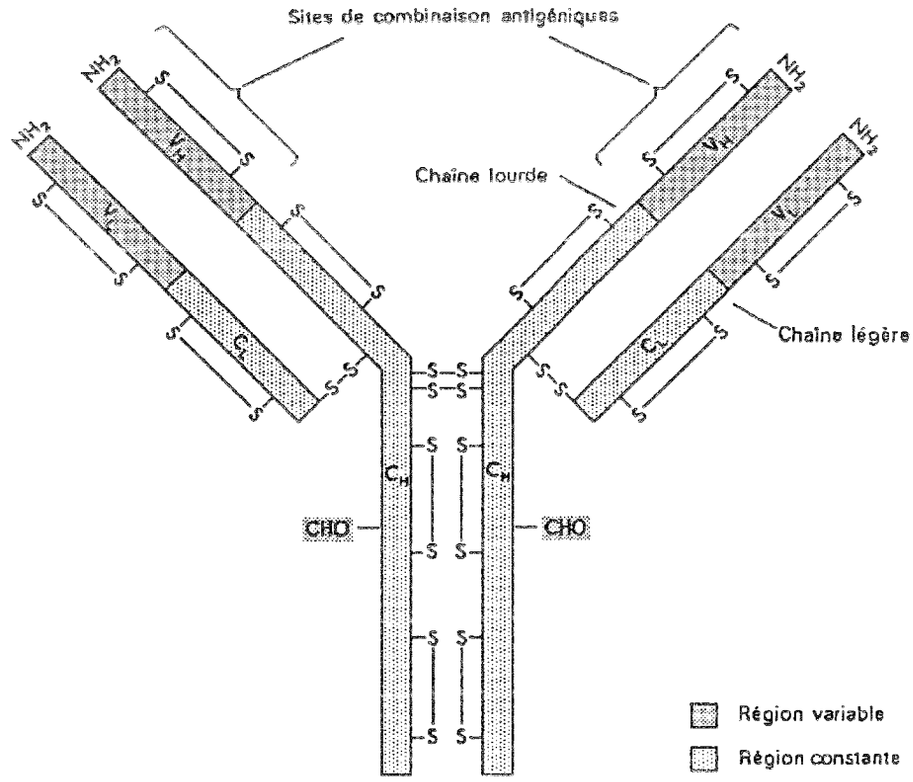


FIGURE 1: STRUCTURE D'UNE IgG HUMAINE. Principale immunoglobuline plasmatique, l'IgG est constituée de deux chaînes polypeptidiques lourdes et de deux chaînes polypeptidiques légères, reliées entre elles par des ponts disulfures. Les sites actifs de la molécule sont situés dans les régions N terminales (d'après WATSON et Coll. 1989).

En fonction de la partie constante, on distingue chez l'homme cinq classes de chaînes lourdes et deux types de chaînes légères λ et K, donnant naissance à cinq familles d'anticorps dont la principale est l'IgG, de poids moléculaire 150 000 Da. Parmi ces cinq familles d'anticorps, l'IgM est la première immunoglobuline synthétisée qui apparait dans le plasma alors que l'IgA est la principale immunoglobuline présente dans les sécrétions externes. La fonction précise des IgM et IgA est, de nos jours, encore inconnue.

Quant à la partie variable des immunoglobulines, celle-ci est spécifique de par sa structure chimique et de par sa conformation à la lignée cellulaire qui lui a donné naissance.

I.2. LES TECHNIQUES DE PURIFICATION

Les techniques de purification des protéines se sont développées à partir de propriétés intrinsèques des protéines selon les 4 principaux caractères physico-chimiques suivants : la solubilité, la taille, la charge et l'affinité.

Ainsi, il existe un large éventail de techniques permettant de purifier les protéines et l'utilisateur pourra faire son choix en fonction des caractéristiques particulières de la protéine recherchée.

I.2.1 Techniques basées sur la solubilité

La solubilité des protéines dans un milieu dépend de leur interaction avec ce milieu. Elle est dépendante des 4 facteurs suivants : la polarité, la température, le pH et la force ionique du milieu.

Ainsi, la variation de l'un ou de plusieurs de ces facteurs permet de jouer sur la solubilité relative des protéines dans le milieu et permet une purification partielle par précipitation fractionnée de ces protéines en solution. Citons pour exemples, les techniques de relargage par les sels neutres, les techniques de précipitation au point isoélectrique, les techniques de précipitation à froid et les techniques de précipitation à l'éthanol.

Le fractionnement de COHN (27), mis au point dès 1941 pour purifier l'albumine à partir du plasma sanguin, est un exemple qui illustre parfaitement ces techniques (figure 2). Cependant, si ces techniques sont faciles à mettre en oeuvre, elles sont peu spécifiques et dans certains cas, dénaturantes.

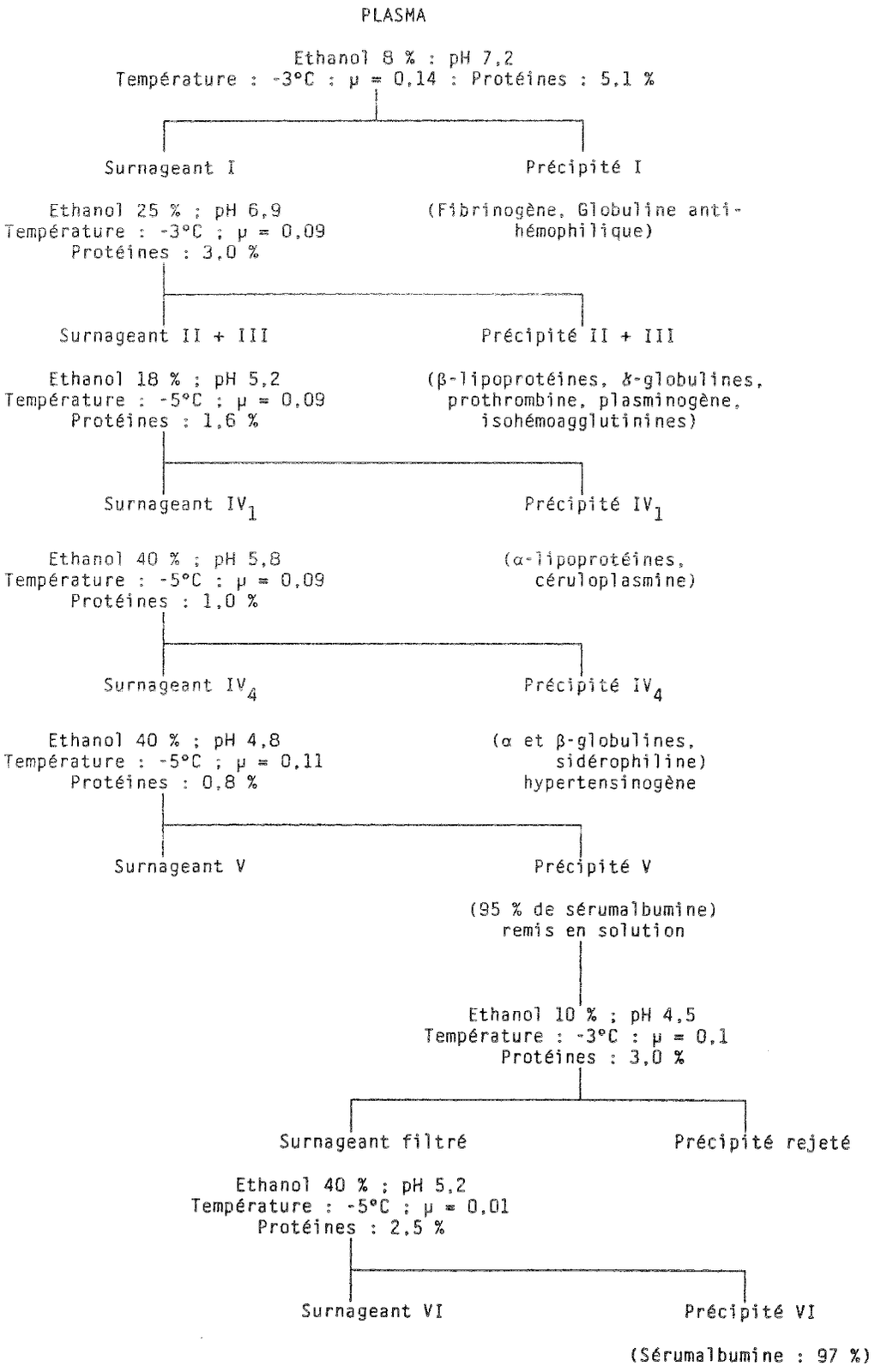


FIGURE 2: FRACTIONNEMENT DU PLASMA PAR LA METHODE ó DE COHN. Les différentes protéines du plasma sont séparées par plusieurs précipitations successives pour conduire à la préparation d'une albumine finale pure à 95 % (d'après COHN et Coll. 1946).

I.2.2 Techniques basées sur la taille

De par leur diversité de taille et de par leur taille relativement importante, les protéines peuvent être facilement séparées de leur milieu et séparées entre elles selon ce critère.

Les principales techniques développées à partir de cette propriété physique sont la dialyse et l'ultrafiltration. Pratiquement, l'utilisation d'une membrane semi-perméable de porosité définie permettra l'élimination sélective de l'eau et des sels minéraux ainsi que des protéines dont la taille sera inférieure au seuil de coupure sélectionné.

Dans la dialyse, ce transfert est passif et soumis aux seules forces d'agitation moléculaire et de pression osmotique alors que dans l'ultrafiltration (figure 3), le transfert est assuré par l'application d'une force externe, que ce soit une pression ou une accélération centrifuge.

On peut également séparer les protéines de taille différente d'après leur coefficient de diffusion dans un milieu, celui-ci étant proportionnel à l'agitation thermique et inversement proportionnel à la viscosité du milieu. Ainsi, soumises à une accélération centrifuge par centrifugation en gradient de densité, les protéines vont diffuser et migrer rapidement jusqu'à atteindre leur équilibre de sédimentation où la force centrifuge sera annulée par les forces de frottement.

Une troisième famille de techniques utilisées, réunies sous les termes de gel filtration, de tamisage moléculaire ou de chromatographie d'exclusion (figure 4), fait appel à l'utilisation d'un support solide, de porosité variable, au travers duquel sera passée une solution de protéines qui, sous l'action de la pesanteur ou d'une pression externe, migrera au travers du support et sera plus ou moins retenue en fonction de la porosité du support utilisé (114).

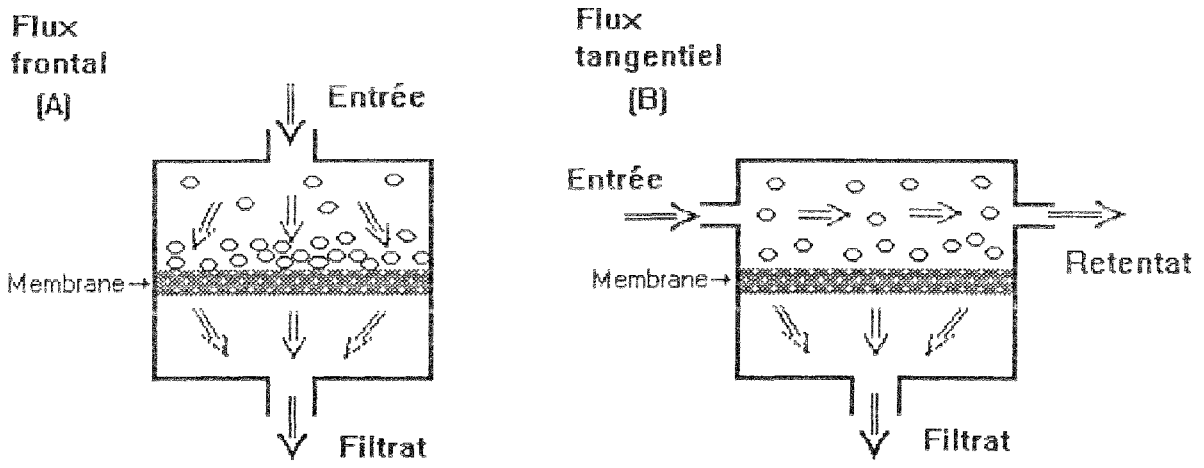


FIGURE 3: PRINCIPE DE L'ULTRAFILTRATION. L'ultrafiltration sur une membrane de porosité variable permet sous l'action d'une pression externe la séparation de molécules selon leur taille (A). L'utilisation d'un système d'ultrafiltration à flux tangentiel permet d'augmenter la durée de vie des membranes par recirculation des molécules retenues (B).

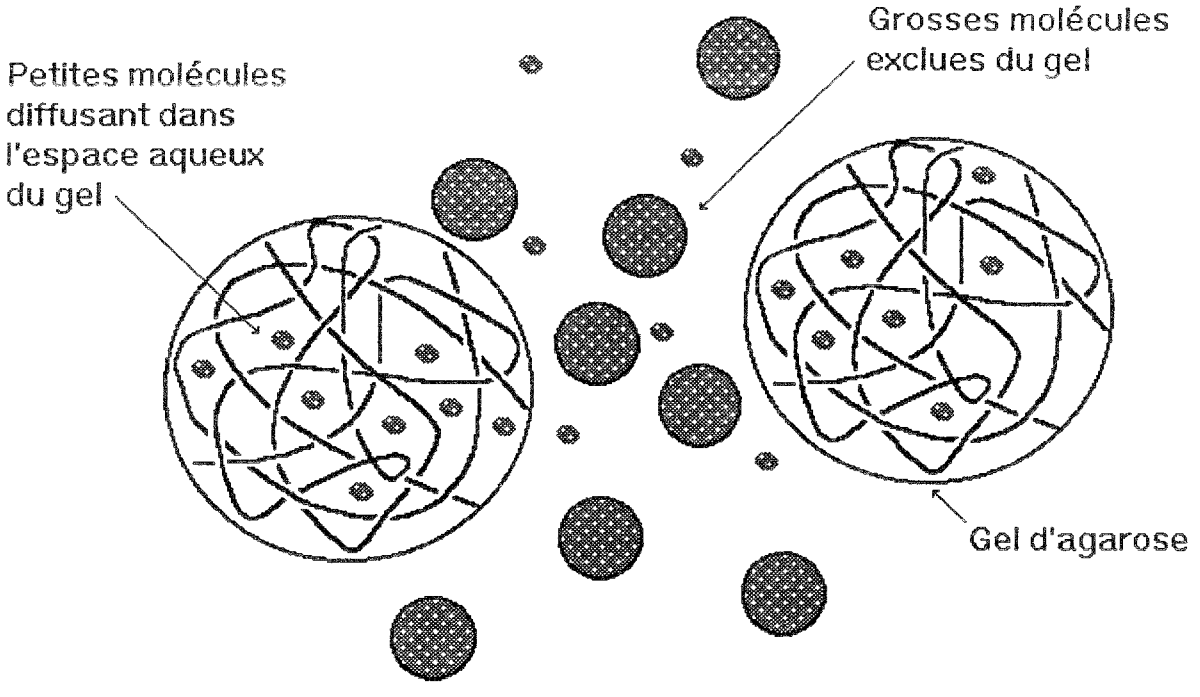


FIGURE 4: PRINCIPE DE LA GEL FILTRATION. Les protéines peuvent être séparées selon leur taille par diffusion dans un gel. Les petites molécules diffuseront au travers des mailles du gel alors que les grosses molécules en seront exclues (d'après STRYER 1981).

I.2.3 Techniques basées sur la charge

De par la présence de groupements chimiques latéraux chargés et ionisables, les protéines en solution possèdent une charge électrique globale qui sera fonction du pH du milieu. Cette charge nette peut être titrée par un acide fort ou une base forte et permettre ainsi de définir le point isoélectrique d'une protéine pour lequel sa charge globale sera nulle. La plupart des protéines plasmatiques ont un point isoélectrique compris entre 4,5 et 6,5 unité pH.

Aussi, lorsque les protéines sont placées dans des conditions de pH différent de leur point isoélectrique, celles-ci vont posséder une charge nette négative ou positive et pourront alors se déplacer sous l'action d'un champ électrique vers l'électrode de signe opposé.

Les techniques faisant appel à cette propriété sont les électrophorèses sur support solide ou en veine liquide, les techniques d'électrofocalisation, et les techniques chromatographiques d'échange d'ions.

I.2.4 Techniques basées sur l'affinité

D'après la diversité de groupements chimiques qui composent les protéines et de par leur localisation dans l'espace, celles-ci peuvent interagir plus ou moins fortement avec leur environnement.

Ces interactions intermoléculaires sont générées par 2 types de groupements chimiques : d'une part les groupements polaires favorisant les interactions ioniques et les liaisons hydrogènes et d'autre part les groupements apolaires favorisant les interactions hydrophobes et les liaisons de type Van der WAALS.

Les techniques de purification basées sur ces propriétés sont des techniques dites d'adsorption sélective où l'on va favoriser l'une de ces interactions en sélectionnant la molécule qui aura une forte affinité pour la protéine que l'on désirera extraire d'un mélange. Cette molécule sélectionnée, encore appelée ligand, sera fixée sur un support solide poreux

au travers duquel on fera passer le mélange. La protéine ainsi retenue devra être ensuite décrochée par neutralisation de l'interaction mise en oeuvre.

Parmi les techniques faisant appel à l'affinité d'une protéine pour son ligand, on peut citer les techniques de chromatographie d'affinité, basées sur la reconnaissance biologique (de type enzyme-substrat, antigène-anticorps, sucre-lectine), et les techniques de chromatographie sur métal immobilisé.

I.3. LES TECHNIQUES CHROMATOGRAPHIQUES

I.3.1 Historique

Les origines de la chromatographie remontent au début du siècle lorsqu'en 1902, M.S. TSWETT réussit à séparer différents pigments colorés à partir d'un extrait de plantes. Cependant, l'essor de la chromatographie fut intimement lié à l'élucidation de la structure primaire des protéines. Les nombreux problèmes de séparation et d'identification des acides aminés furent surmontés en grande partie dès 1942, lorsque A.J.P. MARTIN et R.L.M. SYNGE développèrent des méthodes de séparation basées sur la solubilité relative de certains acides aminés dans deux solvants différents (95). Ce fut le développement de la chromatographie de partage sur papier, abondamment utilisée par F. SANGER à Cambridge lors de l'identification de l'insuline (138).

Quelques années plus tard, S. MOORE et W.H. STEIN à New-York, après avoir décrit la méthode de chromatographie sur résine d'échange d'ions, établirent la structure primaire de la ribonucléase qui est une enzyme de poids moléculaire 13700 Dalton et comprenant 124 acides aminés (105).

I.3.2 Définition

La chromatographie a pour principe le partage des molécules entre une phase mobile qui peut être gazeuse ou liquide et une phase stationnaire généralement solide. Dans le cas où la séparation de molécules biologiques doit être réalisée dans des conditions non dénaturantes, cette séparation sera réalisée préférentiellement entre une phase mobile liquide et une phase

stationnaire solide adsorbante et chimiquement inerte.

Plusieurs théories ont été proposées pour modéliser ce principe dans l'optique de prévoir le comportement des différents constituants au cours de la chromatographie (pouvoir de résolution, taille des pics), et afin d'optimiser les différents paramètres (choix des phases, dimension de la colonne, etc...). Parmi ces théories, citons la théorie des plateaux, la théorie de l'équilibre et les modèles cinétiques.

Sans entrer dans les détails, ces théories ont été développées à partir de modèles expérimentaux relativement simples et elles ne peuvent cependant pas à elles seules, prévoir le comportement chromatographique dans le cas de mélanges complexes tels que le plasma sanguin.

Ainsi, de manière générale, l'optimisation de ces techniques sera réalisée en procédant par étape de manière à faire varier un seul paramètre à la fois.

Après la réalisation des premières chromatographies sur papier, puis sur gel de silice ou de cellulose en couche mince (chromatographie de partage), la chromatographie s'est développée en colonne, ce qui avait l'avantage de pouvoir récupérer les fractions ainsi séparées. Dans cette seconde approche, un mélange de protéines est passé à travers une colonne contenant une matrice poreuse adsorbant le mélange. Les protéines sont alors plus ou moins retenues en fonction de leur affinité avec le support utilisé. De nombreux supports ont été sélectionnés, permettant de séparer les protéines en fonction de leur taille (chromatographie d'exclusion), de leur charge (chromatographie d'échange d'ions), de leur hydrophobicité (chromatographie hydrophobe) ou de leur capacité à se fixer à un groupement chimique particulier (chromatographie d'affinité).

I.3.3 La chromatographie d'échange d'ions

I.3.3.a Principe

La chromatographie d'échange d'ions est une technique d'adsorption semi-sélective, basée sur le caractère amphotère des protéines, c'est-à-dire sur leur capacité à être chargées en solution dans des conditions strictes de pH et de force ionique. C'est en 1946 que MOORE et STEIN en ont décrit le

principe et l'ont appliqué à l'élucidation de la structure primaire de la ribonucléase.

Dans la chromatographie d'échange d'ions, le support utilisé est une matrice naturelle ou synthétique sur laquelle sont greffés des groupements chimiques chargés électriquement. Ces groupements sont entourés de contre ions de charge opposée qui peuvent s'échanger réversiblement entre eux. Ainsi, le passage d'une solution de protéines électriquement chargées et de charge opposée au support permettra leur fixation plus ou moins fortement, suivant la nature du support et suivant la distribution de charge qui caractérise ces protéines (figure 5).

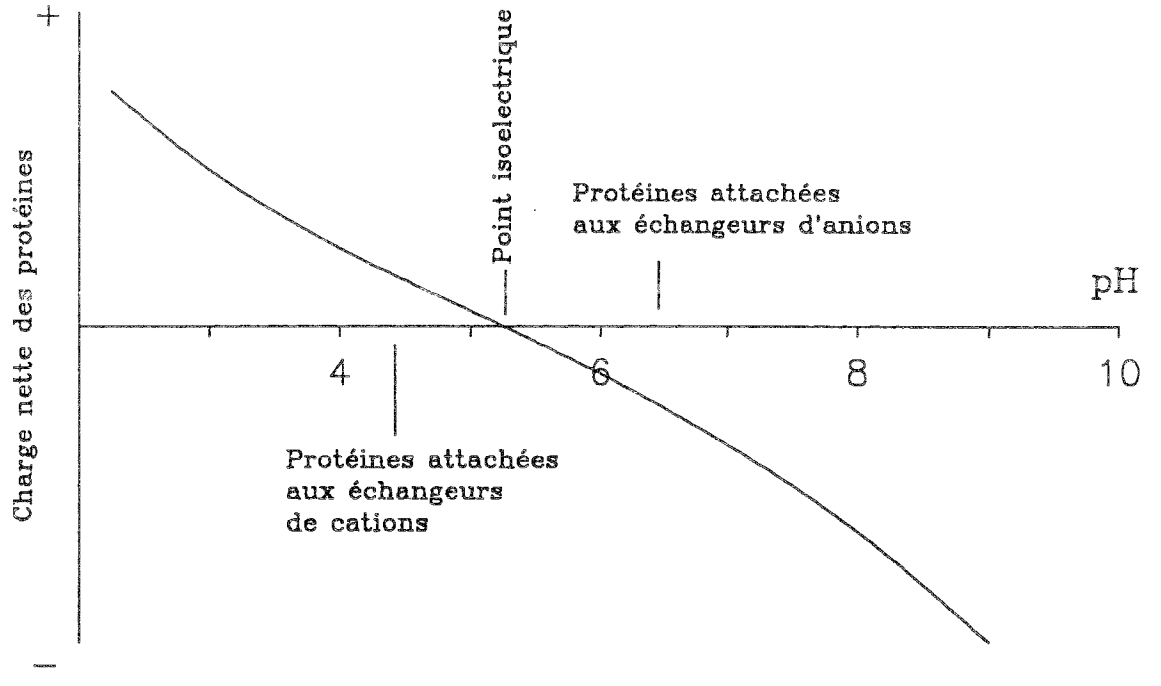


FIGURE 5: PRINCIPE DE LA CHROMATOGRAPHIE D'ECHANGE D'IONS. La charge nette d'une protéine étant fonction du pH du milieu, différentes matrices pourront être sélectionnées dans une gamme de pH permettant la fixation des protéines.

I.3.3.b Applications

Quatres types d'échangeurs d'ions peuvent être utilisés et le choix se fera en fonction de la nature de la protéine à purifier (figure 6). Les échangeurs d'ions se classent en deux catégories : les échangeurs dits "forts" d'une part et les échangeurs dits "faibles" d'autre part.

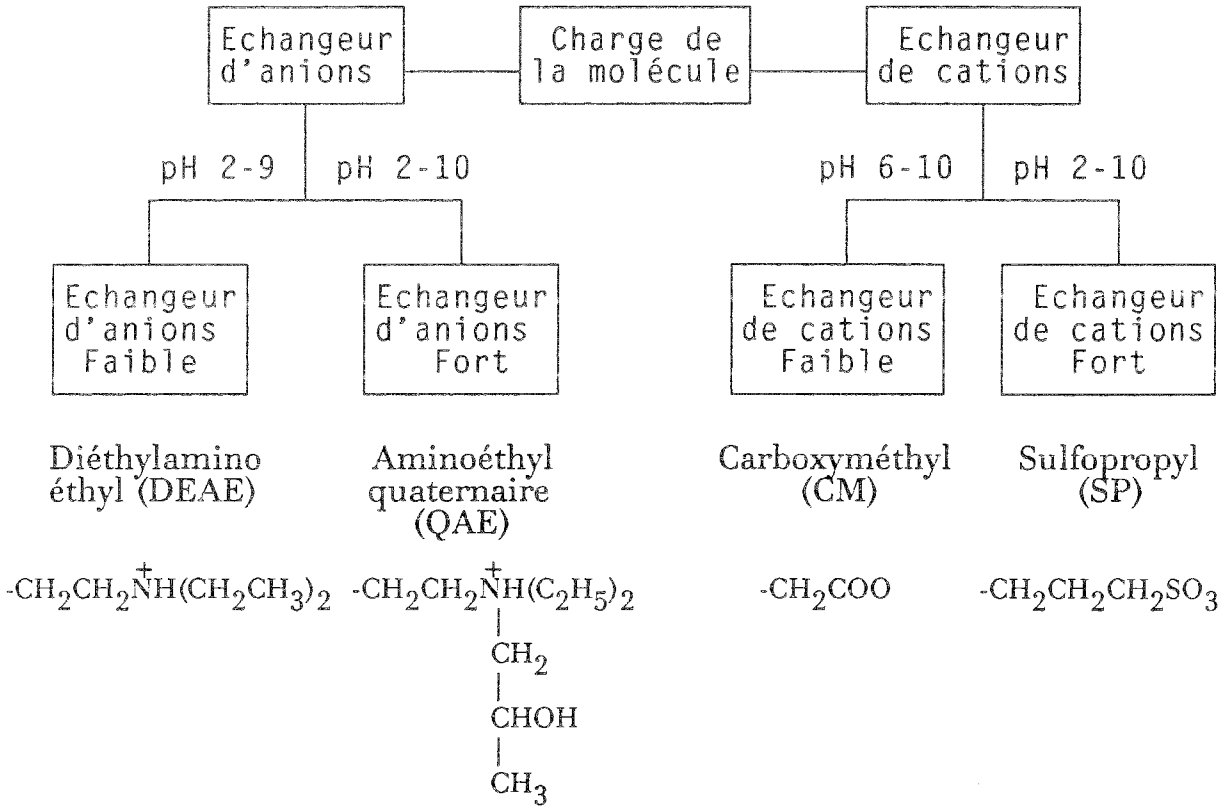


FIGURE 6: SCHEMA DES PRINCIPALES MATRICES D'ECHANGE D'IONS. Suivant le type de protéines à purifier, différentes types de matrice sont disponibles sur le marché et pourront faire l'objet d'un choix en fonction des besoins de l'utilisateur.

Ce classement est fonction du domaine de pH dans lequel ils restent chargés. Les échangeurs forts restent chargés dans des gammes de pH extrêmes alors que les échangeurs faibles perdent rapidement leur charge. Parmi ces deux catégories d'échangeur d'ions, on distingue d'une part les échangeurs d'anions qui sont chargés positivement et d'autre part les échangeurs de cations qui sont chargés négativement. Dans la plupart des cas, un échangeur d'anions fort sera utilisé car il permet de travailler dans

des zones de pH correspondant à la stabilité maximale des protéines en solution (4,5 < pHi < 6,5). L'élution sera ensuite réalisée à l'aide d'un gradient de pH ou de force ionique afin de neutraliser l'interaction mise en oeuvre. L'utilisation d'un gradient de force ionique est préférable car plus facile à réaliser, plus linéaire et permettant une meilleure résolution.

I.3.4 La chromatographie d'affinité

I.3.4.a Principe

La chromatographie d'affinité, telle qu'elle est décrite dans la littérature, est une technique d'adsorption spécifique faisant intervenir des interactions intermoléculaires de type électrostatique ou hydrophobe qui permettent l'association réversible des molécules biologiques entre elles selon le modèle enzyme-substrat.

I.3.4.b Applications

Son origine remonte aux années 1910 lorsque E. STARKENSTEIN tenta de purifier l'α-amylase sur amidon solide. Mais son essor fut véritablement entrepris en 1968 lorsque P. CUATRECASAS, L. WILCHEK et C. ANFINSEN mirent au point les premiers procédés chimiques de fixation du ligand sur support solide (28), basés sur l'obtention d'agarose (115) activée au Bromure de Cyanogène par AXEN et Coll. en 1967 (7) (figure 7). Depuis, d'autres méthodes d'activation furent mises au point et d'autres supports naturels ou synthétiques ont été sélectionnés (tableau I).

De nos jours, l'utilisateur peut donc faire son choix entre différentes matrices et différentes méthodes d'activation, en fonction de ses propres critères de sélection. Ainsi, pour purifier une protéine particulière, il lui suffit de posséder le ligand spécifique, de le fixer sur une matrice adéquate et de réaliser la purification (figure 8).

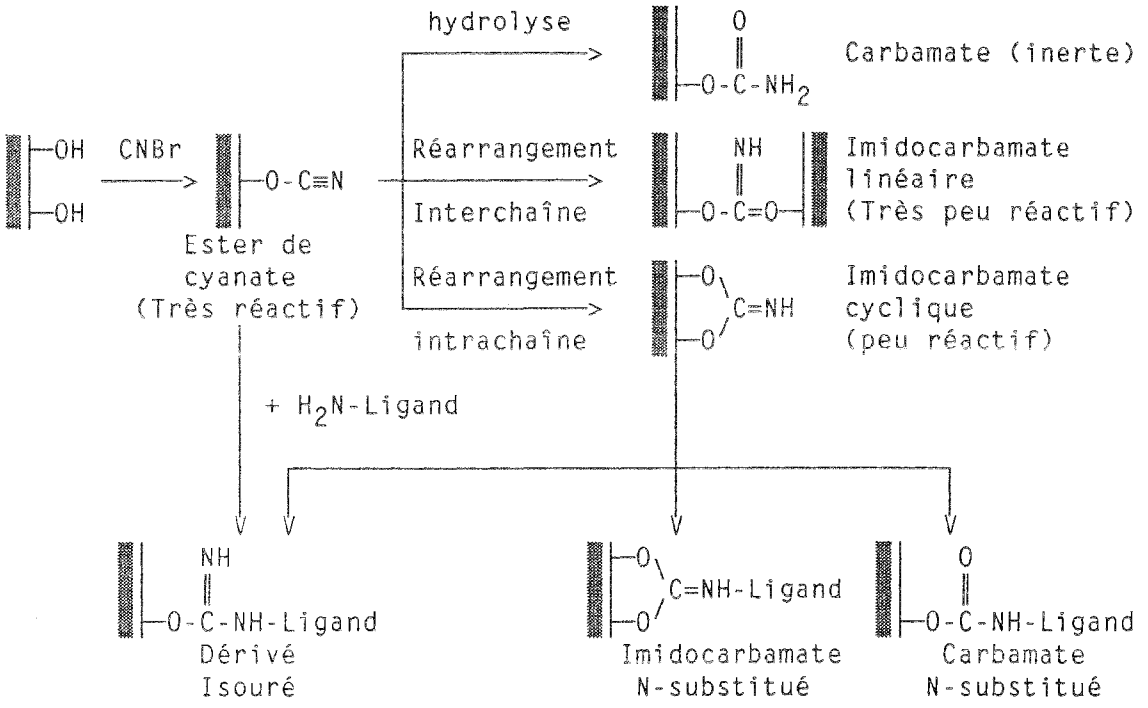


FIGURE 7: MECANISME DE COUPLAGE DES PROTEINES SUR SEPHAROSE CL-4B PAR LE BROMURE DE CYANOGENE. L'activation des gels d'agarose par le bromure de cyanogène conduit à la formation d'un composé principal, l'ester de cyanate, et de dérivés secondaires, dont l'imidocarbamate, capable de former des liaisons stables avec les amines primaires des protéines (D'après KOHN et WILCHEK 1981).

Réactifs utilisés dans les méthodes d'activation	Nature du ligand devant être immobilisé					
	Amine	Hydroxyl	Thiol	Protéine	Polysac charide	Acide Nucleique
Glutaraldéhyde	X			X		
Bromure de cyanogène	X			X		X
Hydrazine	X			X		
Bisépoxirane	X	X	X	X	X	
Divinylsulfone	X		X	X	X	
Epichlorhydrine	X	X	X	X	X	
Benzoquinone	X			X	X	
Périodate	X			X		X
Trichloro-s-triazine	X	X		X	X	
Diazonium				X		X
Carbonyl diimidazole	X			X		
Tosylates	X		X	X		

TABLEAU I: RECAPITULATIF DES METHODES DE COUPLAGE DE LIGAND SUR SUPPORT SOLIDE. Suivant le type de ligand à immobiliser, différentes méthodes d'activation peuvent être utilisées. Les principaux critères de sélection sont basés sur le rendement de couplage, la stabilité de la liaison, et la capacité d'adsorption du ligand après couplage.

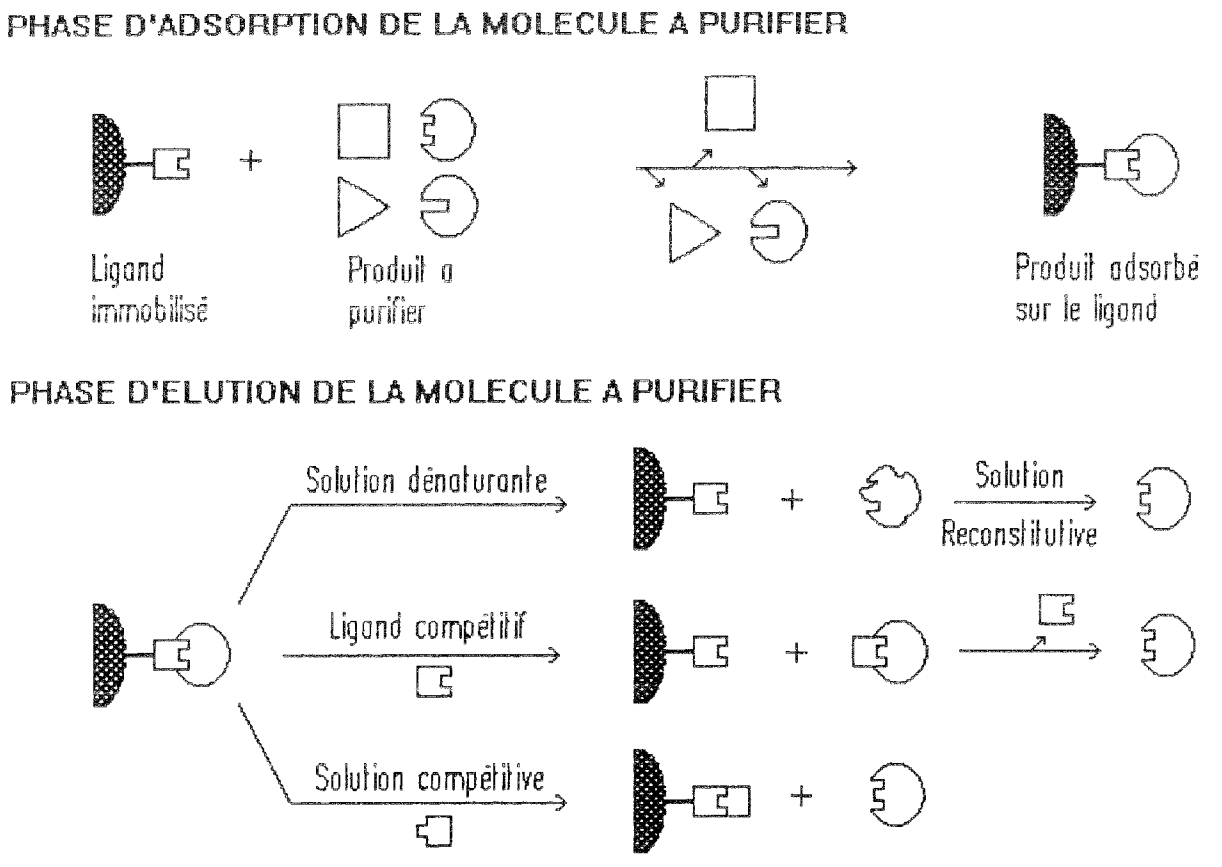


FIGURE 8: PRINCIPE DE LA CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE. Une fois sélectionné, le ligand est fixé par liaison covalente sur une matrice poreuse et chimiquement inerte. Le mélange contenant l'affinant à purifier est mis au contact de la matrice. L'affinant est ensuite élué par dissociation du complexe ligand-affinant.

Cependant, la technique possède ses propres limites. En effet, il n'est pas toujours facile de trouver dans la nature le ligand idéal possédant une grande capacité de fixation tout en étant obtenu en quantité suffisante pour être exploitable.

Aussi, le développement de l'immunoaffinité, basée sur la reconnaissance antigène-anticorps, a permis de réduire considérablement cet handicap, et l'arrivée des anticorps monoclonaux a même permis de multiplier à l'infini l'obtention des couples antigènes-anticorps. Cependant, de par sa haute spécificité et de par sa mise au point relativement longue, cette technique est réservée à la purification de produits à haute valeur ajoutée.

I.3.4.c L'immunoaffinité

L'immunoaffinité est une technique dérivée de la chromatographie d'affinité basée uniquement sur la reconnaissance Antigène-Anticorps.

Sachant que l'injection dans un organisme supérieur de toute substance étrangère d'un poids moléculaire supérieur ou égal à 5000 daltons est capable d'induire une réponse immunitaire c'est-à-dire une production d'anticorps dirigés contre cette substance, il suffira de prélever une partie du plasma de l'animal immunisé pour récupérer les anticorps polyclonaux spécifiques de la substance en question. Une fois purifiés, ces anticorps pourront être fixés sur un support chromatographique et permettre ainsi la purification de la substance recherchée.

Les anticorps monoclonaux sont des anticorps monospécifiques obtenus en grande quantité et ce, grâce à des techniques d'hybridation mises au point en 1975 par G. KOHLER et C. MILSTEIN (85), entre des cellules normales lymphocytaires de mammifères et des cellules myélomateuses de tumeur maligne. La fusion de ces deux lignées cellulaires conduit alors à l'obtention d'une nouvelle lignée cellulaire appelée hybridome possédant les caractéristiques d'immortalité cellulaire des myélomes et productrice d'un seul type d'anticorps des lymphocytes. Ces clones lymphocytaires ainsi obtenus synthétisent et secrètent alors des anticorps monoclonaux dirigés contre un épitope particulier, c'est-à-dire contre l'un des nombreux déterminants antigéniques de la substance étrangère qui leur a donné naissance.

On peut donc moduler à l'infini l'obtention de ces clones lymphocytaires et sélectionner le clone qui synthétisera au mieux l'anticorps et qui possèdera le degré d'affinité souhaité.

I.4 INDUSTRIALISATION DES PROCEDES

I.4.1 Historique

Grâce au développement rapide qu'ont connu ces 20 dernières années les techniques de production, de purification et d'analyse des protéines, ces

dernières sont de plus en plus amenées à être utilisées comme agent thérapeutique de par la fonction biologique qu'elles occupent au sein du corps et des cellules.

En effet, celles-ci possèdent des caractéristiques fonctionnelles spécifiques qu'il est souvent impossible de retrouver dans des molécules chimiques simples. Aussi, si l'on veut soigner de manière physiologique une maladie due à une déficience de l'une de ces protéines, le meilleur remède ne pourra être obtenu qu'avec l'apport même de cette protéine.

Parmi les premières méthodes de production qui furent mises au point au niveau industriel, nous pouvons citer l'albumine dans le traitement des insuffisances circulatoires, obtenue par le fractionnement du plasma par COHN dès 1941 (27). Nous pouvons aussi citer parmi les premières protéines obtenues par génie génétique, l'insuline dans le traitement du diabète (79) (150), et l'hormone de croissance dans le traitement du nanisme (54). Ces protéines ont été obtenues à partir de cellules bactériennes, en l'occurrence *E. Coli*, dans lesquelles ont été introduits, par des techniques de génie génétique, les gènes responsables de la synthèse du produit désiré (26) (163). Une fois produite, la protéine secrétée est alors séparée des protéines bactériennes par les techniques classiques de purification adaptées à la protéine recherchée. Nous pouvons citer enfin, parmi les premières protéines obtenues à partir de cellules de mammifères, le facteur VIII dans le traitement de l'hémophilie A (158).

I.4.2 Principe

Il n'y a pas de règle stricte en matière de transfert technologique de la recherche vers l'industrie. Le choix des procédés pour réaliser ce transfert est fortement influencé par les conditions économiques du moment. Chaque installation est un cas particulier et il faudra, en fonction des infrastructures préexistantes choisir entre une production en continu et une production en discontinu, et ce afin de rentabiliser au maximum les investissements initiaux. L'idéal est bien sûr une entière automatisation des procédés mis en oeuvre pour la fabrication de ce type de produit. En effet, l'automatisation permet une entière sécurité vis à vis du produit fini. Cependant, les techniques évoluant rapidement dans ce secteur en pleine mutation, il est

très difficile de miser sur l'achat d'un système de fabrication clé en main qui risquerait de devenir rapidement hermétique à toute évolution. Aussi, il est préférable dans un premier temps de miser sur une production en semi continu, pouvant être rapidement recyclée en cas de transformation radicale des procédures de fabrication. Le système devrait donc être modulaire et devrait permettre dans la mesure du possible une valorisation des sous produits de fabrication (figure 9).

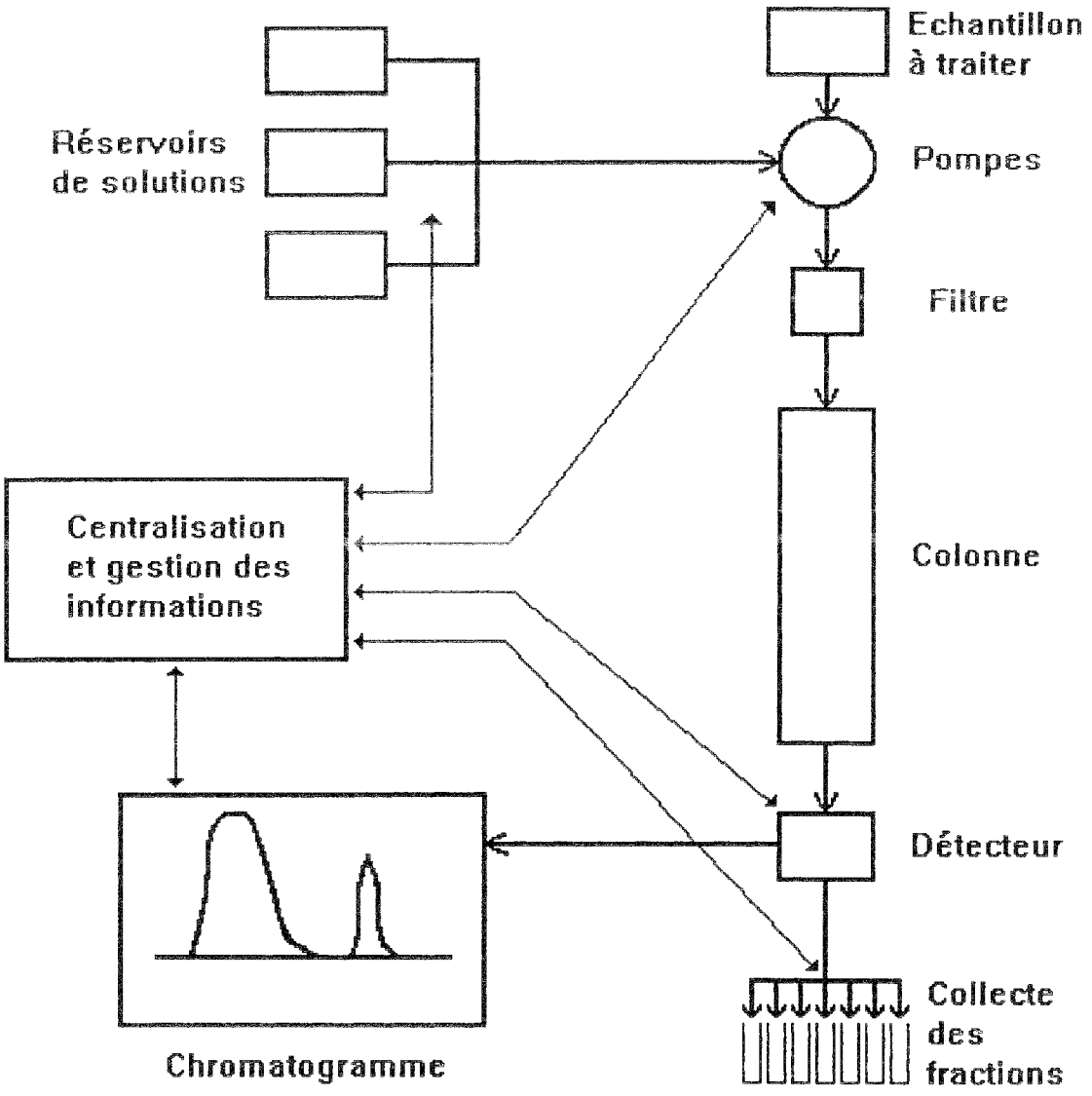


FIGURE 9: EXEMPLE D'AUTOMATISATION D'UNE PROCEDURE CHROMATOGRAPHIQUE A L'ECHELLE INDUSTRIELLE. L'automatisation des différentes étapes lors de la préparation d'un composé biologique à une échelle industrielle nécessite une simplification des procédures et permet une meilleur sécurité du produit fini.

L'utilisation en thérapeutique des produits biologiques préparés industriellement présente toutefois des limitations car, lors de leur utilisation par injection par voie intraveineuse, intramusculaire ou sous-cutanée, ceux-ci ne sont pas entièrement purs et ils ne sont pas toujours identiques à ceux naturellement présents dans l'organisme déficient. De ce fait, ces protéines peuvent induire la formation d'anticorps si elles sont reconnues comme étrangères par le système immunitaire et, après injections répétées de celles-ci, il peut y avoir neutralisation de leur activité thérapeutique ou provocation d'une réaction allergique.

De plus, une éventuelle contamination virale du composé n'est pas à exclure et une étude attentive devra être entreprise afin de neutraliser cette contamination, soit en réduisant le risque encouru par des méthodes préventives, soit en éliminant physiquement l'agent reconnu par des méthodes destructives.

Enfin, la stérilisation des supports chromatographiques est un problème délicat qui doit être étudié pour chaque installation (51). Des contrôles stricts doivent être réalisés à chacune des étapes de fabrication selon les normes établies par la Pharmacopée française.

De nos jours, la mise au point d'une méthode de production industrielle d'une protéine d'intérêt thérapeutique n'est pas une fin en soi. Des efforts doivent être entrepris et soutenus afin d'améliorer les procédés de fabrication et de purification pour obtenir une protéine dont les risques encourus précités soient réduits à leur strict minimum.

Aussi, l'optimisation des conditions d'obtention du produit doit se faire par simplification des procédures, amélioration des rendements, amélioration de la pureté, tout en tenant compte de sa qualité ainsi que des exigences économiques du moment.

I.5 INNOCUITE VIRALE DES PRODUITS BIOLOGIQUES

I.5.1 Historique

Le souci de l'innocuité virale des produits biologiques remonte à l'origine de l'utilisation des premiers vaccins viraux obtenus par

pasteurisation. Ces vaccins entraînaient dans certains cas des accidents dûs à l'inactivation incomplète des virus utilisés comme antigènes pour leur préparation (rage, poliomyélite).

Ce problème majeur a été réactualisé dans les années 70 avec l'utilisation massive des dérivés sanguins à usage thérapeutique pouvant être contaminés par les virus des hépatites B puis non A non B puis, dans les années 80, avec l'apparition des rétrovirus de type HIV (Human Immunodeficience Virus) responsable du SIDA (Syndrome Immuno Déficitaire Acquis) (21).

Dans le souci de minimiser le risque potentiel de la contamination virale pour chaque produit biologique utilisé, une réglementation a été entreprise afin d'identifier, d'évaluer puis de réduire les facteurs de risque (matière première, réactifs,...) et enfin, de mettre en oeuvre des méthodes d'inactivation et d'élimination des virus tout en contrôlant le produit à ses différents stades de fabrication.

I.5.2 Méthodes d'inactivation des virus

-Pasteurisation

La méthode d'inactivation des virus la plus utilisée est celle de la pasteurisation qui consiste à chauffer les produits en solution 10 heures à 60°C. Ce chauffage peut être également utilisé sur des produits lyophilisés selon des modalités variables (60 à 68°C pendant 24 à 96 heures) (48). Cependant, son usage est limité car dénaturant pour de nombreuses protéines labiles. Si l'addition d'agents protecteurs comme la glycine ou le saccharose permet de réduire la dénaturation de ces protéines, elle réduit également l'efficacité anti-virale du procédé (21).

-Traitements chimiques

Des traitements chimiques à base d'alcool, de formol ou encore de ß propiolactone ont également été utilisés, seuls ou en association avec des radiations U.V. (21) (118) (136). Des colorants photoréactifs comme le bleu de méthylène ont également été utilisés avec succès sur le plasma (87).

-Méthodes solvant/détergent

D'autres méthodes d'inactivation des virus ont été mises au point à partir d'un mélange solvant/détergent (70) (110), dont l'intérêt principal est de préserver la stabilité de certaines protéines reconnues fragiles comme le facteur VIII.

Limitation de ces techniques

De par leur mode d'action spécifique, ces techniques, utilisées séparément, ne peuvent prétendre neutraliser toute la gamme de virus potentiellement présents. De plus, leur action est plus ou moins dénaturante. De ce fait, leur action est limitée et leur efficacité dépendra fortement du type de produit à inactiver.

I.5.3 Validation des procédés

Pour chaque mise au point d'un procédé d'inactivation des virus, l'évaluation du risque de contamination doit être entreprise en tenant compte de l'origine du produit, de sa nature, de son mode de prélèvement et des procédés de fabrication utilisés.

Aussi, des études devront être entreprises sur l'identification des virus potentiellement présents, sur la réduction de la charge de ces virus au départ ainsi que sur leur charge résiduelle après inactivation.

Ces études pourront être réalisées à partir de virus identifiés ou bien à partir de modèles viraux sélectionnés, représentatifs de la diversité des virus pathogènes.

La réduction de la présence d'un virus particulier, mesurée en logarithme décimal, doit être d'au moins 4 log pour être efficace. Enfin, des tests *in-vivo* chez l'animal devront être réalisés par inoculation du produit traité pour permettre la validation du procédé.

La décision finale sera prise après analyse par des experts virologues en accords avec la législation. Cependant, compte-tenu de la rapidité d'évolution

des connaissances ainsi que des techniques de préparation et de contrôle, ces procédés devront être périodiquement réévalués.

I.5.4 Règlementation européenne

Dans le but d'harmoniser la réglementation en vigueur dans les différents pays européens et en vue d'un marché unique, des textes officiels ont été émis par la Commission des Communautés Européennes, et peuvent être consultés lors de la préparation de nouveaux composés biologiques à usage thérapeutique.

II. PURIFICATION DU FACTEUR VIII

II.A INTRODUCTION

Le facteur VIII humain, ou facteur antihémophilique A, est une glycoprotéine plasmatique circulant dans le sang à l'état de trace. Celui ci joue un rôle central dans la voie intrinsèque de la coagulation sanguine. L'importance clinique du facteur VIII dans la coagulation sanguine est son rôle de maintien de l'hémostase. En effet, une déficience en facteur VIII se traduit chez un individu par des désordres hémorragiques pouvant être fatals en absence de tout traitement visant à corriger le taux de facteur VIII fonctionnel circulant dans l'organisme.

L'hémophilie A correspond à l'expression défectueuse du gène qui code pour le facteur VIII. C'est une maladie récessive liée au sexe, et l'anomalie chromosomique est portée par le chromosome X (155).

La thérapie classique dans le traitement de l'hémophilie A, consiste donc à restaurer le taux de facteur VIII fonctionnel par un apport exogène en concentré de facteur VIII purifié sous forme de préparation injectable par voie intraveineuse (57).

Différents concentrés de facteur VIII humain ont été proposés au fur et à mesure des progrès accomplis dans les techniques de purification des protéines en général, et du facteur VIII en particulier. Sont disponibles à l'heure actuelle, et par ordre d'apparition, le cryoprécipité, obtenu par décongélation à 4 °C du plasma congelé (113), les concentrés dit "de pureté intermédiaire", obtenus par précipitations fractionnées du cryoprécipité (16)(27)(78), les concentrés de très haute pureté, dérivés des précédents et ayant subi une étape de purification par chromatographie d'affinité (47)(97)(146), et enfin le facteur VIII recombinant. ce dernier ayant été obtenu récemment par clonage du gène codant pour le facteur VIII humain (52)(144).

II.A.1. GENERALITES ET NOMENCLATURE

Le facteur VIII plasmatique circule dans le sang sous forme d'un complexe composé de deux chaînes protéiques stabilisées par un ion calcium. Ce complexe est constitué d'une chaîne lourde de masse moléculaire variable (de 90 à 200 kDa) et d'une chaîne légère de masse moléculaire de 80 kDa (4). Le rôle de l'ion central n'est pas encore complètement élucidé mais la chélation du calcium lors d'un prélèvement sanguin sur anticoagulant inhibe l'activité du facteur VIII (102)(122).

In vivo, le facteur VIII circule dans le sang associé au facteur von Willebrand qui est un facteur intervenant dans l'hémostase primaire (71). Cette association au facteur von Willebrand est réalisée par l'intermédiaire de la chaîne légère (42) (61). La stoechiométrie de cette association est d'une molécule de facteur VIII pour une molécule de facteur von Willebrand (90).

Jusque dans le milieu des années 1970, une confusion régnait quant à la terminologie à adopter pour caractériser les propriétés du facteur VIII. En effet, les fractions purifiées de facteur VIII corrigeaient non seulement la déficience de la coagulation des hémophiles de type A mais restauraient également l'agrégation plaquettaire, en présence de ristocétine, des plasmas de patients atteints de la maladie de von Willebrand. Ce n'est que dans la dernière décennie que l'on admit la distinction entre le facteur VIII et le facteur von Willebrand qui sont 2 protéines différentes, associées sous forme d'un complexe dans le plasma (61).

En 1985, le Comité International de Thrombose et Hémostase a donné comme symbole le chiffre romain VIII pour définir le facteur qui permet de corriger la déficience de coagulation des plasmas d'hémophile et VIII Ag pour définir l'antigène correspondant. Quant au facteur von Willebrand, le symbole utilisé est le vWf et pour l'antigène correspondant le vWf Ag (94).

II.A.2. STRUCTURE DU FACTEUR VIII

La structure moléculaire du facteur VIII a été déterminée par plusieurs équipes, à partir de fractions hautement purifiées d'une part (41) et à partir du facteur VIII recombinant d'autre part (149).

L'analyse des fractions purifiées de facteur VIII a révélé une multitude de chaînes polypeptidiques allant de 80 à 200 kDa (figure 10). Le peptide de 80 kDa représente la chaîne légère issue de la région carboxy-terminale de la forme native du facteur VIII et une série de peptides allant de 90 à 200 kDa représente la chaîne lourde issue de la région amino-terminale. Ces deux chaînes sont reliées entre elles par l'intermédiaire d'un ion calcium.

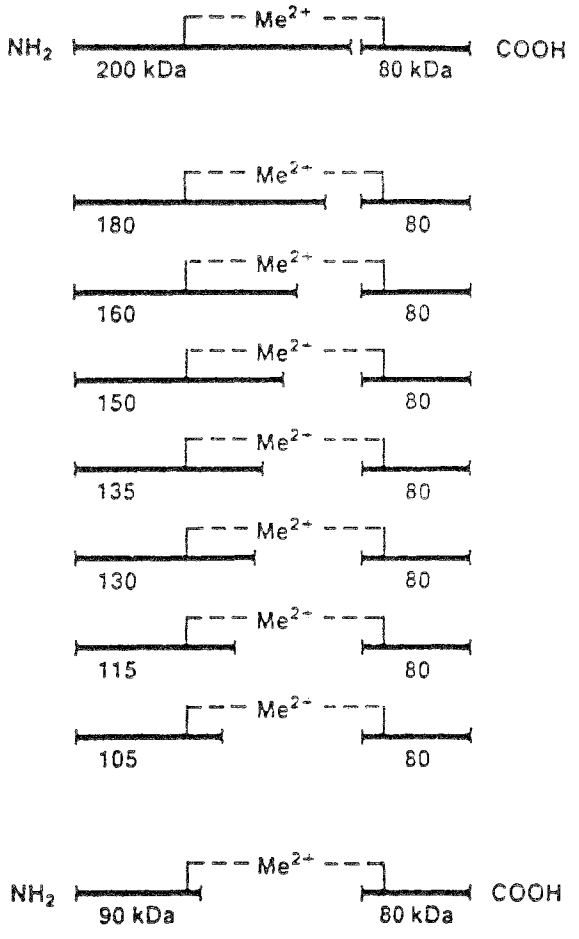


FIGURE 10 : MODELE DE LA FORME ACTIVE DU FACTEUR VIII. L'analyse des fractions purifiées de facteur VIII actif révèle une multitude de chaînes polypeptidiques allant de 80 à 200 kDa. Le peptide de 80 kDa représente la chaîne légère issue de la région carboxy-terminale de la forme native, et la série de 90 à 200 kDa représente la chaîne lourde amino-terminale. Ces deux chaînes sont reliées entre elles par l'intermédiaire d'un cation divalent supposé être du calcium (d'après ANDERSON et Coll. 1986).

L'analyse de la séquence en acides aminés du facteur VIII recombinant

permet de distinguer 3 domaines (figure 11) :

- un domaine A répété 3 fois. 2 fois dans la chaîne lourde et 1 fois dans la chaîne légère (AA 1 - 328 ; 380 - 711 ; 1694 - 2019),
- un domaine B unique, localisé après A1 et A2 dans la chaîne lourde (AA 712 - 1648),
- et enfin, un domaine C répété 2 fois dans la chaîne légère (AA 2020 - 2172 ; 2173 - 2332).

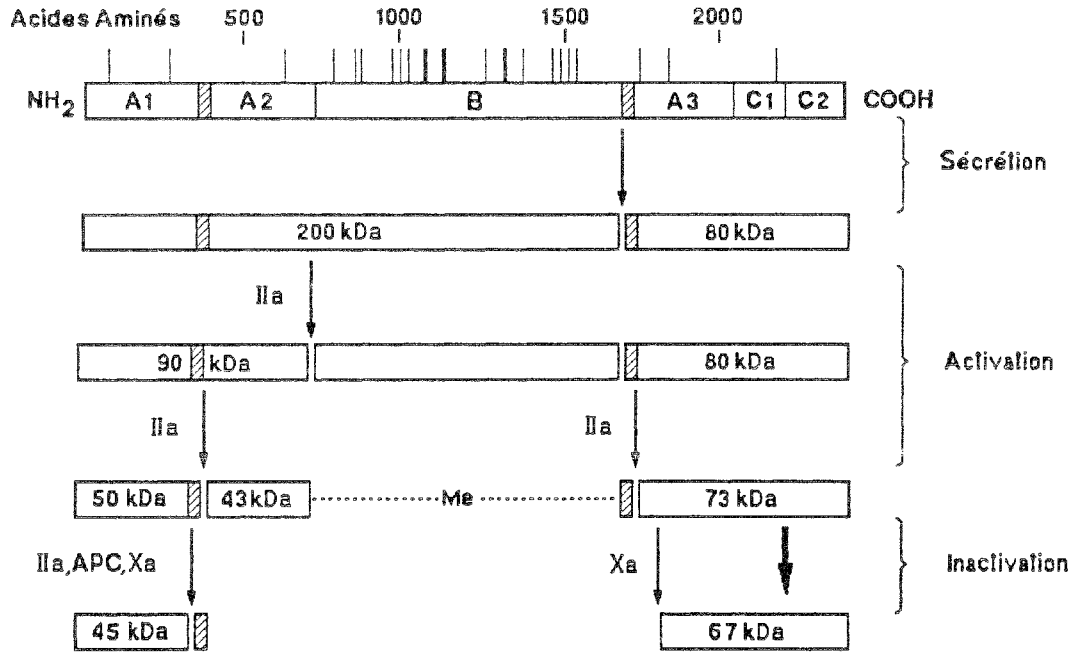


FIGURE 11 : DOMAINES STRUCTURAUX ET ACTIVATION DU FACTEUR VIII. L'analyse de la séquence primaire du facteur VIII recombinant révèle trois domaines principaux, un domaine A de 330 AA répété trois fois, un domaine B de 980 AA, et un domaine C de 150 AA répété deux fois. Les domaines hachurés représentent les régions acides et les traits verticaux représentent les sites de glycosylation sur asparagine. Lors de sa sécrétion, le facteur VIII est clivé en une chaîne de 200 kDa et une chaîne de 80 kDa. Les sites de coupure par la Thrombine, la protéine C activée, et le facteur X sont représentés par des flèches. La principale forme activée du facteur VIII est un trimère relié à un ion métallique divalent. La protéolyse prolongée du facteur VIII conduit à la libération d'un fragment de 45 kDa et d'un fragment de 67 kDa inactifs (d'après PITTMAN et KAUFFMAN 1989).

Une région contenant essentiellement des résidus acides (AA 331 - 372) se situe entre les domaines A1 et A2 et pourrait jouer un rôle important dans l'activité procoagulante du facteur VIII (33).

Enfin, une dernière région contenant également des résidus acides (AA 1649 - 1689) jouerait également un rôle important dans l'activité procoagulante du facteur VIII. De plus, elle contient un site de fixation pour le facteur von Willebrand (43).

Le domaine A présente 30 % d'homologie avec le facteur V et la céruloplasmine qui est une protéine plasmatique liant le cuivre. Les résidus impliquant le site de fixation du cuivre sont conservés dans les domaines A du facteur VIII suggérant le rôle important joué par ce domaine dans la fixation des ions métalliques.

Le domaine B n'a pas d'homologie avec d'autres protéines connues. Parmi les 25 sites potentiels de glycosylation, 19 sont regroupés dans le domaine B. On ne lui connaît pas de rôle fonctionnel si ce n'est dans la protection du facteur VIII contre la protéolyse (33)(34).

Le domaine C présente une homologie avec les lectines qui sont capables de se lier aux glycoconjugués et aux phospholipides chargés négativement (111).

II.A.3. FONCTION DU FACTEUR VIII

II.A.3.1 Voie intrinsèque de la coagulation sanguine

Le facteur VIII, sous forme activée, est une protéine clé dans la voie intrinsèque de la coagulation sanguine (figure 12).

Toute lésion occasionnée au niveau d'un vaisseau sanguin déclenche un processus de réparation destiné au colmatage immédiat de la brèche, le temps de la régénération des tissus lésés.

Ce processus s'effectue en deux étapes : la première étape, qui constitue l'hémostase primaire, met en jeu l'interaction des plaquettes avec la paroi lésée aboutissant d'une part à la formation d'un clou plaquettaire

hémostatique et d'autre part à l'activation de la coagulation sanguine. Cette deuxième étape, encore appelée hémostase secondaire, va renforcer l'action du clou plaquettaire par formation d'un réseau de fibrine emprisonnant les plaquettes agrégées.

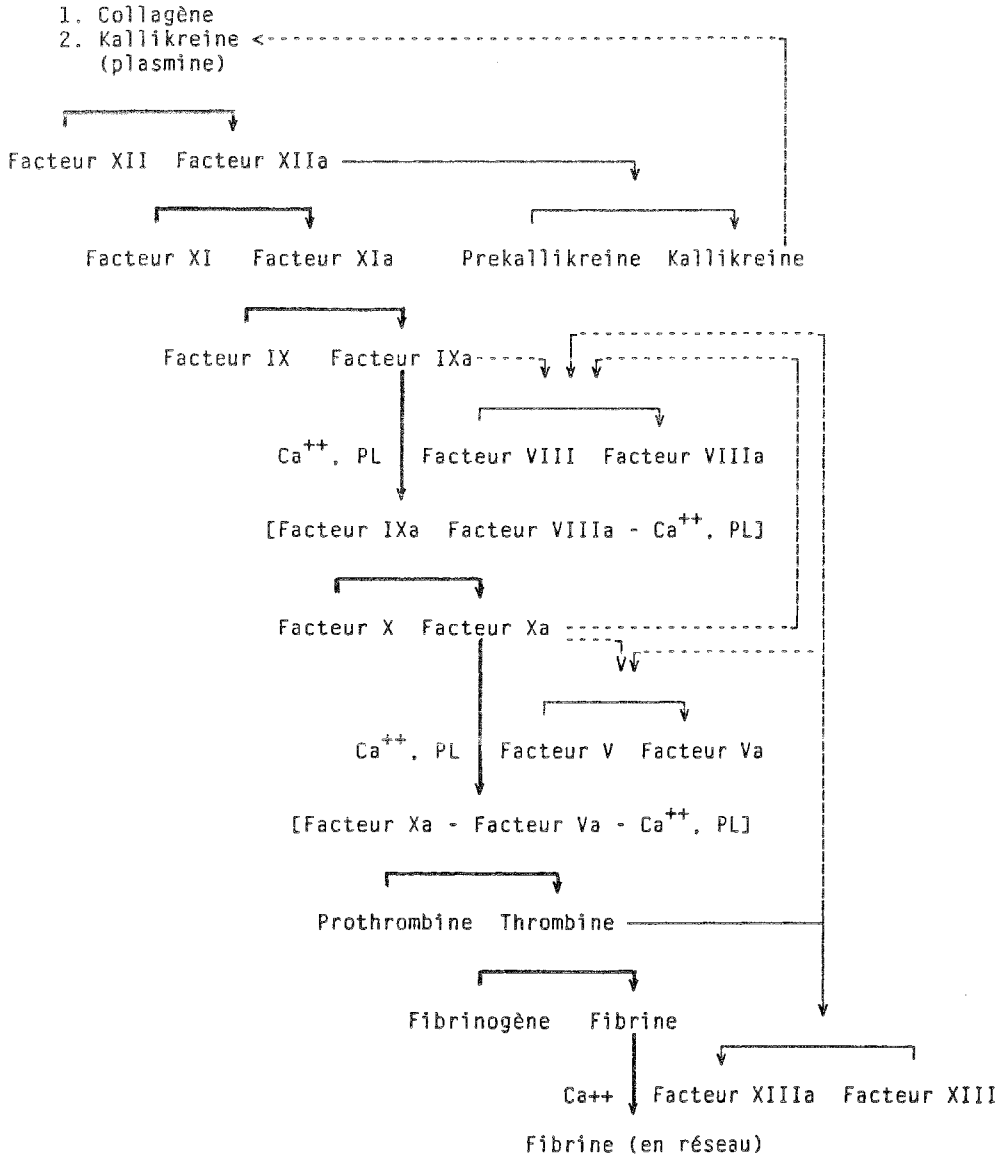


FIGURE 12 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA VOIE INTRINSEQUE DE LA COAGULATION SANGUINE. Lorsqu'une lésion est provoquée au niveau d'une paroi vasculaire, un mécanisme de réparation va s'enclencher par l'adhésion et l'accumulation des plaquettes sanguines et par l'activation d'un ensemble de protéines enzymatiques conduisant à la formation d'un réseau insoluble de fibrine. Ces protéines, connues sous le nom de facteurs de la cascade de la coagulation sanguine, sont représentées par leur chiffre romain suivi d'un petit (a) lorsqu'elles sont activées. PL = Phospholipides (d'après DAVIS et Coll. 1975).

La transformation du fibrinogène en un réseau insoluble de fibrine est réalisée par un processus enzymatique complexe mettant en jeu toute une série de protéines interactives intervenant dans ce que l'on appelle la cascade de la coagulation sanguine.

Ainsi, en présence de facteur VIII activé, de calcium et de phospholipides chargés négativement, le facteur IX activé qui est une protéase à sérine, va activer le facteur X par coupure enzymatique dans sa partie N terminale d'un fragment d'environ 11 kDa (46).

Le facteur X ainsi activé qui est également une protéase à sérine va, en présence du facteur V activé, de calcium et de phospholipides chargés négativement, convertir la prothrombine en sa forme enzymatique active, la thrombine (77).

Les facteurs V et VIII n'ayant pas d'activité enzymatique propre, ils sont considérés comme des cofacteurs respectifs des facteurs X et IX. Bien que leur activité de cofacteur ne soit pas encore bien définie, ils jouent un rôle d'accélération dans l'activité enzymatique des facteurs X et IX associés (73).

II.A.3.2 Activation du facteur VIII

L'activation du facteur VIII est obtenue par protéolyse partielle de sa forme native. En effet, l'étude de la séquence primaire du facteur VIII, réalisée à partir du facteur VIII recombinant, permet de supposer l'existence d'une seule chaîne native de 2332 acides aminés contenant 25 sites potentiels de N glycosylation pour une masse moléculaire supérieure à 300 kDa (149). Ce précurseur est alors, dans un premier temps, protéolysé par la thrombine aussi bien *in vivo* que *in vitro*, ce qui conduit à l'obtention d'un hétérodimère composé d'une chaîne lourde de 200 kDa et d'une chaîne légère de 80 kDa. La chaîne lourde est ensuite partiellement protéolysée en une série de fragments allant de 110 kDa à 200 kDa. L'activation proprement dite est réalisée par protéolyse de ces fragments en un fragment de 90 kDa et protéolyse du fragment de 80 kDa en un fragment de 73 kDa (43) (figure 11).

II.A.3.3 Dégradation protéolytique du facteur VIII

L'activité du facteur VIII dans le plasma est relativement stable mais, une fois le processus de coagulation mis en route ou bien avec l'addition de thrombine dans le milieu, le facteur VIII perd rapidement et complètement son activité (33).

L'inactivation du facteur VIII résulte d'une protéolyse poussée de sa forme active par la thrombine. Cette protéolyse, qui est directement liée à la concentration de la thrombine présente dans le milieu, est réalisée par coupure du fragment de 90 kDa en 2 fragments de 50 kDa et 43 kDa.

Le facteur Xa permet également d'activer puis d'inactiver le facteur VIII mais à un degré moindre. L'activation est réalisée par coupure des fragments de 110 kDa à 200 kDa en un fragment de 90 kDa. Puis ce fragment est inactivé par génération de fragments de 50 kDa, 45 kDa et 43 kDa. Le fragment de 80 kDa est également protéolysé en un fragment de 73 kDa actif puis 67 kDa inactif.

Enfin, la protéine C activée, qui est une protéine Vitamine K dépendante, permet également l'inactivation de la forme active du facteur VIII. Cette inactivation résulte de la protéolyse des fragments de 90 kDa à 200 kDa et génération d'un fragment de 45 kDa.

II.A.4. DEFICIENCE DU FACTEUR VIII ET HEMOPHILIE

II.A.4.1 Déficience génétique

L'hémophilie est la conséquence d'une déficience soit en facteur VIII, ce qui se définit par une hémophilie de type A, soit en facteur IX, ce qui se définit par une hémophilie de type B.

La fréquence de l'hémophilie est de 1 pour 10 000 habitants avec une hémophilie de type A, quatre fois plus fréquente que l'hémophilie de type B.

Sur le plan clinique, rien ne distingue ces 2 types d'hémophilies qui se

traduisent toutes les deux par des hémarthroses à répétition.

L'hémophilie A est une maladie récessive liée au sexe, touchant exclusivement la population mâle. Elle est portée par le chromosome X et provient soit d'une mutation spontanée, soit d'une transmission de la maladie par des conductrices asymptomatiques (figure 13).

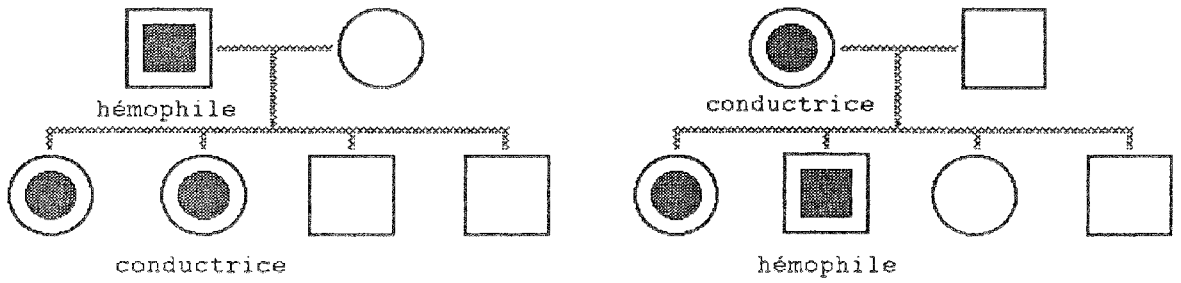


FIGURE 13 : TRANSMISSION DE L'HEMOPHILIE. L'hémophilie est une maladie récessive portée par le chromosome X. Elle touche exclusivement les populations mâles alors qu'elle est seulement transmise par des femmes asymptomatiques.

D'un point de vue phénotypique, la déficience en facteur VIII est très variable. Les taux de facteur VIII fonctionnels peuvent varier d'un individu à l'autre, de moins de 1 % à 60 %. Certains patients sont même capables d'exprimer des quantités réduites de facteur VIII sans aucune activité biologique (155).

Une étude sur plus de 500 patients atteints d'hémophilie de type A a été réalisée par la technique de l'ADN recombinant afin de répertorier les mutations responsables de la déficience en facteur VIII.

Sur 26 de ces patients, la déficience résulte d'une mutation ponctuelle entraînant la production d'un facteur VIII tronqué inactif.

Sur 20 autres patients, la déficience résulte d'une délétion génomique de plusieurs nucléotides entraînant une hémophilie sévère sans aucune activité détectable. Enfin, les autres patients étudiés présentent des mutations qui n'ont pas pu être caractérisées avec les sondes disponibles mais qui peuvent se résumer à des mutations ponctuelles, à des petites délétions voire à des déficiences du système de régulation.

Il est à noter que les délétions et mutations ponctuelles identifiées ne représentent qu'un faible pourcentage parmi les patients étudiés. Ceci indique que l'hémophilie n'est pas due à une mutation génétique particulière mais repose sur un ensemble de sites mutationnels possibles présents dans la molécule de facteur VIII.

II.A.4.2 Dépistage génétique

L'hémophilie A étant une maladie récessive liée au sexe et portée par le chromosome X, elle est donc exprimée chez les hommes qui héritent du chromosome paternel Y et du chromosome maternel X portant le gène défectueux. Chez les femmes, l'hémophilie A est seulement transmise par les femmes qui héritent d'un chromosome X parental normal et d'un chromosome X parental portant le gène défectueux.

La méthode standard pour détecter l'hémophilie est basée sur le dosage de l'activité procoagulante du facteur VIII.

Pour détecter les femmes conductrices de l'hémophilie, c'est-à-dire porteuses du gène défectueux mais n'exprimant pas la maladie, il existe 2 approches générales (58)(155) (figure 14).

La première est utilisée lorsque la mutation est déjà connue et répertoriée d'après les antécédents familiaux. Elle consiste à réaliser un marquage par hybridation de l'ADN *in situ* à l'aide d'une sonde radioactive codant pour un fragment d'ADN spécifique d'une délétion dans le cas du gène muté. La deuxième approche consiste à étudier, à l'aide de sondes d'ADN radiomarquées, le polymorphisme des fragments obtenus après coupures par les enzymes de restriction. Dans ce cas, il n'est pas nécessaire de connaître les antécédents familiaux.

Les sondes génétiques utilisées dans le dépistage des mères porteuses et dans le diagnostic prénatal sont apparues à partir de 1984, dès que le clonage de l'ADN recombinant fut possible (53). Bien que l'utilisation de ces sondes soit limitée, de par la variété des mutations, elles restent valables pour un bon nombre de patients.

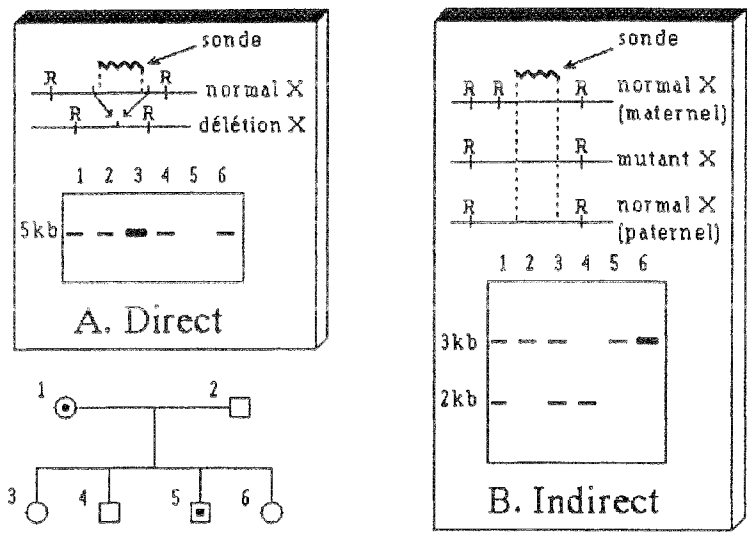


FIGURE 14 : DETECTION DE L'HEMOPHILIE PAR SONDES D'ADN RADIOMARQUEES. Dans le cas de l'étude hypothétique d'une délétion génomique de 2 Kb, deux approches sont possibles: Détection directe si la délétion est répertoriée dans les antécédents familiaux (panneau A). Détection indirecte par l'étude du polymorphisme des sites de restriction si l'anomalie n'est pas répertoriée (panneau B). Homme normal □ , homme hémophile ▣ , femme normale ○ , femme conductrice ⊙ (D'après G.C. WHITE 1989).

II.A.5. TRAITEMENT THERAPEUTIQUE

Dès que l'hémophilie A est diagnostiquée chez un individu, une thérapeutique curative est entreprise afin de corriger le taux de facteur VIII défectueux, par un apport externe en facteur VIII actif, disponible sous forme d'un concentré injectable par voie intraveineuse.

La posologie prescrite dépend de plusieurs facteurs et en premier lieu de la présence ou non chez l'individu d'un anticoagulant circulant anti-facteur VIII.

Dans le cas des hémophilies A majeures sans inhibiteur, le taux de facteur VIII à restaurer pour obtenir une action hémostatique est d'environ 15 à 20 % en cas d'hémorragie mineure, 20 à 40 % en cas d'hémorragie sévère et 60 à 100 % en cas d'hémorragie grave ou en cas d'intervention chirurgicale.

Pour un individu, l'apport d'une unité de facteur VIII/kg augmente le taux plasmatique de facteur VIII de 2 %. De plus, la demie vie du facteur VIII étant de 8 à 12 h, les injections sont à renouveler 3 fois par 24 heures.

En pratique, les doses de facteur VIII injectées sont doublées par rapport au taux préconisé afin qu'au bout de 8 heures, lors de l'injection suivante, le taux de facteur VIII qui aura diminué de moitié reste dans les limites du taux souhaité.

Ces traitements qui sont entrepris dès l'apparition d'un accident hémorragique ou en prévision d'une intervention chirurgicale seront poursuivis quelques jours après l'arrêt des saignements.

Un traitement prophylactique peut également être entrepris. Bien que relativement couteux, il améliore sensiblement les conditions de vie de l'hémophile. Cependant, ce type de traitement a l'inconvénient d'entraîner l'augmentation du risque d'apparition d'un inhibiteur.

En présence d'un inhibiteur, les posologies prescrites sont différentes. Ces inhibiteurs, qui sont en général des immunoglobulines de type IgG4, apparaissent chez 10 à 15 % des hémophiles de type A sévère et plus exceptionnellement dans la forme mineure. Ces anticorps qui apparaissent avec l'injection répétée de fractions purifiées de facteur VIII entraînent des complications graves de l'hémophilie, rendant le patient réfractaire au traitement transfusionnel. Cette alloimmunisation au facteur VIII n'est pas identique pour tous les patients. Elle est fonction des prédispositions personnelles de chacun (3).

En présence d'un taux faible d'inhibiteur, c'est-à-dire inférieur à 5 unités Béthesda (1 UB inhibant 0,5 UI de facteur VIII après incubation 4 heures à 37°C), l'inhibiteur peut être saturé par l'administration de doses supérieures en facteur VIII. Dans le cas où le taux d'inhibiteur est supérieur, il est possible d'utiliser un concentré de facteur IX en association ou non avec une saturation de l'inhibiteur par des doses élevées de facteur VIII et d'avoir recours à des échanges plasmatiques pour diminuer d'environ 50 % le taux d'inhibiteur (57).

II.A.6. BESOINS ET PRODUCTION

30 000 à 250 000 UI de facteur VIII sont nécessaires pour le traitement annuel d'un patient atteint d'hémophilie A dans sa forme sévère. La consommation française suit une courbe parallèle à la consommation mondiale.

Parmi les fractions thérapeutiques existantes, le plasma a été longtemps la seule source de facteur VIII disponible et ce jusque dans les années 60 où les premiers concentrés de facteur VIII firent leur apparition.

II.A.6.1 Le plasma

Le plasma était obtenu à partir du sang total, prélevé chez un donneur sain. Après séparation par centrifugation des cellules sanguines et des plaquettes, ce plasma était congelé (PFC) voire lyophilisé. Il contenait approximativement 1 unité de facteur VIII par ml avec une activité spécifique de 0,017 U/mg de protéines.

Cependant, du fait de la faible teneur en facteur VIII contenu dans le plasma humain (environ 100 ng/ml), le taux maximum de facteur VIII restaurable chez un hémophile n'est que de 20 % si l'on prend en compte le risque de surcharge volémique. Aussi, il fut nécessaire de développer des techniques visant à purifier le facteur VIII humain à partir de ce plasma.

II.A.6.2 Le cryoprécipité

C'est en 1964 que J. POOL mit en application la cryoprécipitation du plasma frais congelé (PFC) (113). Cette technique permet une concentration simple et rapide du facteur VIII avec un rendement d'étape de près de 60 %. Le facteur VIII se retrouve alors dans un cryoprécipité obtenu par décongélation rapide du plasma à une température inférieure à 4°C. Après séparation du reste du plasma (PDC) par centrifugation, le cryoprécipité est stocké, congelé à - 30 °C, voire lyophilisé. Ce produit, après décongélation à 37°C, permet de récupérer un facteur VIII concentré 10 à 20 fois par rapport au plasma de départ avec une activité spécifique comprise entre 0,1 et 0,3

U/mg. Ainsi, une poche de plasma frais congelé (200 à 250 ml) permet d'obtenir 80 à 120 UI de facteur VIII après remise en solution dans 10 à 20 ml de soluté.

Suivant le mode de préparation, 3 formes de cryoprécipité sont disponibles : le cryoprécipité unitaire congelé préparé à partir d'une poche de plasma provenant d'un seul donneur prélevé régulièrement, le cryoprécipité lyophilisé préparé à partir d'un pool de plusieurs centaines de poches de plasma qui fut remplacé en France depuis le 1er octobre 1985 par le cryoprécipité lyophilisé à partir d'un pool de 10 donneurs maximum, la raison principale de ce changement étant due au problème causé par le risque non maîtrisé de contamination virale (VHB, VIH) pouvant survenir lors de la manipulation des nombreuses poches de plasma (57).

Avec l'arrivée en 1985 de techniques d'inactivation des virus par solvant/détergent qui ne pouvaient pas être appliquées aux cryoprécipités du fait de leur forte teneur en protéines, ceux-ci tendent à disparaître au profit de nouveaux concentrés purifiés de facteur VIII pouvant permettre l'insertion d'une étape d'inactivation des virus au cours de leur processus de fabrication.

II.A.6.3 Les concentrés de pureté intermédiaire

Sur la base du cryoprécipité, différents concentrés de facteur VIII de pureté intermédiaire sont apparus faisant intervenir plusieurs précipitations successives plus ou moins sélectives avec toujours, pour souci principal, l'amélioration de la pureté du facteur VIII mais au détriment du rendement.

La technique principale utilisée dérive de celle de JOHNSON et Coll. (78). Elle consiste à réaliser une adsorption sur gel d'alumine des facteurs prothrombiniques, suivie d'une précipitation à 10 °C pour éliminer une partie du fibrinogène et de la fibronectine.

D'autres techniques de précipitation ont été utilisées. Citons la précipitation à l'éthanol (27), au polyéthylène glycol (107), à la glycine (16).

Les concentrés de facteur VIII ainsi obtenus sont caractérisés par un

taux d'environ 20 à 30 Unités de facteur VIII par ml pour un rendement final d'environ 15 à 20 %. Ils possèdent une activité spécifique comprise entre 0,5 et 1 U/mg pour les composés dits de "pureté intermédiaire" et entre 1 et 5 pour les composés dits de "haute pureté". Ils sont présentés sous forme lyophilisée et ils ont tous subi une étape d'inactivation des virus soit par chauffage (129) soit par solvant/détergent (70).

II.A.6.4 Les concentrés de très haute pureté

Les concentrés de dernière génération possèdent des taux de facteur VIII identiques aux précédents qui sont compris entre 20 et 40 U/ml mais ils possèdent une activité spécifique bien supérieure, comprise entre 20 et 200 U/mg. Ils sont également préparés à partir du cryoprécipité mais ils subissent en plus une étape chromatographique permettant de récupérer un facteur VIII dépourvu d'une plus grande quantité de ses protéines contaminantes. Parmi ces composés, citons ceux obtenus par chromatographie sur polyélectrolytes (Hyate C) (101), chromatographie sur anticorps poly ou monoclonaux dirigés soit contre le facteur VIII (146) soit contre le facteur von Willebrand avec coélution du complexe VIII/vWf (97)(130) ou élution du facteur VIII seul (47).

Malgré leur coût élevé découlant des faibles rendements obtenus (5 à 10 %), l'intérêt de ces concentrés réside dans la pureté des préparations obtenues. En effet, dans le traitement des formes sévères de l'hémophilie qui nécessite des doses importantes et répétées de facteur VIII, ces composés sont mieux tolérés que les précédents du fait de leur faible teneur en protéines allogéniques.

II.A.6.5 Le facteur VIII recombinant

C'est avec, d'une part l'identification et le clonage de l'ADN complémentaire du facteur VIII humain, réalisés en 1984 par 2 équipes américaines (52)(144) et avec, d'autre part l'expression d'un facteur VIII recombinant actif (34)(158) que la préparation à grande échelle du facteur VIII recombinant a pu être entreprise en vue de son utilisation clinique (5)(83).

Les premiers essais cliniques, réalisés sur des patients en 1989 avec un facteur VIII recombinant provenant des laboratoires Baxter Hyland, ont prouvé l'efficacité de ce type de produit (154). Depuis, des essais ont été réalisés sur plus de 130 patients et deux seulement ont développés un inhibiteur. L'avantage de ce type de produit par rapport aux précédents réside dans son innocuité virale vis-à-vis des virus d'origine humaine. Cependant, l'utilisation clinique du facteur VIII recombinant restera encore limitée dans les années à venir du fait de son coût relativement prohibitif.

II.A.7. OBJECTIF DE NOTRE TRAVAIL

Dans le cadre d'un accord entre les centres de transfusion sanguine de Lyon, de Montpellier et de Nancy, et en collaboration avec l'Unité INSERM 284, un travail coopératif a été entrepris afin de mettre au point une méthode de production d'un concentré de très haute pureté de facteur VIII par chromatographie d'échange d'ions.

En effet, avec le développement des techniques d'immunopurification par anticorps monoclonaux pour la séparation des protéines, de nombreux concentrés de facteur VIII humain de très haute pureté ont été proposés (47) (69) (97) (146), remettant en cause les techniques classiques d'obtention de facteur VIII de pureté intermédiaire. Il ne faut pas pour autant délaisser ces dernières, car elles sont améliorables sans pour autant augmenter le coût de production de façon sensible.

Ainsi l'insertion d'une étape de chromatographie sur échangeur d'ions dans la technique de production de facteur VIII dit de pureté intermédiaire permet d'obtenir un concentré de facteur VIII de très haute pureté (20).

L'adsorption du facteur VIII sur échangeur d'ions n'est pas une idée nouvelle puisqu'elle a été décrite dès 1963 par MICHAEL et TUNNAH (99)(100), puis elle a été appliquée par la suite à des fins aussi bien préparatives (101)(126)(141), qu'analytiques (4)(9)(41). Cependant, la commercialisation récente du Q Sepharose en France par la société Pharmacia a amené plusieurs centres de transfusion sanguine, produisant des concentrés de facteur VIII, à tester ce nouvel échangeur d'anions fort.

Ce procédé, associé à une élution spécifique au chlorure de calcium comme celle utilisée dans la technique d'immunopurification mise au point par FULCHER et ZIMMERMAN (47), permet de récupérer un facteur VIII dépourvu d'une grande partie de ses protéines contaminantes dont la fibronectine, le fibrinogène et le facteur von Willebrand.

Une variante de la préparation du facteur VIII à partir du cryoprécipité a été également testée sur le Q Sepharose faisant intervenir une précipitation à la glycine suivie d'une précipitation au chlorure de sodium. Cette variante, basée sur une technique décrite par THORELL et BLOMBÄCK (143), permet d'améliorer le procédé en éliminant une plus grande quantité de fibrinogène avant l'étape chromatographique, ce qui entraîne une augmentation de la pureté du produit final.

II.B MATERIELS ET METHODES

II.B.1. TECHNIQUES PREPARATIVES

II.B.1.1 Matières premières et réactifs

La source de facteur VIII utilisée dans ce travail est le cryoprécipité obtenu industriellement suivant la méthode décrite par POOL et SHANNON (113), à savoir une décongélation contrôlée à +4°C de plasma frais congelé suivie d'une centrifugation en continu sur centrifugeuse Sharples Pennwalt (Rueil, France). Par ailleurs, tous les produits chimiques cités dans ce travail sont de qualité analytique.

II.B.1.2 Prétraitement du cryoprécipité

Deux protocoles de prétraitement du cryoprécipité ont été appliqués en vue de la purification du facteur VIII sur Q Sepharose (figure 15).

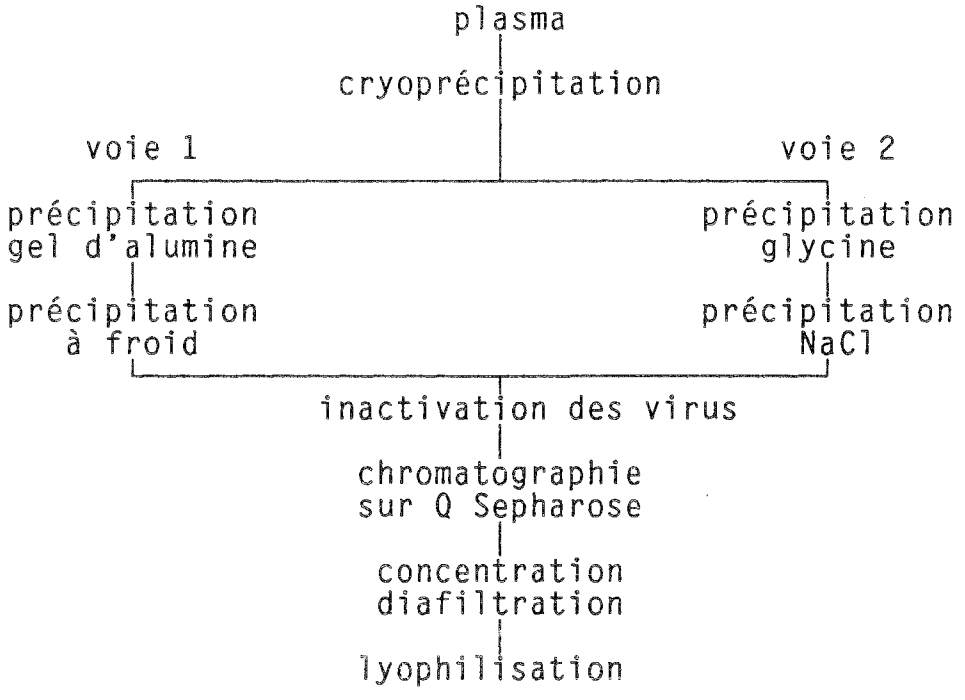


FIGURE 15 : PROTOCOLES DE PRETRAITEMENT DU CRYOPRECIPITE EN VUE DE LA PURIFICATION DU FACTEUR VIII SUR Q SEPHAROSE.

II.B.1.2.a Prétraitement classique

L'optimisation de la chromatographie sur Q Sepharose a été réalisée sur une solution de facteur VIII préparée industriellement à partir de cryoprécipité suivant la technique de préparation appliquée actuellement au Centre Régional de Transfusion Sanguine de NANCY et dérivée de celle de JOHNSON et Coll. (78). Le cryoprécipité est repris dans 3,5 l d'eau PPI (eau pour préparation injectable) par kg de cryoprécipité, en présence d'héparine à 3 U/ml pendant une heure à 37°C. La solution de redissolution subit alors une première précipitation au gel d'alumine (Alhydrogel 3%) à raison de 50% du poids du cryoprécipité pour éliminer par centrifugation 10 min à 3000 g, les facteurs prothrombiniques puis elle subit une deuxième précipitation à froid à 10 °C pour éliminer le fibrinogène précipitant. Elle subit ensuite une inactivation des virus par solvant/détergent selon l'un des procédés brevetés par le New York Blood Center (37)(70)(117).

II.B.1.2.b Prétraitement glycine/NaCl

Une autre voie de prétraitement du cryoprécipité dérivée de THORELL et BLOMBACK a été explorée (143). Après redissolution du cryoprécipité en eau héparinée pendant une heure à 37°C, la solution de redissolution subit une première précipitation à la glycine 2 M pendant 30 min à 25°C suivie d'une centrifugation 10 min à 3000 g, pour éliminer le fibrinogène précipitant. Le surnageant subit ensuite une seconde précipitation au chlorure de sodium 1,5 M, 30 min à 25°C, pour précipiter le facteur VIII. La pâte "NaCl", obtenue après centrifugation 10 minutes à 3000 g, est reprise dans de l'eau PPI avant de subir une inactivation des virus par solvant/détergent puis d'être déposée sur la colonne de Q Sepharose.

II.B.1.3 Chromatographie sur échangeur d'ions

II.B.1.3.a Echelle laboratoire

Une première évaluation de la fixation du facteur VIII sur la matrice de Q Sepharose (Pharmacia, Uppsala, Suède) a été réalisée en "batch" en

incubant sous agitation lente pendant 30 min à température du laboratoire, 8 ml d'une solution de redissolution de cryoprécipité prétraité au gel d'alumine et à froid avec 1,5 ml de Q Sepharose prééquilibré en tampon Tris/HCl 20 mM, NaCl 60 mM, glycine 20 mM, pH 7,1, (solution A), et décanté par centrifugation 5 min à 1800 g. L'optimisation a été réalisée en incubant, d'une part, des quantités croissantes de facteur VIII à volume constant (8 ml), et en faisant varier, d'autre part, l'adsorption dans une gamme de pH comprise entre 6,5 et 7,5. Le surnageant a été recueilli et le facteur VIII a été dosé après centrifugation 5 min à 1800 g.

Dans un second temps, la capacité d'adsorption du Q Sepharose a été évaluée sur une colonne C10/10 (Pharmacia) contenant 6 ml de gel, avec une solution de cryoprécipité prétraité au gel d'alumine et à froid, déposée à saturation. Le temps de contact, défini comme étant le rapport du volume de gel par le débit, a été fixé à 5 min.

Un gradient d'élution a été réalisé dans la solution d'équilibration (0,06-1 M NaCl) afin de déterminer la force ionique optimale d'élution du facteur VIII, puis une élution discontinue a été réalisée dans la suite des expériences par addition de différentes concentration de NaCl dans la solution d'équilibration de départ et ce, afin de séparer le facteur VIII de ses contaminants.

L'optimisation du temps de contact entre la matrice de Q Sepharose et la solution de facteur VIII a amené à modifier les conditions d'équilibration du Q Sepharose par substitution du Tris/HCl par du citrate de sodium 20 mM, pH 7,1 (solution B).

Parallèlement à l'élution au chlorure de sodium, une élution au chlorure de calcium a été étudiée.

Dans le cas du prétraitement glycine/NaCl, plusieurs cycles chromatographiques ont été réalisés à partir de différentes solutions de reprise de la pâte NaCl. Pour cela une simple reprise en eau distillée a été comparée avec une reprise en citrate de sodium 20 mM, pH 7,1 et une reprise en eau à 3 U/ml d'héparine.

Quatre cycles chromatographiques ont ensuite été réalisés en déposant

sur le Q Sepharose une solution de cryoprécipité prétraitée suivant la voie glycine/NaCl et en modifiant la composition des tampons d'élution de manière à faire varier la force ionique de la solution de lavage en chlorure de sodium d'une part (0,15 à 0,30 M) ou en ajoutant du chlorure de calcium 0,06 M, d'autre part.

II.B.1.3.b Echelle intermédiaire

Après optimisation au laboratoire, neuf cycles chromatographiques ont été réalisés à partir d'échantillons de cryoprécipités provenant de la production. Ces cryoprécipités ont été prétraités au gel d'alumine et à froid, et ont subi une inactivation des virus par le TNBP/Tween suivi d'une extraction à l'huile de soja. Environ 600 ml ont été déposés à un débit de lavage de 200 ml/h sur une colonne K 50/30 (Pharmacia) contenant 300 ml de Q Sepharose. Les débits de lavage et d'élution furent respectivement de 200 ml/h et 500 ml/h. La colonne fut ensuite régénérée par une solution de soude 0,1 N puis rééquilibrée en solution B.

Les taux de solvant/détergent ont été suivis au cours de la chromatographie.

II.B.1.3.c Echelle pilote

Un cycle pilote a été réalisé à partir d'un cryoprécipité prétraité selon la voie glycine/NaCl sur une colonne G 90 (Amicon) contenant 1 litre de Q Sepharose selon le protocole résumé dans la figure 16.

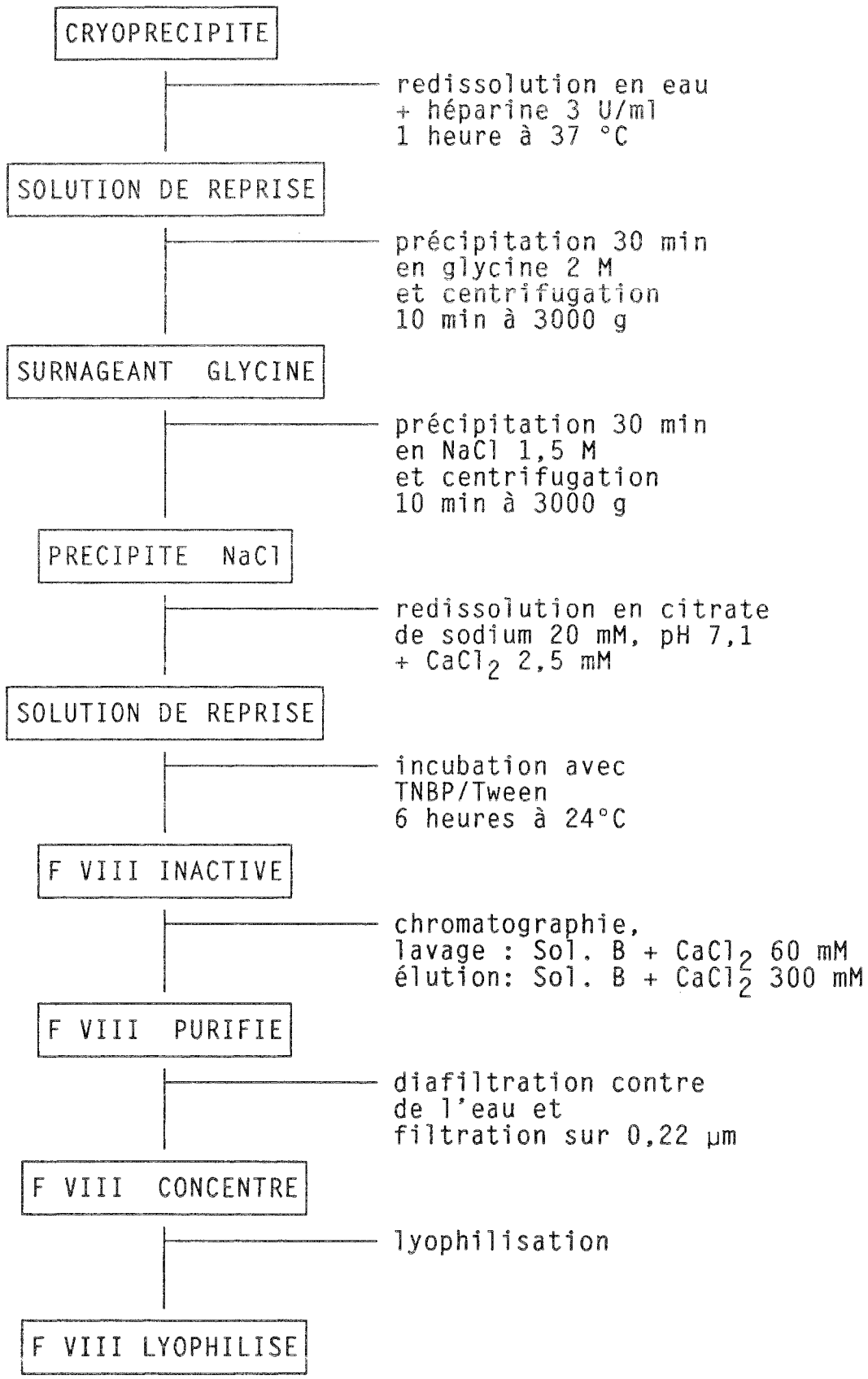


FIGURE 16: SCHEMA DE PURIFICATION DU FACTEUR VIII
SUR Q SEPHAROSE APRES PRETRAITEMENT GLYCINE/NaCL.

II.B.2. TECHNIQUES ANALYTIQUES

II.B.2.1 Dosage de l'activité du facteur VIIIc

Celle-ci est déterminée selon la méthode en 1 temps décrite par SOULIER et LARRIEU (134) et s'effectue de la façon suivante :

100 µl de plasma déficient en facteur VIIIc, (Diagnostica Stago, Paris, France) sont ajoutés à 100 µl d'une gamme de dilution de l'échantillon à doser en tampon Owren-Koller (Diagnostica Stago), puis 200 µl d'une solution de céphaline kaolin (Diagnostica Stago), sont ajoutés à l'ensemble. Le tout est incubé 3 min à 37°C avant d'être recalcifié par addition de 100 µl de chlorure de calcium 25 mM. Le temps de recalcification est alors enregistré sur un coagulomètre KC10 (H. Amelung, Lemgo, RFA). La gamme d'étalonnage quant à elle est réalisée avec un facteur VIIIc standard provenant des laboratoires Diagnostica Stago.

II.B.2.2 Dosage du facteur von Willebrand

Ce dosage est réalisé par la méthode d'électroimmunodiffusion de LAURELL (88) à l'aide d'un kit assera plate vWF provenant des laboratoires Diagnostica Stago (Paris, France).

II.B.2.3 Dosage des protéines totales

Le dosage des protéines du plasma et du cryoprécipité est réalisé par la technique du biuret (56). L'étalonnage est réalisé à l'aide d'un sérum total calibré provenant des laboratoires Biotrol (Paris, France).

L'évaluation de l'activité spécifique après chromatographie est obtenue dans la première partie de ce travail, par le dosage des protéines totales selon la méthode de BRADFORD (14), au bleu de Coomassie avec pour étalon un sérum total provenant des Laboratoires Biotrol (Paris, France). Une seconde technique de dosage des protéines a été utilisée dans la deuxième partie de ce travail. Elle consiste, selon la méthode de KALCKAR (80), à déterminer les densités optiques des différentes solutions à 280 nm et à 260 nm, et à

appliquer la formule générale suivante : [Protéines] (mg/ml) = 1,45 E_{280} - 0,74 E_{260}.

II.B.2.4 Dosage du fibrinogène

Le dosage du fibrinogène dans le précipité s'effectue selon la méthode de GRAM (59) par la détermination sur une balance de précision Sartorius 1207 MP2 (Gottingem, RFA) du poids de fibrine séchée obtenue après transformation du fibrinogène en fibrine par l'action d'une solution de thrombine provenant des laboratoires Roche (Lyon, France) dosée à 100 unités par ml.

Le fibrinogène a été dosé dans les fractions purifiées, selon la méthode de CLAUSS (25) à l'aide d'un kit Fibriprest (Diagnostica Stago).

II.B.2.5 Dosage de la fibronectine

Celle-ci fut déterminée à l'unité INSERM 284 de Nancy par la technique d'électroimmunodiffusion de LAURELL à l'aide d'un anticorps polyclonal anti fibronectine provenant de ses propres laboratoires. L'étalonnage a été réalisé à partir d'un plasma calibré provenant des laboratoires Behring (Marburg, RFA).

II.B.2.6 Dosage des solvant/détergent

Ceux-ci ont été effectués au Service de Chimie du Centre Régional de Transfusion Sanguine de NANCY selon les protocoles établis par HOROWITZ et Coll. (70)(104).

II.B.2.6.a Dosage du TNBP

Le TNBP est dosé par chromatographie en phase gazeuse sur une colonne de silice (Silica gel Blue, 6 mesh up), après déprotéinisation de l'échantillon et extraction à l'hexane.

-Déprotéinisation de l'échantillon :

2,5 g de sulfate de sodium anhydre, 1 ml d'éthanol à 95% et 0,5 ml d'acide perchlorique 1,5 N sont ajoutés à 3 ml d'échantillon. Après agitation vigoureuse, l'ensemble est incubé 10 min à 37°C.

-Extraction du TNBP :

6 ml d'hexane sont ajoutés au mélange, et après 15 min d'agitation, celui-ci est centrifugé 10 min à 2500 g. La phase supérieure contenant le TNBP est extraite, puis l'hexane est évaporé sous courant d'azote. Le TNBP résiduel est ensuite repris dans 50 µl d'hexane puis quantifié en injectant 1 µl de l'échantillon sur le chromatographe. La détection de l'échantillon est réalisée en sortie de colonne par un détecteur à ionisation de flamme couplé à un intégrateur enregistreur.

-Expression des résultats :

La concentration de TNBP étant proportionnelle à la surface du pic de chromatographie obtenu, l'analyse des échantillons est réalisée par référence à une gamme étalon réalisée avec des concentrations connues de TNBP (5 à 50 µg/ml).

II.B.2.6.b Dosage du cholate de sodium

Le cholate de sodium est dosé par colorimétrie à 570 nm après extraction à l'éthanol et incubation avec du paraanisaldéhyde en milieu acide.

-Extraction du cholate de sodium :

1 ml d'échantillon est repris dans 4 ml d'éthanol à 95% puis, après agitation, l'ensemble est centrifugé 10 min à 2000 g. Le surnageant est ensuite évaporé sous courant d'air à 60°C de façon à ramener le volume final à 1 ml.

-Formation du complexe coloré :

0,2 ml de paraanisaldéhyde sont ajouté à 0,1 ml de l'échantillon puis après agitation et addition de 1 ml d'H_2SO_4, 50 %, le mélange est incubé 40 min à 60°C.

-Expression des résultats :

Après refroidissement, les échantillons sont lus au spectrophotomètre à 570 nm, et sont analysés par rapport à une gamme étalon réalisée avec des concentrations connues de cholate de sodium. Il existe une relation linéaire dans une gamme d'étalonnage comprise entre 10 et 80 µg/ml.

II.B.2.6.c Dosage du Tween 80

Le Tween 80 est dosé par colorimétrie à 620 nm après extraction à l'éthanol et incubation avec du cobaltocyanate d'ammonium en présence de dichlorométhane.

-Extraction du Tween 80 :

1 ml d'échantillon est repris dans 5 ml d'éthanol à 95% puis, après agitation, l'ensemble est centrifugé 10 min à 2000 g. Le surnageant est ensuite évaporé sous courant d'azote de façon à ramener le volume final à 0,5 ml et ajusté à 1 ml avec de l'eau distillée.

-Formation du complexe coloré :

2 ml de dichlorométhane et 3 ml de cobaltocyanate d'ammonium (6 g de nitrate de cobalt, 6 H_2O + 40 g de thiocyanate d'ammonium dans 200 ml d'eau distillée) sont ajoutés à 1 ml de l'échantillon puis, après agitation et incubation 30 min à 20 °C, le mélange est centrifugé 10 min à 2000 g.

-Expression des résultats :

Après élimination de la phase supérieure, les échantillons sont lus au spectrophotomètre à 620 nm, et sont analysés par rapport à une gamme étalon réalisée avec des concentrations connues de Tween 80. Il existe une relation linéaire dans une gamme d'étalonnage comprise entre 0 et 1500 µg/ml.

II.B.2.7 Contrôles

Tous les produits et réactifs utilisés lors du fractionnement chromatographique à l'échelle pilote sont contrôlés par le service de chimie du Centre Régional de Transfusion Sanguine de Nancy selon les normes établies par la Pharmacopée française.

II.B.2.7.a Stérilité

Trois milieux de culture spécifiques sont utilisés pour la détection de la présence de champignons, de bactéries aérobies et anaérobies :

La gélose de Saboureau qui est un milieu solide est utilisée pour l'identification et la culture des levures et moisissures. Sa composition est la

suivante: Peptone Chapoteaut à 10 g/l, Glucose Massé à 20 g/l, Agar à 15 g/l, pH 6-6,3. Le temps minimum d'incubation est de 15 j à 25°C.

Le bouillon de Schaedler qui est un milieu liquide, est un milieu spécifique pour la culture des germes anaérobies. Sa composition est la suivante: peptone à 20 g/l, bouillon trypto-caséine-soja à 10 g/l, extrait de levures à 25 g/l, chlorhydrate de cystéine à 0,4 g/l, hémine à 0,01 g/l, glucose à 5 g/l, tampon Tris/HCl à 0,75 M pH 7,6. Le temps d'incubation est de 8 j à 32 °C.

Enfin le bouillon au thioglycolate résazurine est un milieu liquide spécialement utilisé dans le contrôle de stérilité des produits pharmaceutiques. Il permet de rechercher simultanément les bactéries aérobies et anaérobies. Sa composition est la suivante: hydrolysat trypsine de caséine à 15 g/l, extrait de levures à 5 g/l, thyoglycolate de sodium à 0,5 g/l, chlorure de sodium à 2,5 g/l, L-cystéine à 0,5 g/l, glucose à 5,5 g/l, résazurine à 0,001 g/l, agar à 0,75 g/l, pH 7,1. Comme pour le milieu précédent, le temps d'incubation est de 8 j à 32°C.

II.B.2.7.b Pyrogénicité

L'étude de la pyrogénicité des produits injectables est réalisée *in vivo* chez le lapin. La présence des pyrogènes est détectée par la mesure de l'élévation de température occasionnée par l'injection du produit à tester sur trois lapins différents et ce, dans les trois heures qui suivent l'injection. Le produit est considéré comme étant apyrogène si la somme des élévations de température est inférieure à 1,15°C, pyrogène si elle est supérieure à 2,65°C. Une valeur comprise entre ces deux extrémités occasionnera la reprise du test.

II.B.2.7.c Toxicité

L'étude de la toxicité des produits est réalisée *in vivo* chez la souris. Cinq souris différentes reçoivent par voie intrapéritonéale 0,5 ml du produit à tester. Celui-ci sera considéré atoxique si les souris ne présentent aucune perte de poids notable, ni de signes distinctifs d'intoxication dans les sept jours qui suivent l'injection.

II.C. RESULTATS

II.C.1. ADSORPTION EN "BATCH"

Après un prétraitement au gel d'alumine et à froid, la quantité optimale de facteur VIII fixé en "batch" est étroitement liée à la capacité du Q Sepharose d'adsorber la totalité des protéines présentes dans le milieu d'incubation. Dans les conditions fixant la quantité de protéines présentes à 5 mg/ml de support, le pH optimal de fixation sur le support est compris entre 6,8 et 7 (figure 17). En effet, en dessous de pH 6,8, le fibrinogène résiduel précipite, et au dessus de pH 7, le taux de fixation des protéines contaminantes est maximal.

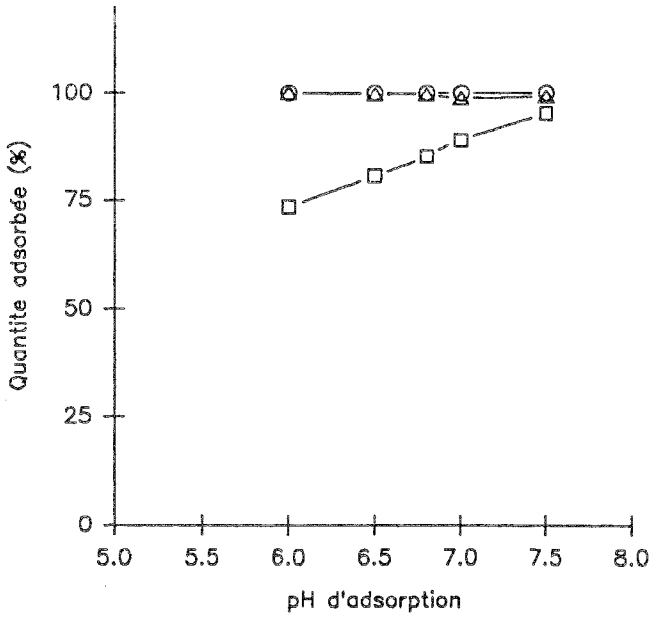


FIGURE 17 : PH OPTIMAL D'ADSORPTION DU Q SEPHAROSE. 1,5 ml de cryoprécipité prétraité au gel d'alumine et à froid, contenant 2,5 unités de facteur VIIIc par ml et 5 mg de protéines par ml, ont été incubés 30 min à 25 °C avec 1,5 ml de Q Sepharose. facteur VIIIc △-△ , facteur von Willebrand ○-○ , Protéines □-□ .

II.C.2. ADSORPTION EN COLONNE

Au-delà de 65 unités de facteur VIII déposées sur le support, soit environ 13 unités par ml de gel, la fixation du facteur VIII par le Q Sepharose pour un temps de contact de 5 min, tend vers un plateau de saturation qui se situe aux environs de 90 unités, soit 15 U/ml de support. Cependant à ce niveau de saturation en facteur VIII, la saturation en protéines n'est pas totale (figure 18).

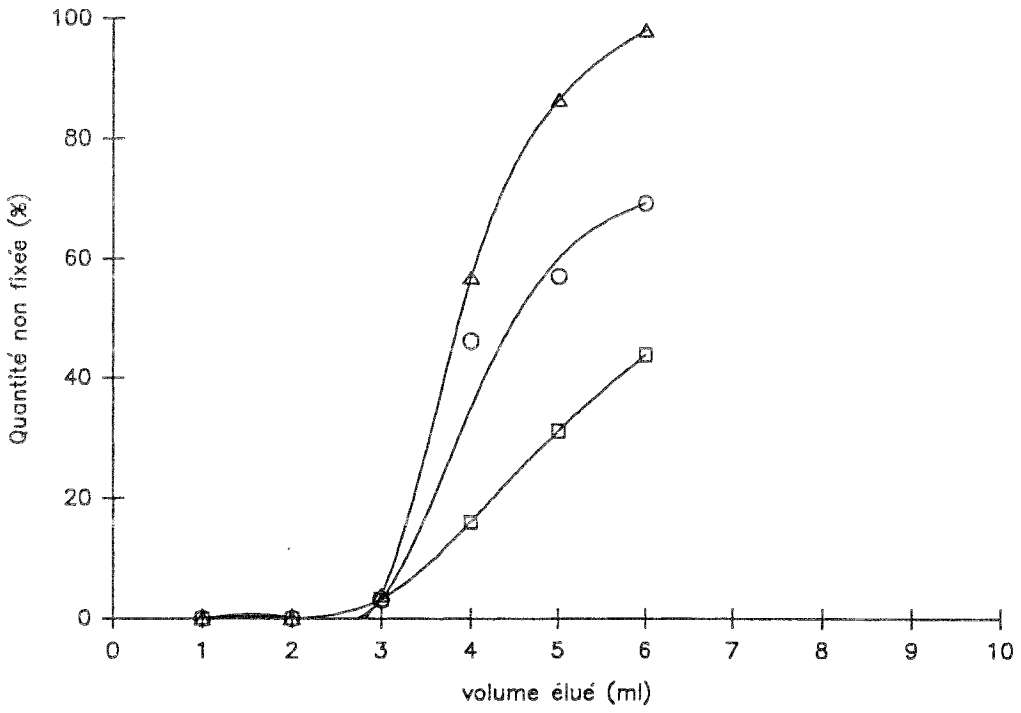


FIGURE 18 : CAPACITE D'ADSORPTION DU Q SEPHAROSE EN COLONNE. Une solution de cryoprécipité prétraité au gel d'alumine et à froid a servi à l'étalonnage d'une colonne de 6 ml de Q Sepharose. 8 ml de cette solution ont été déposés sur la colonne à un débit de 80 ml/h. Les concentrations de facteur VIIIc, de facteur von Willebrand et de protéines totales sont respectivement de 15 U/ml, 65 U/ml et 5 mg/ml. Des fractions de 1 ml ont été prélevées en sortie de colonne et analysées. facteur VIIIc △-△ , facteur von Willebrand ○-○ , protéines totales □-□ .

II.C.3. ELUTION PAR GRADIENT NACL

Qualitativement, un gradient de force ionique en NaCl (0,06-1 M)

permet de réaliser une élution fractionnée du fibrinogène suivi par le facteur von Willebrand, immédiatement suivi par le facteur VIII (figure 19). Cela se traduit en densité optique à 280 nm par deux pics majeurs, le facteur VIII se retrouvant à la fin de ce deuxième pic. Un dosage complémentaire met en évidence une co-élution de la fibronectine avec le facteur von Willebrand.

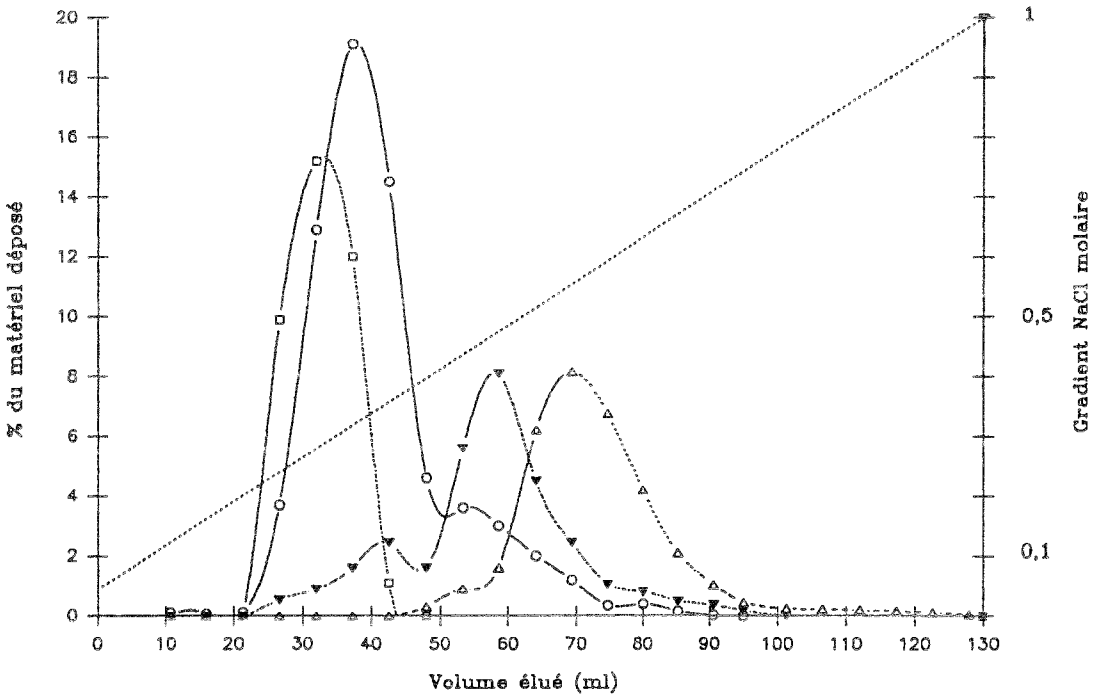


FIGURE 19 : PROFIL D'ELUTION EN GRADIENT NaCL. Une solution de cryoprécipité prétraité au gel d'alumine et à froid, a été déposée en excès sur une colonne de 6 ml de Q Sepharose à un débit de 80 ml/h, puis elle a été éluée par un gradient NaCl (0,06 - 1M) à un débit de 40 ml/h. Protéines totales ○-○ , F VIIIc △-△ , vWFag ▲-▲ , Fibrinogène □-□ .

Quantitativement, la capacité optimale de fixation du Q Sepharose à débit élevé (temps de contact de 5 min), est de 6 unités de facteur VIII par ml de support pour un rendement de 50 % à l'élution. On peut adsorber jusqu'à 10 U/ml de support mais au détriment du rendement qui chute à 25 %, De plus, il est préférable d'utiliser comme solution de dépôt, un facteur VIII inactivé non concentré, car une concentration du facteur VIII avant l'étape chromatographique entraîne également une concentration des protéines contaminantes qui nuisent à la fixation du facteur VIII sur la

matrice de Q Sepharose par un phénomène d'adsorption compétitive étant donné leur pHi très voisin.

II.C.4. ELUTION DISCONTINUE

Le tableau II donne les résultats obtenus après dépôt sur Q Sepharose de différentes solutions de cryoprécipité prétraité au gel d'alumine et à froid. Avec un lavage d'une force ionique intermédiaire réalisé avec une solution de NaCl 0,2 molaire, la pureté du facteur VIII est augmentée d'un facteur cinq par élimination d'une plus grande partie de ses protéines contaminantes par rapport à l'élution par gradient. Il est à noter, de plus, que le dernier cycle réalisé avec une solution de facteur VIII préparée en laboratoire montre une activité spécifique bien supérieure à celle obtenue lors des quatre premiers cycles, réalisés avec des lots provenant de la production.

n°lot	dépôt U/ml gel	F VIIIc adsorbé %	élution primaire en NaCl	F VIIIc élué* %	élution finale en NaCl	F VIIIc élué* %	activité spécifique U/mg
1	6	97	0,2 M	0	0,5 M	47	3,3
1	6	97	0,2 M	0	0,5 M	47	3,3
2	14	68	0,2 M	0	0,5 M	55	4,5
2	14	63	0,25 M	0,5	0,5 M	46	5
3	6	100	0,2 M	0	1 M	35	24,4

* Rendement d'élution déterminé par rapport à la quantité adsorbée.

TABLEAU II : ELUTION DISCONTINUE DU FACTEUR VIII SUR Q SEPHAROSE EN CHLORURE DE SODIUM. Deux lots de cryoprécipités préparés en production et un troisième lot préparé en laboratoire, par précipitation au gel d'alumine, précipitation à froid et ayant subi une inactivation des virus par TNBP/Tween, ont été successivement déposés sur une colonne de 6 ml de Q Sepharose. Pour les deux premiers lots, deux expériences ont été réalisées en parallèle. Une première élution de force ionique intermédiaire a été réalisée afin d'éluer les contaminants suivie d'une seconde élution de force ionique supérieure afin d'éluer le facteur VIIIc (Débit de dépôt: 4 ml/h, débit d'élution: 12 ml/h).

II.C.5. OPTIMISATION DES PARAMETRES

La fixation du temps de contact à 90 min, au lieu de 5 min, permet d'augmenter la capacité d'adsorption du Q Sepharose qui atteint environ 20 unités de facteur VIII par ml de support (tableau III). Cependant, il est nécessaire de prééquilibrer la colonne en citrate de sodium 20 mM, pH 7,1, car en absence de citrate, le fibrinogène a tendance à précipiter au contact de la matrice bloquant toute élution ultérieure.

La substitution du chlorure de sodium par le chlorure de calcium dans l'élution des contaminants permet également une amélioration de l'activité spécifique du facteur VIII lors de son élution finale (cycles 1 et 2), et les contaminants peuvent être élués en chlorure de calcium jusqu'à concurrence de 70 mM (cycle 7) sans perte importante du facteur VIII. Cependant 65 mM (cycle 6) donne le meilleur compromis entre une activité spécifique élevée et un faible pourcentage de facteur VIII élué dans la solution de lavage.

n°cycle	dépôt U/ml gel	F VIIIc adsorbé %	agent d'élution primaire	F VIIIc élué* %	F VIIIc élué* en CaCl2 300 mM %	activité spécifique U/mg
1	7.3	100	NaCl 50 mM	0	41	13
2	7.3	"	CaCl2 50 mM	"	45	17
3	20	"	" 50 mM	"	57	11
4	20	98	" 60 mM	2	49	20
5	17	100	" 60 mM	nd**	35	30
6	16	97	" 65 mM	3	36	82
7	17	92	" 70 mM	8	42	81
8	16	87	" 75 mM	13	24	89

* Rendement d'élution déterminé par rapport à la quantité adsorbée.
** Non dosé.

TABLEAU III : INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN SEL DE LA SOLUTION DE LAVAGE SUR LES RENDEMENTS D'ELUTION DU FACTEUR VIII. Différentes solutions de cryoprécipité obtenues par précipitation au gel d'alumine, précipitation à froid et ayant subi une inactivation des virus par TNBP/Tween, ont été déposées sur 6 ml de Q Sepharose. Après élution des contaminants par différentes concentrations en sels, le facteur VIIIc est élué par une solution de chlorure de calcium 300 mM (Débit de dépôt: 4 ml/h, débit d'élution: 12 ml/h).

II.C.6. PURIFICATION A L'ECHELLE INTERMEDIAIRE

Neuf cycles successifs ont été réalisés avec différentes solutions de cryoprécipités prétraitées et inactivées provenant de la production. Cela a permis de récupérer en moyenne 6 Unités de facteur VIII par ml de support avec une activité spécifique supérieure à 25 U/mg, soit, un facteur de purification d'environ 25 à l'étape chromatographique pour un rendement moyen de 60 %.

II.C.7. ELIMINATION DES AGENTS DE L'INACTIVATION DES VIRUS

Il est intéressant de noter une bonne élimination par exclusion des solvant/détergent lors de la phase chromatographique. En effet, l'analyse de leur concentration respective dans la solution d'élution du facteur VIII, purifié à l'échelle intermédiaire, a donné un taux résiduel de TNBP de 2,95 ± 1,2 (n = 2) µg/ml de solution, et un taux résiduel de Tween de 43,5 ± 17,7 (n = 2) µg/ml de solution.

II.C.8. PRETRAITEMENT GLYCINE/NaCL

Après redissolution en eau héparinée, une précipitation sélective à la glycine suivie par une précipitation sélective au NaCl permet de récupérer un facteur VIII purifié 20 fois par rapport à la pâte cryoprécipité de départ (tableau IV). Le facteur VIII est ensuite purifié environ 26 fois avec un rendement de près de 80 % à l'étape chromatographique pour une activité spécifique supérieure à 150 unités par mg de protéines.

Le tableau V donne les variations de rendement et d'activité spécifique du facteur VIII obtenues à l'étape chromatographique en fonction de la solution déposée sur la colonne. La reprise de la "pâte NaCl" en eau distillée donne des résultats supérieurs, cependant, la solution ainsi préparée est instable et a tendance à précipiter au contact du Q Sepharose. Ce problème peut être résolu en ajoutant du citrate à la solution de reprise. Il est à noter que l'adjonction de citrate modifie alors le profil d'élution (figures 20a et 20b), ce qui se traduit par une élimination immédiate des protéines contaminantes qui ne s'adsorbent plus lors de leur passage sur la colonne de Q Sepharose.

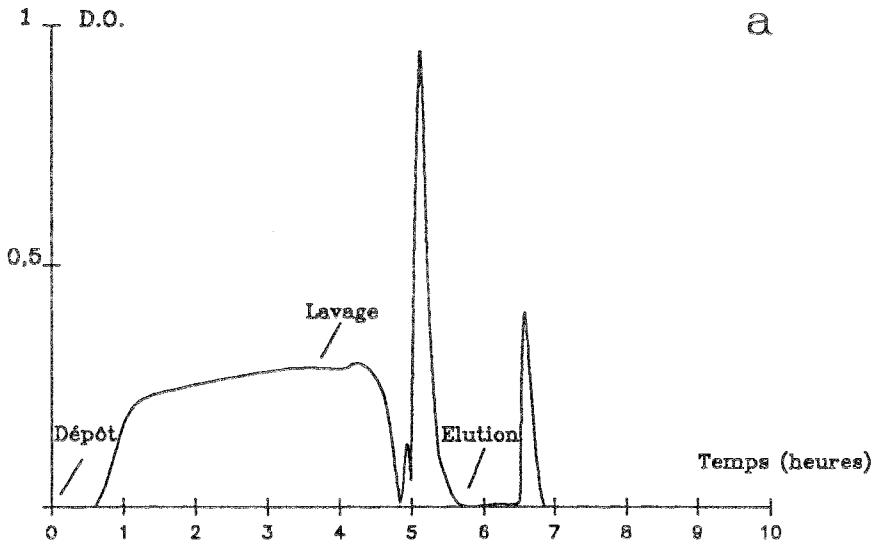
	Extraction eau + héparine	Précipitation glycine (surnageant)	Précipitation NaCl (précipité)	Chromatographie sur Q Sepharose (éluat)
F VIIIc U/l plasma	668,6	361,7	307,5	245,0
Rendement par étape	66,9%	54,1%	85,0%	79,7%
Activité Spécifique U/mg protéines	0,30	0,95	6,10	160

TABLEAU IV : CHROMATOGRAPHIE SUR Q SEPHAROSE APRES PRETRAITEMENT GLYCINE/NaCl. Après prétraitement de 15 g de cryoprécipité, la pâte NaCl obtenue est alors reprise dans de l'eau distillée à concurrence de 140 mosmoles, puis 12 ml de cette solution sont ensuite déposés sur 6 ml de Q Sepharose [F VIIIc] = 8,5 U/ml, [protéines] = 1,4 mg/ml (Débit de dépôt: 4 ml/h, débit d'élution: 12 ml/h).

n°cycle	solution de reprise	rendement d'élution* %	activité spécifique U/mg	bilan U/l plasma
1	eau PPI	80	157	245
2	"	87	181	268
3	"	118	110	472
4	citrate 20 mM	41	53	115
5	"	57	52	162
6	"	77	56	309
7	"	74	45	212
8	citrate+$CaCl_2$ 2,5 mM	86	51	246
9	"	46	45	164
10	eau+$CaCl_2$ 2,5 mM	57	35	201

* Le rendement est déterminé à partir de la quantité déposée.

TABLEAU V : VARIATION DES RESULTATS CHROMATOGRAPHIQUES EN FONCTION DE LA SOLUTION DE REDISSOLUTION DE LA "PATE NaCl". Pour chaque cycle, environ 8 g de cryoprécipité ont subi le prétraitement glycine/NaCl. La "pâte NaCl" obtenue a été reprise dans différentes solutions avant d'être déposée sur 6 ml de Q Sepharose. Après élution des contaminants par la solution d'équilibration contenant 60 mM de $CaCl_2$, le F VIII a été élué par la solution d'équilibration contenant 300 mM de $CaCl_2$. Les cycles 9 et 10 ont subi en plus une inactivation des virus par TNBP/Tween (débit de dépôt: 4 ml/h, débit d'élution: 12 ml/h).



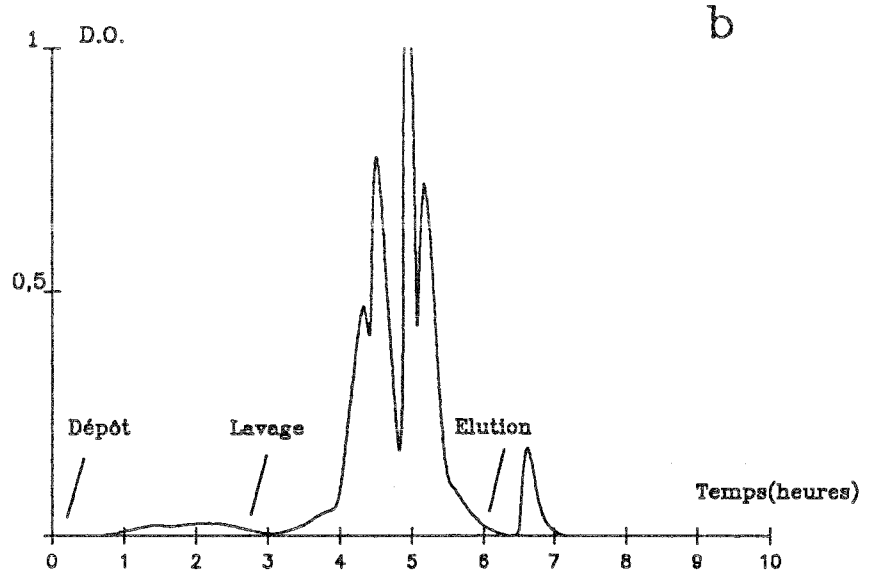


FIGURE 20 : INFLUENCE DU CITRATE DE SODIUM SUR LE PROFIL CHROMATOGRAPHIQUE. Le premier profil d'élution, classique, réalisé sur une colonne de 6 ml de Q Sepharose, est obtenu avec une solution de facteur VIII ayant subi un prétraitement glycine/NaCl et ayant été prééquilibrée en citrate de sodium 20 mM, pH 7,1 (a). Le deuxième profil d'élution, différent, est obtenu avec la même solution de facteur VIII mais n'ayant pas été prééquilibrée en citrate (b). Dans les deux cas, le facteur VIII est élué avec un solution de $CaCl_2$ 300 mM après élution des contaminants avec une solution de $CaCl_2$ 60 mM.

L'utilisation d'une élution discontinue à l'aide de chlorure de sodium permet d'obtenir un rendement optimal à l'élution de 35 % en facteur VIII lorsque l'on fixe la conductivité de la solution de lavage à 15 mS/cm (tableau VI). L'augmentation de la conductivité de la solution de lavage par du NaCl permet d'augmenter la pureté de l'éluat final mais au détriment du rendement, car une partie du facteur VIII se retrouve alors dans la solution de lavage (cycles 1,2 et 3). Par contre l'addition de $CaCl_2$ à la place de NaCl dans la solution de lavage à concurrence de 15 mS/cm (cycle 4), permet de décrocher une quantité plus élevée des contaminants sans perte supplémentaire de facteur VIII, ce qui permet ainsi d'améliorer l'activité spécifique. Enfin, la substitution d'une élution finale du facteur VIII au NaCl 0,5 M par une élution au $CaCl_2$ 0,3 M permet la récupération totale de l'activité VIIIc à conductivité équivalente (cycle 1 et 4).

Agent d'élution primaire	Conductivité mS/cm	F VIIIc élué* %	Protéines totales* %	Agent d'élution finale	Conductivité mS/cm	F VIIIc élué* %	Protéines totales* %	activité spécifique U/mg
NaCl 0,15M	15	0	52,5	NaCl 0,5M	45	35	36	5,5
NaCl 0,25M	22,5	0,6	54,5	NaCl 0,5M	"	32,5	25,5	5
NaCl 0,30M	26,5	5,3	75,6	NaCl 0,5M	"	25	4,5	20
$CaCl_2$ 0,06M	16	1,6	nd**	$CaCl_2$ 0,3M	40	110	4,5	140

* Les rendements d'élution sont déterminés à partir de la quantité déposée.
** Echantillon précipité.

TABLEAU VI : INFLUENCE DE LA CONDUCTIVITE ET DE LA NATURE DE L'ION SUR LES RENDEMENTS D'ELUTION FRACTIONNEE DU F VIII SUR Q SEPHAROSE. Pour chaque cycle, environ 8 g de cryoprécipité ont subi un prétraitement glycine/NaCl. La "pâte NaCl" obtenue a été reprise dans 12 ml de citrate de sodium 20 mM, pH 7,1 pour être déposée sur 6 ml de Q Sepharose [F VIIIc] = 9 U/ml, [protéines]= 1,9 mg/ml. Le facteur VIIIc est élué après élution des contaminants par différentes concentrations en sels (débit de dépôt: 4 ml/h, débit d'élution: 12 ml/h).

Un dernier cycle, réalisé avec une solution de facteur VIII déposée en excès, a permis de définir les quantités nécessaires pour le passage à l'échelle

pilote à savoir une quantité de facteur VIII à déposer sur la colonne d'environ 15 unités par ml de support.

II.C.9. PURIFICATION A L'ECHELLE PILOTE

A partir des résultats précédents, un essai pilote a été réalisé dans les conditions simulées de la production. C'est à dire réalisé avec le matériel adapté à une production industrielle en semi continu, classiquement utilisé au service de fractionnement du centre de transfusion. Le facteur VIII ainsi produit fut conforme aux normes établies par la Pharmacopée française, notamment pour ce qui concerne les taux résiduels de TNBP et de Tween (TNBP indétectable, norme à 10 µg/ml, Tween = 7,9 µg/ml, norme à 100 µg/ml). Toutefois, des problèmes techniques liés au changement d'échelle sont apparus et n'ont pas permis d'obtenir des rendements comparables à ceux obtenus à l'échelle du laboratoire. Ces problèmes n'ont pas été rencontrés au niveau de l'étape chromatographique, qui a permis d'augmenter la pureté du facteur VIII d'un facteur 50 au lieu de 30 obtenu en laboratoire, mais au niveau de la phase du prétraitement. En effet, le système de centrifugation utilisé en production s'est révélé inadapté lors de la séparation du fibrinogène, précipité par la glycine, du reste de la solution de facteur VIII. Cette mauvaise séparation s'est alors répercutée sur les étapes suivantes et a donné ainsi un composé final ayant une activité spécifique de seulement 30 U/mg.

II.D. DISCUSSION

Dans toute purification du facteur VIII, le problème majeur retrouvé à toutes les étapes est lié à l'instabilité latente du fibrinogène présent qui a tendance à précipiter à la moindre variation du pH ou de l'équilibre citrate/$CaCl_2$ (44). Il a donc été testé parallèlement à la technique classique de prétraitement du cryoprécipité, une technique différente, permettant de réduire considérablement la concentration des protéines contaminantes avant l'étape chromatographique. Cette réduction est réalisée par une précipitation sélective du fibrinogène par de la glycine 2 M, et par une précipitation sélective du facteur VIII par du chlorure de sodium 1,5 M. Cependant le facteur VIII ainsi extrait, doit être repris dans une solution citratée pour éliminer le risque de précipitation spontanée du fibrinogène résiduel lors du passage sur la colonne de Q Sepharose, et ce au détriment de la pureté du produit.

L'optimisation de la phase chromatographique est une phase importante dans le processus de purification du facteur VIII par la technique d'échange d'ions. La pureté du produit final dépendra fortement de cette optimisation. De nombreux supports chromatographiques sont à la disposition de l'utilisateur, cependant peu d'informations pratiques sont disponibles en ce qui concerne les interactions de ces supports avec les protéines : leur capacité d'échange, l'accessibilité des groupements, etc... Aussi, la capacité de fixation des protéines varie considérablement d'un support à l'autre et si certains supports permettent d'appliquer des débits élevés, ce qui est une propriété très avantageuse d'un point de vue industriel, ceux ci n'améliorent pas forcément les rendements de purification. Dans cette étude, l'augmentation du temps de contact de 5 à 90 min a permis de doubler la capacité de fixation du facteur VIII à partir d'une solution ayant subi un prétraitement classique et ce pour des rendements d'élution comparables.

Suivant la technique de prétraitement utilisée lors des essais au niveau du laboratoire, les résultats chromatographiques obtenus sont différents. La technique de prétraitement basée sur la production actuelle permet d'obtenir après chromatographie sur Q Sepharose un facteur VIII à 25-30 unités par mg de protéines avec un rendement chromatographique de près de 60 % pour un rendement global par rapport au plasma de 20 ± 5% (n=2). La technique de prétraitement faisant appel à une précipitation à la glycine suivie d'une précipitation au chlorure de sodium permet quant à elle d'obtenir 50 à 60 unités par mg de protéines avec un rendement chromatographique de près de 75 % pour un rendement global de 20 ± 10% (n=2). Dans cette seconde voie, la redissolution de la pâte NaCl en eau PPI dépourvue de citrate de sodium permet même d'obtenir un facteur VIII compris entre 100 et 200 unités par mg de protéines avec un rendement chromatographique supérieur à 90 % pour un rendement global de 30 ± 10% (n=2), mais avec le risque non totalement maîtrisé de colmatage de la colonne par le fibrinogène résiduel.

Au regard des résultats obtenus avec les deux méthodes de prétraitement du cryoprécipité, un cycle pilote a été réalisé à partir d'un prétraitement glycine/NaCl. Celui-ci permet d'obtenir avant l'étape chromatographique une solution de facteur VIII dépourvue d'une plus grande partie de ses contaminants dont le principal est le fibrinogène. L'intérêt majeur du prétraitement de la solution de facteur VIII avant l'étape chromatographique est d'une part d'augmenter la pureté du produit final et d'autre part d'augmenter la capacité de fixation du support qui ne sera pas surchargé en protéines contaminantes.

Le cycle pilote, réalisé selon cette voie, a donné des résultats satisfaisants à l'étape chromatographique mais a révélé en revanche un problème d'ordre technique lié aux matériels utilisés pour le changement d'échelle. En effet, l'élimination du fibrinogène précipité à l'étape glycine a été réalisée par une centrifugation discontinue dans des poches plastiques afin de préserver la stérilité du produit. Cette solution ne semble pas être adaptée à cette échelle car une mauvaise séparation s'en est suivie lors du prélèvement du surnageant; ce qui s'est répercuté tout au long de la chaîne de purification. Aussi, la résolution de ce problème technique de séparation par une centrifugation appropriée permettrait de montrer la faisabilité de ce

procédé au niveau industriel.

L'utilisation du chlorure de calcium dans l'élution fractionnée du facteur VIII sur l'échangeur d'ions est un point clé du protocole. Associé aux solutions d'élution, et à des concentrations bien précises, le chlorure de calcium permet dans un premier temps d'éliminer par augmentation de la force ionique la plus grande partie des contaminants majeurs. Il permet en outre dans un deuxième temps une récupération supérieure du facteur VIII de par son rôle "d'affinant" vis à vis de celui-ci, comme l'a démontré TUDDENHAM et Coll. (146) et de par son rôle de contre-ions vis à vis de la matrice de Q Sepharose.

D'un point de vue purement industriel, la technique d'échange d'ions possède des atouts non négligeables par rapport aux techniques de chromatographie d'affinité sur anticorps polyclonaux ou monoclonaux. C'est une technique performante et d'un coût moindre. Lors d'une industrialisation dans un but thérapeutique, les problèmes d'aseptisation du support sont réduits car celui-ci est stérilisable en NaOH 0,1 N, ce qui n'est pas possible pour des supports sur lesquels sont greffées des protéines. La structure même du gel, qui a été conçue pour résister à des débits élevés, est a fortiori capable de résister avec plus d'efficacité a des surpressions en cas de colmatage accidentel.

Ces dernières années, plusieurs centres de transfusion sanguine, dont celui de Nancy, ont entrepris des études de faisabilité sur différentes matrices d'échange d'ions au fur et à mesure de leur apparition sur le marché. Une étude française, réalisée par le C.R.T.S. de Lille, a fait l'objet d'une publication récente (20). A la suite de cette étude, le DEAE-Fractogel TSK 650 M a été sélectionné pour une production à l'échelle industrielle. Les critères de sélection qui ont amené le C.R.T.S. de Lille à faire ce choix sont en parties liés aux coûts de production, ainsi qu'aux rendements de purification obtenus avec ce support qui, tenant compte du protocole qui a été appliqué, donne des meilleurs résultats que le Q Sepharose.

II.E. CONCLUSION

L'utilisation de la chromatographie d'échange d'ions à partir de concentrés de facteur VIII de pureté intermédiaire est une alternative intéressante aux techniques classiques car elle permet d'obtenir un concentré de facteur VIII de très haute pureté et l'utilisation du Q sepharose comme support chromatographique pourra permettre une production sur des lots importants à l'échelle industrielle lorsque tous les problèmes techniques seront maîtrisés. Les techniques mises en oeuvre dans ce procédé permettent de minimiser le risque d'alloantigénicité du produit par rapport à la technique actuelle de production. De plus, cette fraction a subi au cours de sa préparation une inactivation des virus par solvant/détergent diminuant ainsi tout risque de contamination virale. La nature même du support ne faisant pas appel à un immunoadsorbant, elle permet d'une part d'éliminer le problème du relargage d'anticorps dans les fractions purifiées de facteur VIII et permet d'autre part d'être avantageuse sur le plan économique. Enfin, la possibilité de stérilisation *in situ* permet d'augmenter la durée de vie du support. Il restera toutefois à valider cette technique originale de production selon les normes en vigueurs établies par la Pharmacopée française en prévision du marché unique européen.

III. IMMUNOEPURATION DU LDL-CHOLESTEROL

III.A. INTRODUCTION

L'apolipoprotéine B est le principal composant protéique des LDLs (Low Density Lipoproteins). Ces LDLs sont une classe de lipoprotéines dont la fonction principale est le transport du cholestérol sanguin vers les tissus (18). L'apolipoprotéine B joue un rôle clé dans le métabolisme du cholestérol. Son interaction avec les récepteurs cellulaires des LDLs permet de cataboliser le cholestérol sanguin par internalisation cellulaire (19). Aussi, une défaillance dans le système de reconnaissance Apo B/récepteur se traduira par l'augmentation et l'accumulation du LDL-cholestérol dans le sang qui sera à l'origine de certaines maladies cardio-vasculaires. Cette accumulation de LDLs aura pour conséquence la formation accélérée de plaques d'athérome conduisant à l'obstruction prématurée des vaisseaux sanguins (123).

L'hypercholestérolémie familiale correspond à l'expression défectueuse du gène qui code pour le récepteur membranaire des LDLs. Cette maladie de transmission autosomale à caractère dominant présente deux formes cliniques distinctes: une forme légère hétérozygote et une forme sévère homozygote (65).

Une thérapeutique classique à base de médicaments prescrits par voie orale permet souvent de réduire de manière significative le taux de LDL-cholestérol dans le traitement de la forme hétérozygote (82)(156). Cependant elle reste inefficace dans le cas de la forme homozygote.

Dans ce dernier cas, des thérapeutiques plus drastiques ont été développées. Parmi les plus utilisées, citons le pontage portocave (135), la transplantation hépatique (10), l'échange plasmatique (142), les traitements semi-spécifiques du plasma comme la double filtration (68), la précipitation à l'héparine (39), et plus récemment différents types de traitements permettant d'épurer de manière sélective les LDLs du plasma (12).

Ces dernières sont réalisées principalement à l'aide de supports chromatographiques sur lesquels les LDLs sont captées par affinité vis à vis du ligand. Parmi ces différents supports utilisés, citons l'héparine-Sepharose (91), le sulfate de dextran-cellulose (30)(92), et des anticorps poly ou monoclonaux anti Apolipoprotéine B couplés à du Sepharose CL-4B (121) (137)(145). Ces derniers supports constituent l'une des thérapeutiques les plus séduisantes, et nous proposons dans ce travail de développer l'une de ces techniques à base d'anticorps polyclonaux de chèvre en vue d'une fabrication à grande échelle.

III.A.1. GENERALITES ET NOMENCLATURE

Les lipoprotéines sont des complexes macromoléculaires circulant dans le sang, constitués d'une partie protéique et d'une partie lipidique comme l'a démontré MARCHEBOEUF dès 1929. Mais ce n'est que dans les années 50 que l'on s'intéressât vraiment à leur étude lorsque l'on disposât des outils nécessaires à leur purification.

Les lipoprotéines ont pour fonction principale le transport des lipides endogènes et exogènes entre les différents tissus (triglycérides, cholestérol et phospholipides) (106).

Les lipoprotéines sont synthétisées au niveau du foie et de l'intestin puis elles sont catabolisées par le foie.

Quatre grandes classes de lipoprotéines, elles-mêmes subdivisées en plusieurs sous-classes ont été révélées par électrophorèse sur papier lors de l'analyse biochimique des pathologies liées aux hypercholestérolémies (classification de FREDRICKSON) (45). Ce sont les chylomicrons, les VLDLs, les LDLs et les HDLs (tableau VII). Cette classification quelque peu arbitraire des lipoprotéines est également basée sur la valeur de leur indice de flottaison, obtenu par ultracentrifugation. Celui-ci est fonction de la teneur des différents lipides constitutifs ainsi que des différentes apoprotéines (63).

Les lipoprotéines sont de grosses particules sphériques de plusieurs millions de masse moléculaire. Elles sont constituées au coeur par des lipides neutres, notamment des esters de cholestérol et des triglycérides et, à la

périphérie, par des lipides chargés, principalement des phospholipides et du cholestérol libre. Sont également réparties à la surface de ces particules, différentes protéines encore appelées apoprotéines qui portent l'information nécessaire pour leur métabolisme. Elles sont au nombre de 8 majoritaires et elles ont pour dénomination Apo A I, Apo A II, B, C I, C II, C III, D et E (2).

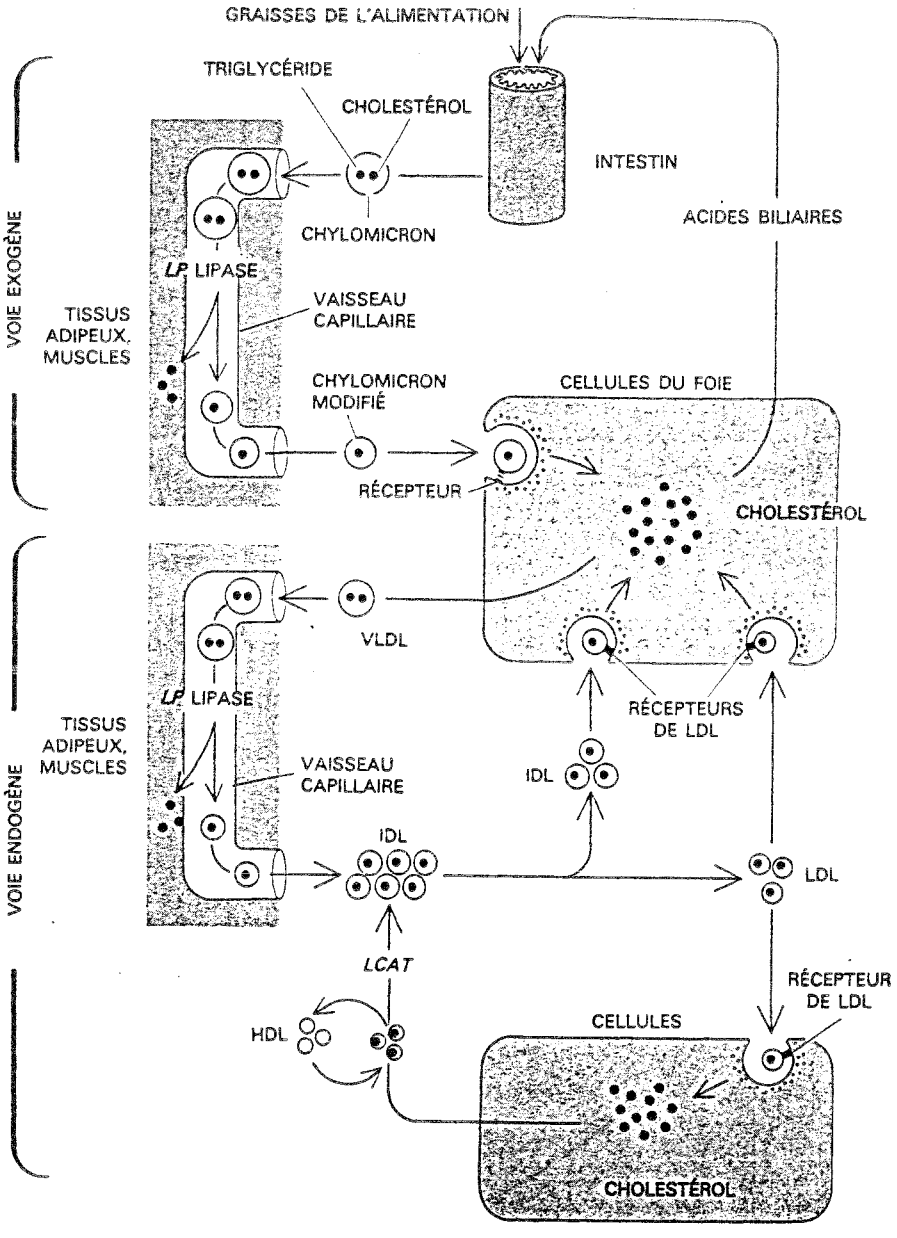
Propriétés et composition	Classes lipoprotéiques			
	Chylomicrons	VLDLs	LDLs	HDLs
Taille (Å)	750-12000	300-700	180-300	50-120
Densité (g/ml)	0,94	0,94-1,006	1,019-1,063	1,063-1,21
Triglycérides (% poids)	80-95	45-65	4-8	2-7
Phospholipides (% poids)	3-6	15-20	18-24	26-32
Cholestérol libre (% poids)	1-3	4-8	6-8	3-5
Cholestérol estérifié (% poids)	2-4	16-22	45-50	15-20
S_f^0	400	20-400	0-12	0-9
Mobilité électrophorétique	Origine	pré-β	β	α
Protéines (% poids)	1-2	6-10	18-22	45-55
Apoprotéines majeures	A-I, A-IV, B, CI, CIII, E	B, E, CI, CII, CIII	B	A-I, A-II E
Apoprotéines mineures	A-II, CII	A-I, A-II A-IV	CI, CII, CIII, E	CI, CII, CIII, D, E

TABLEAU VII : PROPRIETES ET COMPOSITION DES LIPOPROTEINES. Quatre grandes classes de lipoprotéines ont été définies d'après leur mobilité électrophorétique lors de l'analyse biochimique des hypercholestérolémies. Ces principales classes sont également caractérisées par leur indice de flottaison en ultracentrifugation analytique S_f^0, qui est relié directement à leur teneur en lipides et apoprotéines (d'après HERBERT et Coll. 1982, modifié par ZANNIS et Coll. 1990).

L'étude de la structure secondaire de ces apoprotéines révèle que celles-ci sont constituées de régions hélicoïdales polaires et apolaires leur permettant d'interagir d'une part avec la phase aqueuse et avec les lipides à tête polaire tels que les phospholipides et d'autre part avec les lipides apolaires tels que les triglycérides et les esters de cholestérol.

Le métabolisme des lipoprotéines est complexe et n'est pas encore totalement élucidé à l'heure actuelle. Cependant, les principaux phénomènes métaboliques sont connus et sont résumés dans la figure 21.

FIGURE 21 : METABOLISME DES LIPIDES ENDOGENES ET EXOGENES. L'absorption du cholestérol et des lipides alimentaires est réalisée au niveau de la paroi intestinale. Ceux-ci sont alors stockés dans les chylomicrons. Les esters d'acides gras sont dégradés dans les capillaires des tissus graisseux et musculaires par la lipoprotéine lipase, puis les acides gras sont libérés. Le cholestérol est quant à lui amené directement aux cellules du foie. Suivant les besoins de l'organisme, le cholestérol est soit éliminé directement par retour vers l'intestin sous forme d'acide biliaire, soit stocké avec des triglycérides dans les VLDLs, puis envoyé dans la circulation générale, intégrant ainsi le métabolisme des lipides endogènes. Dans cette voie, les triglycérides sont absorbés par les tissus graisseux et musculaires laissant le cholestérol dans les IDLs. Une partie des IDLs est captée par les cellules du foie alors que l'autre partie est convertie en LDL. Ces LDLs sont retirées de la circulation générale par les cellules du foie ou par d'autres cellules en fonction des besoins. Le cholestérol relargué par ces cellules est pris en charge par les HDLs, et est estérifié par la LCAT. Ces esters sont alors recyclés vers les IDLs voire les LDLs et sont éventuellement recaptés au niveau des cellules (d'après BROWN et GOLDSTEIN 1985).



Parmi les principales lipoprotéines impliquées, nous y distinguons :

- Les chylomicrons (CM) qui sont synthétisés au niveau de l'intestin par les entérocytes et qui sont chargés de transporter les triglycérides et le cholestérol alimentaire venant d'être absorbés vers la circulation générale.

- Les lipoprotéines de très faible densité (VLDL) qui sont synthétisées par le foie et qui transportent les triglycérides endogènes également synthétisés par le foie.

- Les lipoprotéines de densité intermédiaire (IDL) qui, comme leur nom l'indique, sont des lipoprotéines de densité intermédiaire entre les VLDLs et les LDLs. Elles constituent également l'étape métabolique intermédiaire entre les VLDLs et les LDLs.

- Les lipoprotéines de faible densité (LDL) qui sont synthétisées par le foie et constituent le principal transporteur du cholestérol dans le sang. Elles sont caractérisées par leur partie protéique essentiellement composée d'Apolipoprotéine B dont la fonction principale est de présenter le cholestérol aux cellules qui possèdent le récepteur spécifique de l'Apo B.

- Les lipoprotéines de haute densité (HDL) également synthétisées par le foie. Ce sont les lipoprotéines les plus riches en apoprotéines. Elles transportent essentiellement des phospholipides et du cholestérol estérifié, et leur concentration dans le sang augmente avec un régime alimentaire riche en cholestérol. Leur partie protéique est essentiellement constituée d'Apolipoprotéines A qui ont pour fonction principale l'activation de l'épuration cellulaire du cholestérol en excès, par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques de l'Apo A. De par leur fonction, ces HDLs sont essentielles au maintien de l'homéostase du cholestérol (96).

L'étude du métabolisme des lipoprotéines a permis de mieux comprendre les différentes pathologies liées à un dysfonctionnement général et de permettre ainsi une thérapeutique plus efficace car mieux ciblée. On a pu mettre en évidence une relation étroite entre le taux élevé de lipoprotéines plasmatiques chez certains individus et l'apparition prématurée de maladies coronariennes.

4 % de la population présentent des anomalies lipidiques dont 2 % sont d'origine génétique. Plusieurs classifications de ces différentes anomalies ont été proposées et ces anomalies sont résumées sous le terme d'hyperlipidémies (tableau VIII).

	Classification de De Gennes (Classification clinique)	Classification de Frédérickson (Classification électrophorétique)	Biologie	Fréquence	Dépot lipidique extravasculaire	Complications coronariennes
Hypercholestérolémie	hypercholestérolémie essentielle (HEC)	II A (mineure)	cholestérol total entre 2,6 et 3,25 g/l Triglycérides normaux	très fréquente	arcs cornéens xanthélasmas pas de xanthomes tendineux	"tardives" (55 ans chez l'homme 65 ans chez la femme)
	xanthomatose tendineuse hypercholestérolémique	II A (hétérozygote)	cholestérol total jusqu'à 5 g/l et plus	fréquente (1 naissance sur 500)	arcs cornéens xanthélasmas xanthomes tendineux	précoces, (risque de 1er infarctus avant 30 ans et fréquente, 50% d'infarctus avant 50 ans
	xanthomatose cutanéo-tendineuse hypercholestérolémique familiale (X.C.T.H.F)	II A (homozygote)	cholestérol total entre 7 et 10 g/l	exceptionelle (1 naissance sur 1000000)	arcs cornéens xanthélasmas xanthomes tendineux et cutanés	très précoces (1er infarctus entre 4 et 15 ans)
Hyperlipidémie mixte et hypertriglycéridémie	hyperlipidémie mixte et hypertriglycéridémie mineure	II B (II + IV) et IV (mineure)	triglycérides à partir de 1,8 g/l(<10 g/l) Cholestérol normal ou augmenté	très fréquente	parfois avec arcs cornéens xanthélasmas sans xanthomes tendineux et cutanés	infarctus du myocarde fréquent avant 50 ans chez l'homme
	hyperlipidémie mixte avec broad β lipoprotéine	III	présence de broad β lipoprotéine anormale à l'électrophorèse	exceptionnelle	arcs cornéens xanthélasmas xanthomes tubéreux et plis palmaires	précoces et fréquentes
	hypertriglycéridémie majeure et hyperchylomicronémie	IV (endogène majeure) I (exogène) et V (endo et exogène)	triglycérides > 10 g/l cholestérol de 3 à 15 g/l chylomicrons dans I et V	rares (IV) exceptionnelle (I et V)	xanthomes éruptifs	absentes

TABLEAU VIII : CLASSIFICATION DES HYPERLIPIDEMIES. La plupart des hyperlipidémies rencontrées sont représentées par les hypercholestérolémies essentielles d'une part, et par les hyperlipidémies mixtes et les hypertriglycéridémies d'autre part. La xanthomatose familiale est la plus fréquente des maladies génétiques actuellement connues (d'après J.L. DE GENNES).

Parmi les hyperlipidémies essentielles, un sous-groupe se distingue sous le terme d'hypercholestérolémies, caractérisées par un même désordre biologique à savoir une augmentation des LDLs plasmatiques mais qui diffèrent cependant entre elles par l'intensité de leurs manifestations cliniques et biologiques. Cela va de la forme la moins grave à la forme la plus sévère.

La xanthomatose familiale est la plus fréquente des maladies génétiques actuellement connues (1/500 sous sa forme hétérozygote). Cependant, sa forme homozygote, la plus grave, nécessite des traitements spécifiques, longs et coûteux (6).

III.A.2. LES APOLIPOPROTEINES B

III.A.2.1 Structure des Apolipoprotéines B

L'Apolipoprotéine B est le composant majeur des LDLs. La structure primaire de l'Apolipoprotéine B a été déduite à partir de son ADNc, obtenu par 4 équipes indépendantes dès 1986 et fut confirmée par le séquençage direct, réalisé par YANG et Coll. en 1989 (160).

Le gène codant pour l'Apo B, localisé sur le chromosome 2, contient 43 kb dont 29 exons et 28 introns. Les exons 26 et 29 sont extrêmement longs et l'exon 26 est le plus grand exon recensé dans les gènes des mammifères(11) (figure 22).

L'Apolipoprotéine B existe sous deux isoformes : l'Apo B 48 et l'Apo B 100. Cette dénomination provient du fait qu'après révélation en SDS-P.A.G.E. l'Apo B 48 est caractérisé par une taille de 48 % inférieure à la taille de l'Apo B 100 (81).

L'Apo B 48 est une apoprotéine synthétisée au niveau de l'intestin, caractéristique des chylomicrons. Elle joue un rôle dans l'absorption intestinale des lipides alimentaires et dans l'assemblage des chylomicrons. Du fait d'un renouvellement très rapide des chylomicrons, la concentration plasmatique des Apo B 48 est très faible. Elle est d'environ 1/1000 par

rapport aux Apo B 100.

Ces deux protéines proviennent d'un même gène, situé sur le chromosome 2 et sont les produits de différentes modifications post-transcriptionnelles du mRNA de l'Apo B 100 (23) (figure 22).

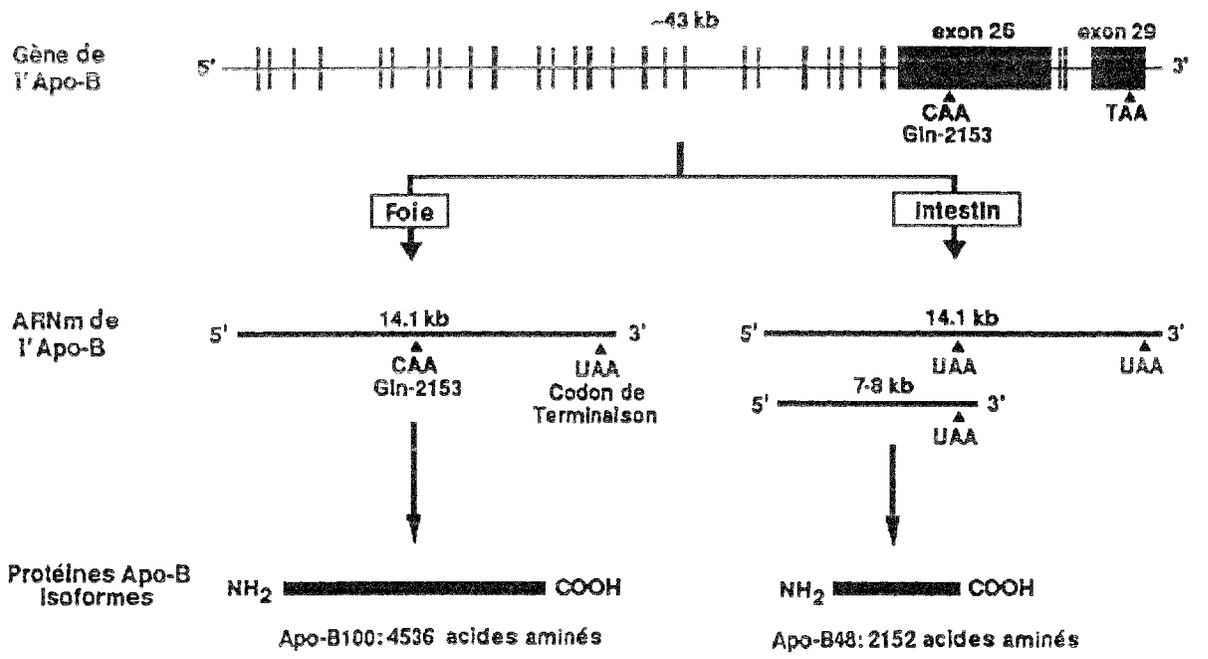


FIGURE 22 : STRUCTURE DU GENE DE L'APOLIPOPROTEINE B. Le gène de l'apoprotéine B est localisé sur le chromosome 2 et contient 43 Kb dont 29 exons et 28 introns. L'épissage différentiel du gène dans les cellules du foie et dans les cellules de l'intestin conduit à la maturation de 2 isoprotéines. L'Apo B 48 d'une part qui joue un rôle dans l'absorption des lipides alimentaires, et l'Apo B 100 d'autre part qui est la principale apoprotéine des LDLs. Alors que dans les cellules du foie, le codon 2153 code pour une glutamine (CAA), celui-ci est remplacé par un codon stop, de fin de transcription (UAA) dans les cellules de l'intestin (d'après YOUNG et Coll. 1990).

L'Apo B 100 est une glycoprotéine plasmatique de 4536 acides aminés dont 49 % de la masse est composée de carbohydrates liés à des résidus asparagine (147). Elle est constituée d'un peptide signal de 27 acides aminés hydrophobes et d'un enchaînement de 4536 acides aminés. Sa masse moléculaire est de 513 kDa et il y a une molécule d'Apo B par LDL. Au cours de sa maturation, l'Apo B a subi des modifications post-translationnelles par la formation de liaisons covalentes avec des acides gras (72).

De par le caractère fortement hydrophobe de l'Apo B, l'étude de sa structure tridimensionnelle reste difficile à réaliser et elle n'est pas encore totalement élucidée à l'heure actuelle (figure 23).

Sept régions possèdent une affinité pour l'héparine et sont à l'origine de la liaison des lipoprotéines riches en triglycérides avec les parois endothéliales (153).

L'Apo B contient 25 résidus cystéine, distribués de façon asymétrique. 16 d'entre eux forment des ponts disulfures, la majorité se situant dans la partie N terminale (160) (161).

Deux des résidus cystéine localisés dans la partie C terminale sont soupçonnés former des ponts disulfures avec l'Apo (a) pour former la lipoprotéine (a) (Lp a), qui est une lipoprotéine découverte en 1963 par K. BERG, très fortement athérogène (98) (128).

L'Apo B est constituée de plusieurs domaines hydrophobes répartis le long de sa séquence primaire capables de former des liaisons avec les lipides (109).

Neuf hélices de type amphipathique, de 22 Acides Aminés chacune, ont été mises en évidence et sont localisées dans la moitié C terminale. Ces hélices peuvent interagir avec les lipides et sont similaires à celles rencontrées dans les autres apolipoprotéines (84).

Cependant, à la différence des autres apolipoprotéines, l'Apo B possède en plus des feuillets ß répartis le long de sa séquence, et qui possèdent une forte affinité pour les lipides. Ceci explique en partie le fait que les Apo B ont la particularité de ne pas s'échanger entre les différentes lipoprotéines.

Le domaine qui interagit avec le récepteur à Apo B/E se situe dans la partie C terminale, entre les acides aminés 2980 et 3780 comme l'ont démontrés les travaux de MILNE et Coll. qui ont répertorié une trentaine d'anticorps monoclonaux reconnaissant cette région et dont la fixation inhibe la reconnaissance Apo B/récepteur (103). Les acides aminés participant au site de liaison des récepteurs ne sont pas encore élucidés mais il pourrait

s'agir d'acides aminés chargés positivement et qui interagiraient avec des acides aminés chargés négativement présents sur le récepteur à Apo B/E (125) (159).

Récemment, une mutation génétique sur l'acide aminé 3500, transformant une arginine en glutamine, a été mise en évidence par SORIA et Coll., inhibant la reconnaissance Apo B/récepteur et rendant défectueuse la fixation des LDLs par les récepteurs (133).

Cette mutation entraîne une hypercholestérolémie modérée décrite par VEGA et GRUNDY (148), et fut désignée sous le terme de "familial defective Apo B 100" par INNEARITY et Coll. (76).

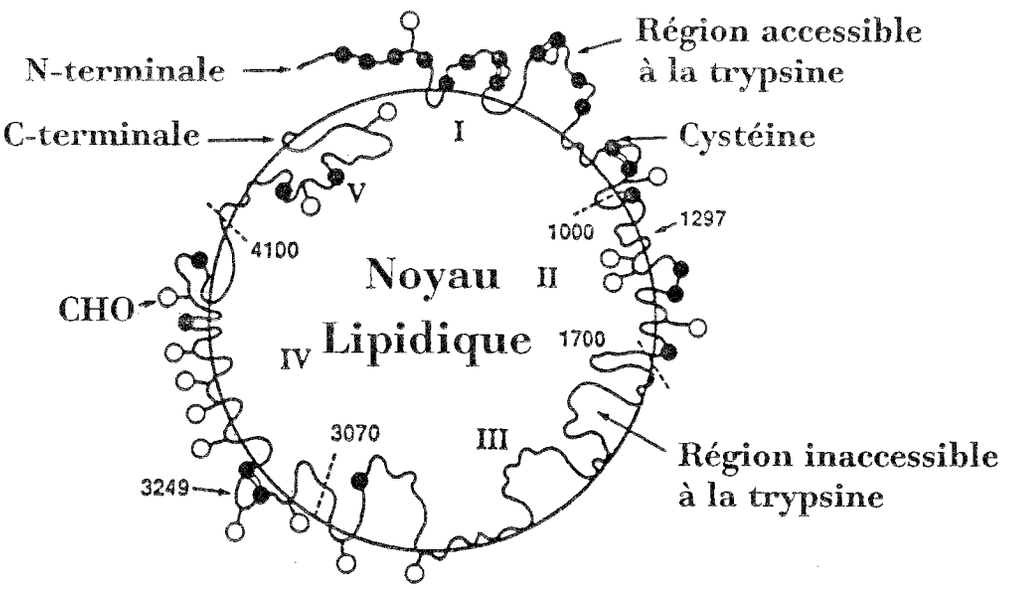


FIGURE 23 : STRUCTURE DE L'APOLIPOPROTEINE B 100. De par son caractère fortement hydrophobe, la structure tridimensionnelle de l'Apo B 100 n'est pas encore totalement élucidée à l'heure actuelle, 9 hélices de 22 AA chacune, mises en évidence dans la partie c-terminale, sont à l'origine des interactions avec les lipides. Des feuillets ß, répartis le long de sa séquence forment également des interactions avec les lipides. Le domaine interagissant avec le récepteur à Apo B/E se situerait entre les AA 2980 et 3780. Une étude de digestion à la trypsine réalisée par YANG et coll. en 1989, met en évidence cinq domaines plus ou moins hydrophobes. Les régions accessibles à la trypsine sont représentées à l'extérieur de la particule alors que les régions inaccessibles sont représentées à l'intérieur de la particule (d'après YOUG 1990).

III.A.2.2 Fonction des Apolipoprotéines B

De par son affinité vis-à-vis du récepteur cellulaire à Apo B/E, l'Apo B favorise l'internalisation cellulaire des LDLs en vue de leur métabolisation par la cellule. Cela a pour conséquence la diminution du cholestérol plasmatique et la régulation de la synthèse de cholestérol intracellulaire.

III.A.2.3 Synthèse et assemblage des LDLs

Celle-ci est réalisée dans les hépatocytes. C'est à l'intérieur de la cellule qu'est réalisée la synthèse des apolipoprotéines B puis leur assemblage avec les lipides, pour former des particules lipoprotéiques qui seront secrétées dans le milieu extracellulaire (13).

III.A.3. LE RECEPTEUR MEMBRANAIRE

III.A.3.1 Structure du récepteur

Le récepteur des LDLs fut purifié dès 1982 et son ADNc fut obtenu aussitôt après par RUSSEL et Coll. et YAMAMOTO et Coll.(125) (159). Son gène fut ensuite isolé et caractérisé en 1984 par SUDHOF et Coll.(139).

Le gène, localisé sur le bras court distal du chromosome 19, contient 45 kb et comprend 18 exons et 17 introns. La protéine est constituée d'un peptide signal de 21 acides aminés et d'une protéine mature de 839 acides aminés (figure 24).

7 séquences répétées de 40 acides aminés chacune, localisées dans la partie N terminale du récepteur, constituent le domaine de liaison aux apoprotéines B et E. Chacune de ces séquences contient 6 résidus cystéine qui forment 3 ponts disulfures intra-séquence. La partie C terminale de ces séquences contient une série de 3 acides aminés chargés négativement, Ser, Asp et Glu qui sont importants pour la fixation des Apo B et E.

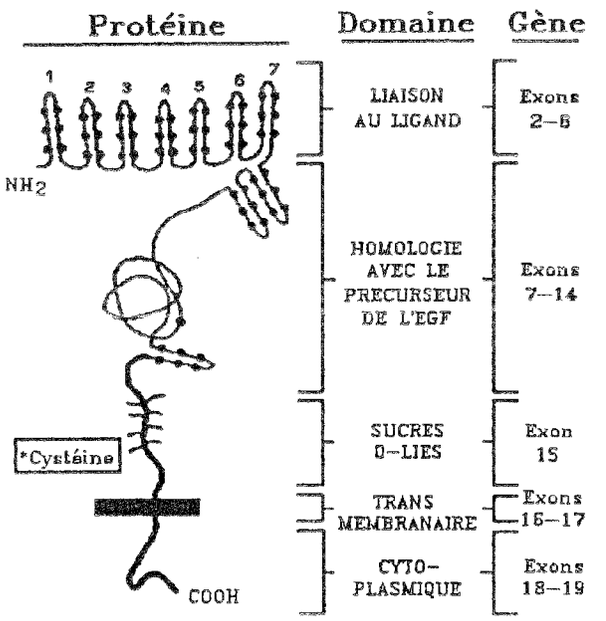


FIGURE 24 : STRUCTURE DU RECEPTEUR DES LDLS ET ORGANISATION DU GENE. La protéine mature de 839 acides aminés est représentée avec ses différents domaines fonctionnels codés par 18 exons. L'exon 1 qui code pour la séquence signale de 21 acides aminés n'est pas représenté ici. Celle ci est coupée de la protéine lors de sa maturation dans le réticulum endoplasmique (d'après HOBBS et coll. 1990).

III.A.3.2 Fonction du récepteur

C'est en 1973 que BROWN et GOLDSTEIN ont mis en évidence le rôle joué par les récepteurs à Apo B/E dans le métabolisme du LDL-cholestérol (19).

Ce travail constitua l'une des étapes importantes dans l'élucidation des mécanismes qui dirigent l'endocytose cellulaire, c'est-à-dire la capacité qu'ont les cellules de pouvoir capter puis d'intégrer de nombreuses substances extracellulaires nécessaires à leur développement.

Ce mécanisme d'internalisation cellulaire, par l'intermédiaire de récepteurs de surface, est l'un des plus étudiés et l'un des mieux connus à l'heure actuelle. Il constitue un modèle général par lequel toute cellule peut capter une infinité de macromolécules pour peu qu'elle possède le récepteur spécifique (figure 25).

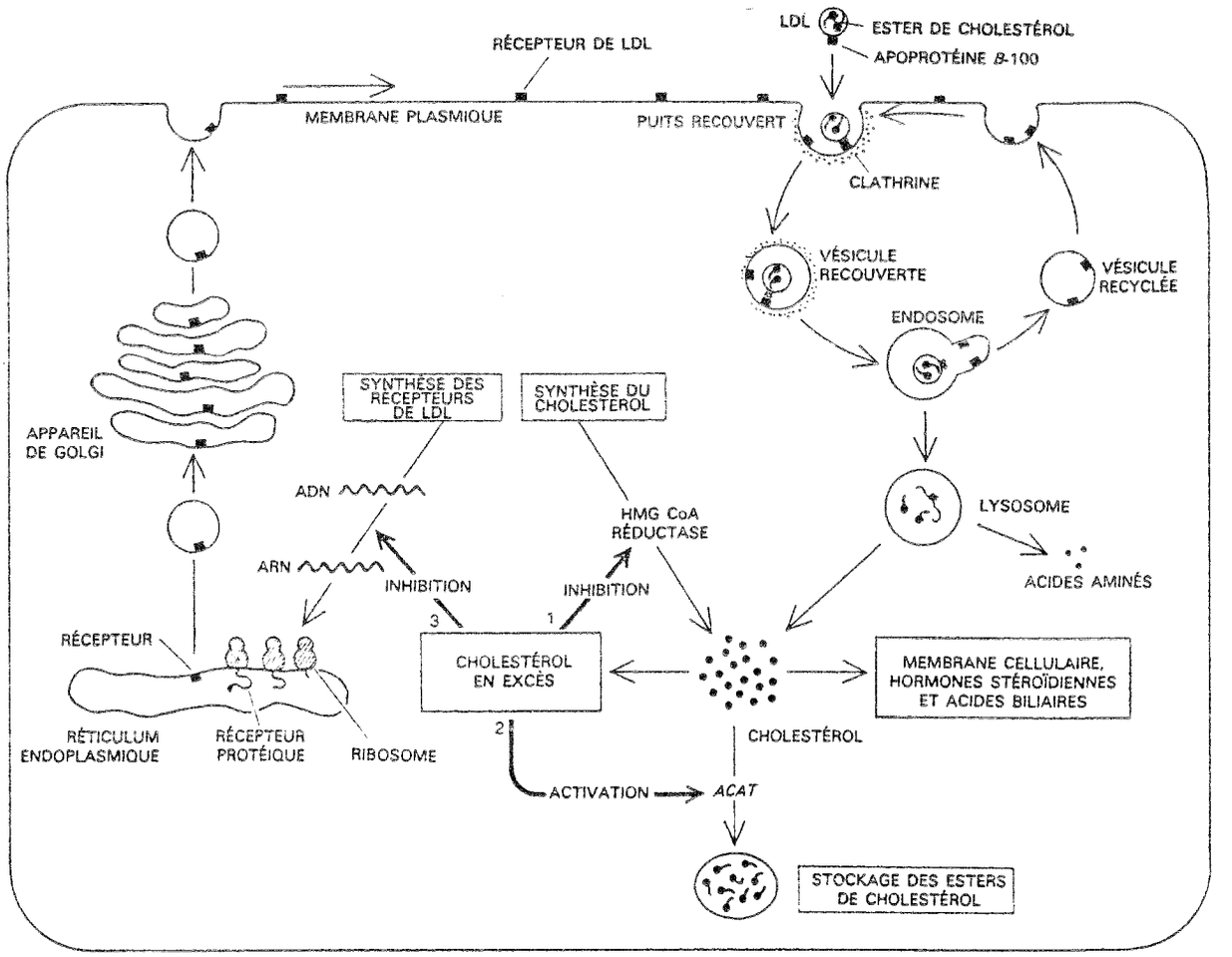


FIGURE 25 : INTERNALISATION CELLULAIRE DU LDL-CHOLESTEROL. Ce mécanisme de captation des LDLs par le récepteur à Apo B/E constitue un modèle d'endocytose cellulaire. Les LDLs vont se lier aux récepteurs à Apo B/E au niveau d'une invagination cellulaire constituée de clathrine, pour former une vésicule mantelée. Cette vésicule va fusionner avec un lysosome primaire pour libérer le cholestérol exogène à l'intérieur de la cellule. Le métabolisme du cholestérol étant étroitement contrôlé par la cellule, un surplus de cholestérol va entraîner une diminution de la synthèse endogène (1), une activation de l'estérification du cholestérol (2), et une inhibition de la synthèse des récepteurs à Apo B/E (3) (d'après BROWN et GOLDSTEIN 1985).

Le mécanisme d'action est le suivant : les récepteurs de surface vont se regrouper dans une région spécialisée de la cellule où la membrane cellulaire forme une invagination en forme de puits mantelés. Cette invagination particulière de la membrane est due à une protéine spécifique appelée clathrine, située sous la membrane et qui s'organise en réseaux permettant la formation de vésicules. Dès que la surface des récepteurs est recouverte par

les LDLs, les puits mantelés vont se transformer en vésicules mantelées. Les LDLs sont alors transportées à l'intérieur de la cellule. Les vésicules vont fusionner avec des lysosomes primaires pour donner des lysosomes secondaires. En milieu acide, les LDLs vont se dissocier des récepteurs et sous l'action des enzymes, les LDLs seront catabolisées en acides aminés. Les esters de cholestérol seront hydrolysés pour fournir du cholestérol libre à la cellule. Une libération de cholestérol exogène à l'intérieur de la cellule va entraîner par un phénomène de rétroaction un effet triple à savoir, une diminution de la synthèse endogène du cholestérol, une diminution de la synthèse des récepteurs à LDL et une activation du stockage du cholestérol sous forme estérifiée.

Ainsi, le récepteur des LDLs apparaît donc comme un véritable épurateur du cholestérol extracellulaire et un puissant régulateur du métabolisme du cholestérol intracellulaire.

La fonction principale des récepteurs à Apo B/E est de subvenir aux besoins de la cellule en cholestérol. Cependant, cette fonction est régulée et lors d'un apport alimentaire trop riche en cholestérol, la cellule va se prémunir en diminuant la synthèse de ses récepteurs.

Cette protection va se faire au détriment de la circulation générale qui va se surcharger en LDL-cholestérol (figure 26).

Un deuxième mécanisme de régulation va alors se mettre en marche par l'intermédiaire des récepteurs à Apo B/E des macrophages. En effet, ceux-ci vont avoir, pour fonction secondaire, l'épuration des LDLs excédentaires qui se sont déposées le long des parois vasculaires. C'est ce mécanisme d'épuration de secours qui sera l'un des facteurs à l'origine du développement de l'artériosclérose.

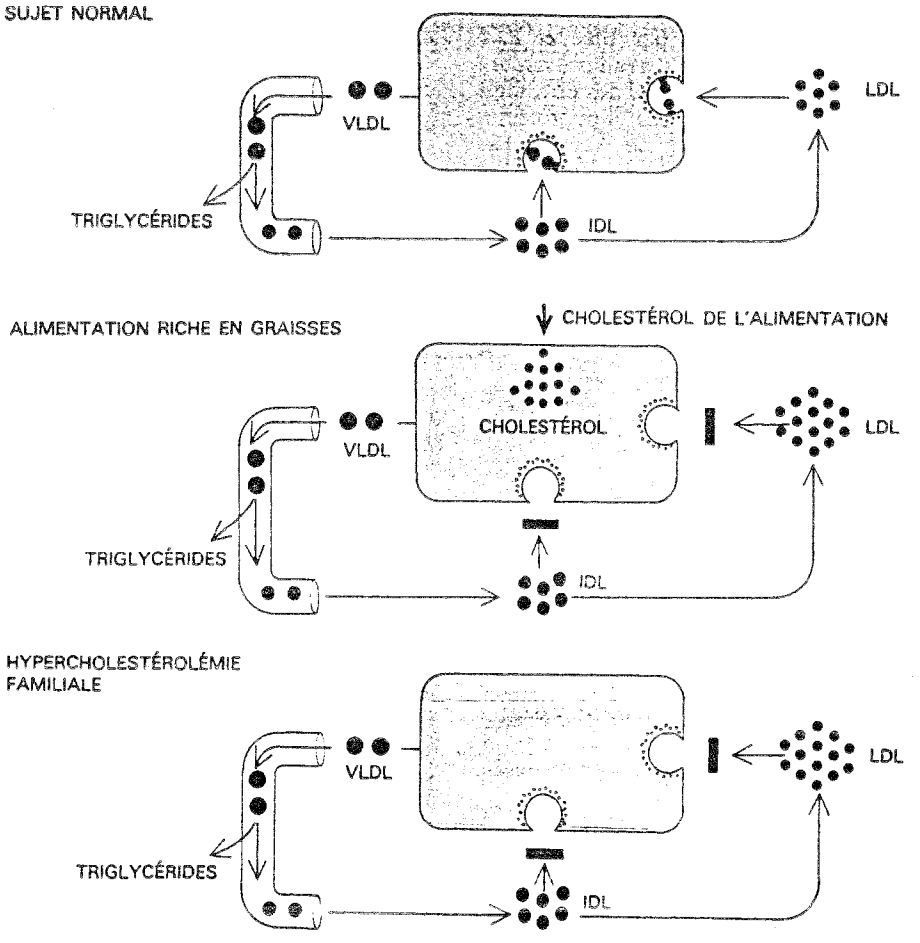


FIGURE 26 : DEFICIENCE DES RECEPTEURS A APO B/E. Les VLDLs secrétées par le foie dans la circulation générale sont converties en IDLs par les tissus musculaires et adipeux. Dans la population saine, la moitié des IDLs est recyclée au niveau du foie et l'autre moitié est convertie en LDLs (1). Un régime riche en cholestérol va provoquer une diminution des récepteurs à apo B/E (2). Dans l'hypercholestérolémie familiale, c'est une défection génétique qui va provoquer la diminution des récepteurs à apo B/E (3). Dans ces deux derniers cas, les conséquences seront identiques, les IDLs non captées par le foie seront converties en LDLs et celles-ci vont s'accumuler dans la circulation générale (d'après BROWN et GOLDSTEIN 1985).

III.A.4. PATHOLOGIES LIEES AU RECEPTEUR A APO B/E ET HYPER-CHOLESTEROLEMIE

Différentes mutations du gène codant pour le récepteur sont à l'origine de l'hypercholestérolémie familiale, une maladie commune qui affecte une personne sur 500.

Dans la forme hétérozygote, les individus n'expriment que la moitié des récepteurs, ce qui engendre une élévation d'un facteur 2 du taux de LDL-cholestérol plasmatique soit 3 à 5 g/l. Cet excès de LDL-cholestérol va se déposer préférentiellement dans les tendons et les parois artérielles entraînant la formation de xanthomes tendineux et de plaques d'athérome.

Dans la forme homozygote, qui est plus rare, une personne sur 1 million, la mutation intervient sur les 2 gènes à la fois. Cette mutation peut être identique sur les 2 gènes (homozygote vrai) ou différente (hétérozygote double). Cette mutation qui entraîne un retard dans la captation des LDLs, conduit non seulement à une accumulation des LDLs dans le plasma mais elle provoque également l'augmentation de la synthèse des LDLs car la diminution de l'activité des récepteurs entraîne, par un mécanisme de rétro-action, l'augmentation du métabolisme des IDLs et des VLDLs en LDLs (figure 26).

Dans les deux cas, l'individu exprime peu ou pas les récepteurs et la concentration en LDLs augmente rapidement (de 6 à 12 g/l), entraînant des xanthomes cutanéo-tendineux dès l'âge de 4 ans et la mort par infarctus cardiaque avant l'âge de 20 ans.

Plus de 150 mutants différents ont été répertoriés sur le gène du récepteur à Apo B/E (65). Ils peuvent être classés en 5 catégories d'après leurs effets phénotypiques sur la protéine, à savoir un blocage au niveau de la synthèse du récepteur (15 %), au niveau du transport vers l'appareil de Golgi (53 %), au niveau de la liaison avec le ligand (25 %), voire au niveau de la formation des vésicules à clathrine et du recyclage dans les endosomes (figure 27).

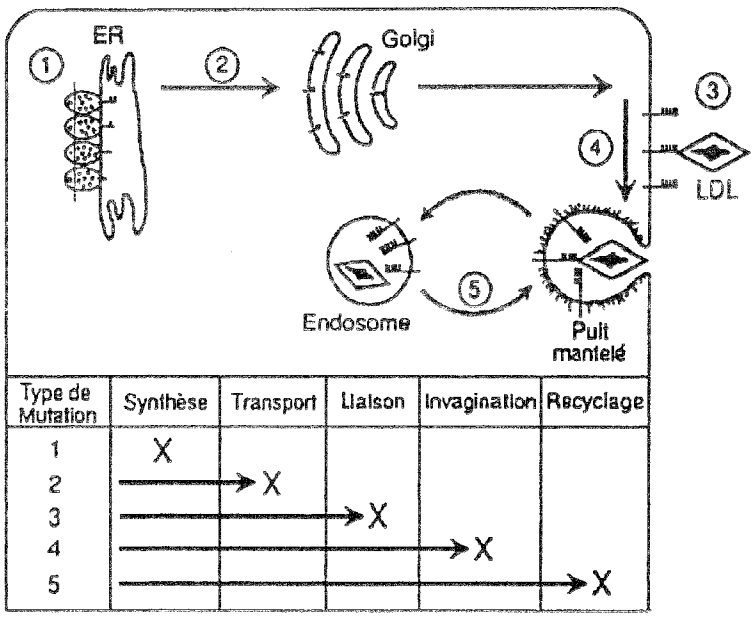


FIGURE 27 : CLASSIFICATION DES MUTATIONS DU GENE DU RECEPTEUR A APO B/E. Dans l'hypercholestérolémie familiale, la mutation peut intervenir à cinq niveaux différents à savoir la synthèse du récepteur (1), le transport vers l'appareil de Golgi (2), la liaison avec le ligand (3), la formation des vésicules à clathrine (4), et le recyclage dans les endosomes (5). Chacune de ces classes est hétérogène au niveau de l'ADN (d'après HOBBS et Coll. 1990).

Les manifestations cliniques de l'hypercholestérolémie familiale homozygote varient suivant le type de la mutation observée (taux du LDL-cholestérol, sévérité de l'artériosclérose). Elles varient également au sein d'une même mutation, ce qui implique un rôle également important joué par d'autres gènes.

Une autre source de variabilité provient du fait que, suivant le type de mutation observée, qui modifie l'affinité du récepteur pour ses ligands Apo B et Apo E, l'affection se porte soit sur le métabolisme des LDLs seules soit sur le métabolisme des LDLs plus IDLs. Dans ce dernier cas, l'affection est plus sévère car il y a non seulement diminution dans la vitesse d'élimination des LDLs mais de plus, il y a surproduction des LDLs.

L'une des conséquences majeures de l'élévation du taux de LDL dans le sang est le développement de l'artériosclérose. Un des mécanismes proposé pour expliquer la formation de plaques d'athérome a été décrit par ROSS et

GLOMSET (123) (figure 28). De plus, il a été démontré que le traitement thérapeutique visant à corriger le taux de LDLs dans le sang entraînait à long terme une régression de la plaque d'athérome (67)(108).

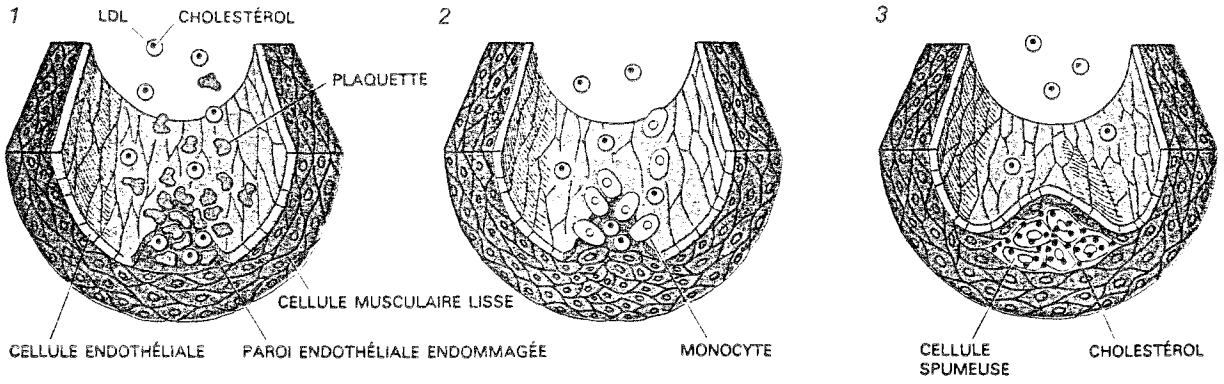


FIGURE 28 : FORMATION DE LA PLAQUE D'ATHEROME. Une lésion occasionnée à la couche fine des cellules endothéliales des parois artérielles est à l'origine de la plaque d'athérome. La brèche ainsi ouverte est pénétrée par les LDLs et les plaquettes sanguines (1). En réponse aux facteurs de croissances libérés par les plaquettes, les cellules musculaires de la paroi endothéliale vont se multiplier et migrer au niveau de la zone lésée (2). En parallèle, les macrophages seront activés au niveau de la brèche et vont absorber les LDLs pour se transformer en cellules spumeuses. Un excès de LDLs va provoquer une accumulation du cholestérol dans et autour de ces cellules spumeuses, et c'est cet amas de cellules, de cholestérol et de débris cellulaires qui va constituer la plaque d'athérome (3) (d'après BROWN et GOLDSTEIN 1985).

III.A.5. TRAITEMENT THERAPEUTIQUE

Le traitement de l'hypercholestérolémie familiale homozygote consiste à normaliser le taux de cholestérol sanguin dans le but de prévenir ou de retarder les manifestations cliniques de la maladie à savoir, la formation de xanthomes cutanéo-tendineux et la formation d'athéromes cardio-vasculaires. Un dépistage orienté systématique revêt également une importance primordiale. En effet, plus la maladie sera dépistée et traitée précocement, plus les chances d'allonger l'espérance de vie seront grandes.

III.A.5.1 Traitements à base de médicaments

Différents traitements de l'hypercholestérolémie familiale ont été mis au point en fonction de la sévérité de la maladie. En premier lieu, un traitement diététique est appliqué afin de corriger l'excès pondéral de cholestérol alimentaire si nécessaire. Cependant, ce traitement à lui seul ne suffit pas.

Dans le cas des hypercholestérolémies familiales hétérozygotes (3 à 6 g/l), un traitement à base de médicaments est utilisé. Pour ce faire, différents produits ont été sélectionnés en fonction de leur spécificité. Citons parmi les plus couramment utilisés :

Les résines (Colestyramine, Colestipol), qui permettent de séquestrer les acides biliaires par formation de complexes insolubles, bloquant leur retour dans la circulation générale (38).

Les fibrates de deuxième génération (Fémofibrate, Benzafibrate, Ciprofibrate, Gemfibrozil), qui dérivent de l'acide Chlorophenoxy-isobutyrique, et dont l'action thérapeutique est triple à savoir la diminution de la sécrétion hépatique des VLDLs, la diminution de l'activité HMGCoA-réductase et l'augmentation de l'activité lipoprotéine-lipase. Cela se traduit par une baisse des LDLs d'environ 30 % (124). Parmi les autres produits efficaces, citons le Probucol, permettant une réduction de 16 à 18 % du Cholestérol total (HDL+LDL).

Les inhibiteurs de l'HMGCoA-réductase (Compactine, Mevinoline, Synvinoline, Lovastatine), qui sont des effecteurs s'opposant à la synthèse endocellulaire du cholestérol par inhibition compétitive. Ces différents produits permettent alors l'abaissement du taux de cholestérol d'environ 35 % par augmentation de la synthèse des récepteurs cellulaires (75). En association avec d'autres médicaments, ces différents produits permettent même d'entrainer la régression des lésions athéromateuses (17) (29).

III.A.5.2 Traitements chirurgicaux

Dans les formes sévères d'hypercholestérolémie homozygote, voire hétérozygote résistant (6 à 12 g/l), des traitements plus drastiques ont été appliqués afin d'abaisser de façon significative le taux de cholestérol. La dérivation biliaire et le shunt iléal sont deux techniques chirurgicales qui permettent l'augmentation du catabolisme des acides biliaires (22). L'anastomose portocave, quant à elle, a pour objectif la dérivation des hormones pancréatiques (135). Cependant, ces techniques ont une portée limitée car leurs effets sont atténués au bout de plusieurs années. Aussi elles ont tendance à disparaître au profit des échanges plasmatiques. Reste toutefois la transplantation hépatique, qui est une valeur sûre car elle permet avec l'organe greffé de corriger le taux de LDL-cholestérol par un apport suffisant en récepteurs à LDL mais elle est également limitée de part la disponibilité des donneurs compatibles (10) (24).

III.A.5.3 Traitements par échange plasmatique

Les échanges plasmatiques sont pratiqués dans les formes sévères de l'hypercholestérolémie familiale depuis le début des années 80 (142). Ils consistent à substituer une partie du plasma hypercholestérolémique des patients par une solution d'albumine isotonique. Pour cela, un appareillage hautement spécifique a été conçu, permettant de réaliser de façon automatique des plasmaphérèses en milieu hospitalier. Cet appareillage, désigné sous le terme de machine à plasmaphérèse, réalise en flux continu le prélèvement sanguin, la séparation du plasma et la réinjection des cellules sanguines, en présence d'une solution isotonique de substitution afin de préserver la volémie du sujet. Cependant, l'inconvénient majeur de ce type

de traitement réside dans l'utilisation répétée de solutions isotoniques de substitution à base d'albumine humaine qui peuvent devenir antigéniques à long terme.

III.A.5.4 Traitements par épuration sélective

Non spécifiques dans un premier temps (50), les plasmaphérèses ont été affinées avec la mise au point de nouvelles techniques d'épurations sélectives, basées sur le traitement du plasma en circulation extracorporelle, permettant de ne soustraire que le LDL-cholestérol puis de réinjecter au patient son propre plasma. Le principe en est simple, et différentes solutions ont été envisagées pour traiter le plasma après séparation des cellules sanguines (figure 29).

III.A.5.4.a Traitements physiques du plasma

Parmi les traitements physiques mis au point en vue de l'élimination des LDLs du plasma, citons le traitement par double filtration (68), le traitement par thermofiltration (140), et le traitement par précipitation en présence d'héparine (39). L'inconvénient de ces traitements est qu'ils sont drastiques et peu sélectifs (157).

III.A.5.4.b Traitements chromatographiques

De même que la chromatographie est une technique de choix pour la purification de protéines à partir d'un milieu complexe, elle l'est également pour l'élimination de protéines indésirables dans ce même milieu. Dans un cas, c'est la fraction adsorbée qui est récupérée, dans l'autre cas, c'est la fraction non adsorbée qui est récupérée. Ainsi, dans le but d'éliminer les LDLs du plasma, différents supports chromatographiques ont été utilisés avec une affinité plus ou moins sélective. Citons l'héparine Agarose (91), le sulfate de dextran Cellulose (92) (162) et enfin des matrices de Sepharose couplées à des anticorps polyclonaux (127) (137), ou monoclonaux (121) (145).

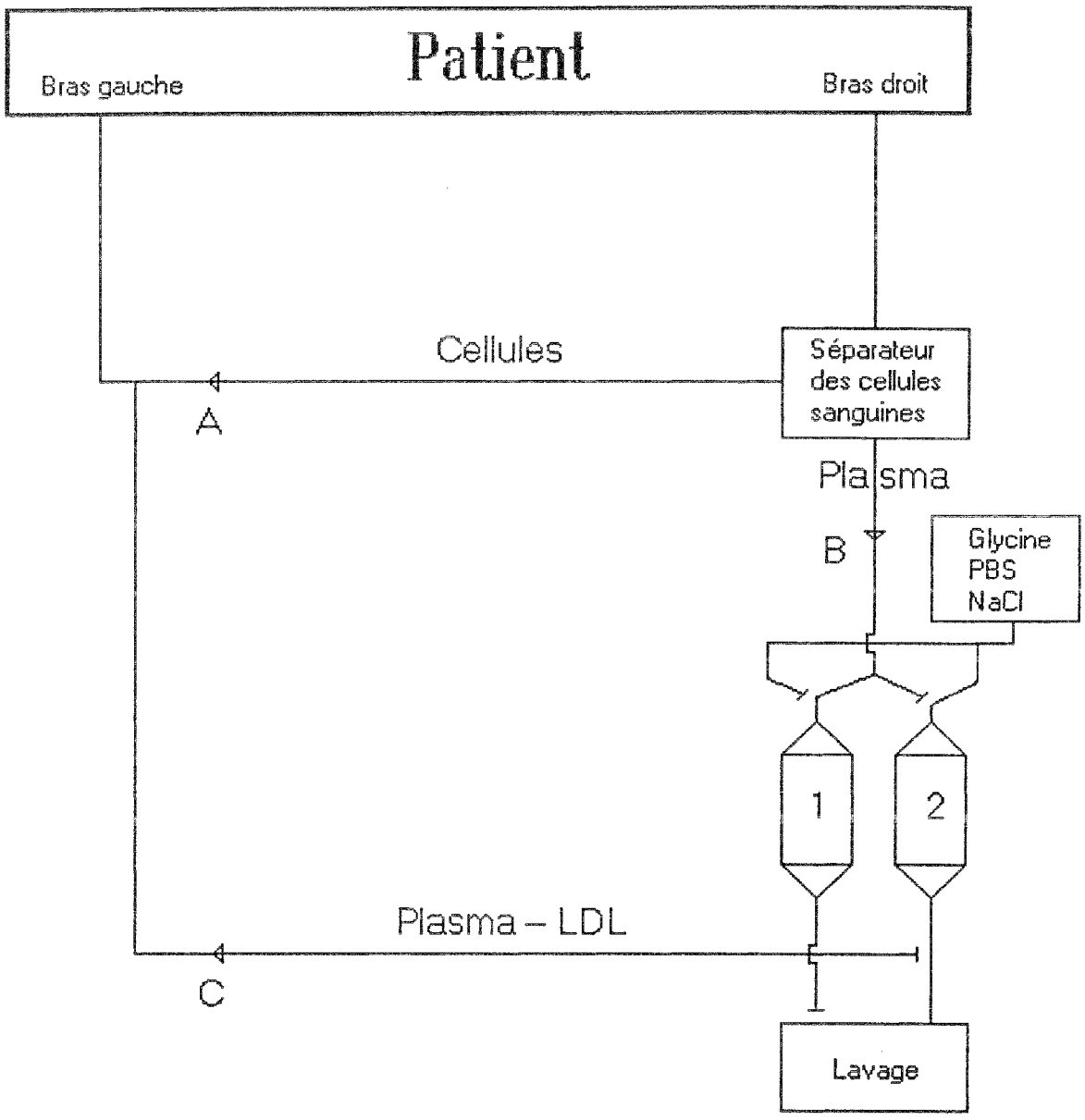


FIGURE 29 : ELIMINATION DU LDL-CHOLESTEROL EN CIRCULATION EXTRACORPORELLE. Dans un premier temps, le sang du patient est prélevé par plasmaphérèse où les cellules sanguines sont séparées du plasma pour retourner au patient (A). Dans un second temps, le plasma est traité de manière à éliminer sélectivement le LDL-cholestérol (B). Le plasma ainsi épuré est ensuite réinjecté au patient (C). Dans cette exemple, l'élimination du LDL-cholestérol est réalisé par adsorption spécifique des apolipoprotéines B sur support chromatographique contenant des anticorps polyclonaux (d'après BORBERG et Coll. 1983).

III.A.6. OBJECTIF DE NOTRE TRAVAIL

Nous nous proposons dans le cadre d'un accord entre différents partenaires, de développer sur le plan national une technique d'immunoépuration du LDL-cholestérol par l'utilisation d'anticorps polyclonaux de chèvre en circulation extracorporelle.

Cette technique, encore peu répandue sur le plan international, fut mise au point et optimisée en laboratoire lors d'un précédent travail (119) (120). Ces travaux se sont basés sur le choix de l'anticorps, le choix de la matrice, la géométrie du support ainsi que les conditions de préparation.

Le choix de cette technique a été dicté en raison des résultats prometteurs obtenus avec ce type de support dans l'immunoépuration du LDL-cholestérol. Des essais comparatifs, réalisés en collaboration avec le centre de recherche cardiologique de Moscou sur l'évaluation de la sélectivité des principales matrices disponibles sur le marché, confirment la raison de ce choix (1)(112).

Aussi après avoir défini un cahier des charges, ce travail a été transposé à l'échelle pilote, afin de démontrer sa faisabilité au stade industriel. Ce travail s'est articulé autour de deux idées, d'une part la purification à l'échelle pilote d'anticorps polyclonaux anti apolipoprotéine B à partir de plasmas de chèvres immunisées et d'autre part, la fabrication en série de supports chromatographiques destinés à l'immunoépuration des LDLs du plasma de patients hypercholestérolémiques.

La purification des anticorps est réalisée par chromatographie d'affinité sur une colonne de LDLs immobilisées sur Sepharose CL-4B. Ces anticorps sont ensuite filtrés stérilement puis couplés dans des conditions strictes de stérilité et d'apyrogénicité à du Sepharose CL-4B. L'immunoadsorbant ainsi préparé est ensuite conditionné dans des colonnes d'immunoépuration à raison de 300 ml de gel par colonne.

Une première série de cinq colonnes ainsi préparées sera réservée à l'expérimentation *in vivo* chez l'animal et *ex vivo* chez l'homme afin de valider le procédé. L'optimisation des différentes étapes de production à l'échelle pilote permettra d'envisager un passage au stade industriel.

III.B. MATERIELS ET METHODES

III.B.1. TECHNIQUES PREPARATIVES

III.B.1.1 Sélectivité d'épuration des immunoadsorbants

Dans le cadre d'une étude comparative, différents immunoadsorbants, permettant l'épuration du LDL-cholestérol, ont été testés en parallèle. Ont été sélectionnés pour cette étude, de l'héparine-Sepharose, du sulfate de dextran-cellulose et du Sepharose CL-4B couplé à des anticorps polyclonaux de chèvre, des anticorps polyclonaux de mouton, et des anticorps monoclonaux de souris. Ont été joints à ce panel d'adsorbants, deux matrices témoins neutres, à savoir, le Sepharose CL-4B et la cellulose non activés.

Des colonnes de 5 ml de chacun de ces différents gels sont préparées, puis 30 ml de plasma frais, provenant de plasmaphérèse de donneurs sains, sont passés sur ces différents supports à un débit de 30 ml/h.

Ces différentes colonnes sont ensuite soumises à élution selon le protocole propre à chacune d'entre elles à savoir: NaCl 0,7 M en PBS pour l'héparine-Sepharose, pour le sulfate de dextran-cellulose et pour le témoin cellulose. Glycine 0,2 M, NaCl 0,15 M, pH 3 pour le monoclonal de souris-Sepharose, glycine 0,3 M, pH 2,8 pour le polyclonal de chèvre-Sepharose et enfin, glycine 0,2 M, NaCl 0,15 M, pH 2,5 pour le polyclonal de mouton-Sepharose ainsi que pour le témoin Sepharose. Pour chacun des supports, le plasma est recueilli en tenant compte du volume mort et de l'effet de dilution, et l'éluat est récupéré pour toutes les fractions de densité optique supérieure à 0,1. L'expérience est réalisée en parallèle sur les sept colonnes avec le même plasma et elle est répétée cinq fois avec cinq plasmas différents. Plusieurs paramètres biologiques sont contrôlés au cours de ces épurations. Sont dosés sur les plasmas et les différentes fractions éluées, les protéines totales, les triglycérides, le cholestérol total, le LDL-cholestérol, le HDL-cholestérol, les Apolipoprotéines B et les Apolipoprotéines A. Sont dosés en plus sur les plasmas, la fibronectine, les facteurs du complément C3a,

C5a, les facteurs de la coagulation I, II, V, VII, VIII, IX, et X, l'AT III et les protéines C et S. Les protéines totales, la fibronectine et les Apolipoprotéines B sont dosées par notre propre laboratoire. Les autres protéines sont dosées par des laboratoires spécialisés de biochimie et d'hémostase.

III.B.1.2 Purification des anticorps anti Apo B

La préparation à l'échelle pilote de colonnes destinées à l'immunoépuration du LDL-cholestérol a nécessité l'élaboration d'un cahier des charges dans lequel ont été assignées et détaillées toutes les procédures relatives aux différentes étapes constituant le processus de fabrication envisagé, ainsi que les matériels utilisés.

Les anticorps polyclonaux anti Apo B proviennent de plasmas de chèvres immunisées par la société Sébia (Issy les Moulineaux, France). Ces plasmas sont prélevés stérilement dans des poches citratées à 9 ‰, puis ces plasmas sont congelés et stockés à -30°C en vue de leur purification.

La purification des anticorps est réalisée par chromatographie d'affinité sur une colonne Amicon G 90 contenant 2 litres de Sepharose CL-4B/Apolipoprotéine B. Après équilibration de la colonne par une solution de phosphate de sodium 0,01 M, NaCl 0,15 M, pH 7,2, le plasma est déposé sur la colonne à un débit de 30 ml/min puis la colonne est rincée à un débit de 60 ml/min par la solution d'équilibration jusqu'à élimination complète des protéines non fixées (opération contrôlée par densité optique). Les anticorps sont ensuite élués par une solution de glycine 0,3 M pH 2,8 à un débit de 60 ml/min. La colonne est rééquilibrée en tampon phosphate puis stockée en présence d'éthanol 20 %. La solution d'anticorps est neutralisée à pH 7,2 par une solution de NaOH 1 N, puis elle est stockée en présence d'azide de sodium à 1 g/l.

III.B.1.3 Diafiltration des anticorps

Plusieurs lots d'anticorps immunopurifiés et stockés sont mélangés afin d'obtenir 2 ou 4 grammes d'anticorps, soit l'équivalent de 300 ou 600 ml d'immunoadsorbant à préparer.

Parallèlement, un module d'ultrafiltration à cassettes Pellicon (Millipore), stocké en formol 1 %, est rincé abondamment avec de l'eau PPI pendant une heure environ jusqu'à élimination complète du formol. Un prélèvement en sortie de filtrat est effectué sur lequel est réalisé un contrôle au réactif de Schiff. Un test au Limulus est également effectué afin de s'assurer de la non contamination des cassettes. Ces cassettes, au nombre de trois, présentent une surface totale d'ultrafiltration de 1,395 m^2, avec un seuil de coupure de 100.000 Da.

III.B.1.3.a Concentration des anticorps

Une fois le module prêt, la solution d'anticorps est concentrée à un débit de concentration de 15 l/h jusqu'à un taux final de 6 g/l. Ce taux est contrôlé par dosage spectrophotométrique à 280 nm. Cela correspond environ à une concentration de la solution par un facteur quinze.

III.B.1.3.b Dialyse des anticorps

Ensuite, la solution d'anticorps est dialysée contre une solution de carbonate de sodium, pH 8,5, en utilisant le même procédé. Pour cela, la solution d'anticorps est diluée avec dix volumes de carbonate et concentrée à 6 g/l puis l'opération est répétée une deuxième fois. La remontée du pH à 8,5 est suivie et la concentration finale en anticorps qui doit être supérieure ou égale à 6 g/l est dosée.

III.B.1.3.c Conservation des anticorps

Lorsque la dialyse est terminée, la solution d'anticorps est filtrée stérilement sur un filtre 0,22 µm et est stockée à 4°C.

Parallèlement, le module d'ultrafiltration est remis sous formol à 1% après un rinçage abondant des cassettes en eau PPI pendant une heure environ, puis nettoyage des cassettes avec une solution de Javel à 2 % pendant 30 min et rinçage abondant des cassettes pendant une heure en eau PPI.

III.B.1.4 Couplage sur Sepharose CL-4B

Cette étape est réalisée selon la méthode de CUATRECASAS (28), dans un réacteur clos et stérile prévu à cet effet. Deux personnes sont nécessaires pour réaliser cette opération afin de ne pas contaminer les différents éléments lors de l'assemblage du réacteur stérile d'une part, et lors du couplage proprement dit d'autre part. Une fois monté sous une hotte à flux laminaire, le réacteur est manipulé à coté de la hotte, l'entrée/ sortie étant raccordée aux flacons de solutions qui sont installées sous la hotte durant toute l'opération.

Avant de démarrer le couplage, l'électrode à pH est étalonnée au sein du réacteur avec une solution de PBS, pH 7,2.

Une fois l'électrode étalonnée, le gel est introduit stérilement dans le réacteur à l'aide d'une pompe péristaltique.

Le gel est ensuite essoré en actionnant la pompe à vide raccordée en aval du réacteur. Un volume V, équivalent au volume de gel, d'eau PPI est alors introduit et l'ensemble est agité pendant 10 min afin de remettre le gel en suspension dans le réacteur. Cette opération de lavage est répétée quatre fois.

En parallèle et sous une hotte aspirante, un volume V de la solution d'activation au bromure de cyanogène est préparé en faisant dissoudre pendant une heure maximum et sous agitation rapide, 100 mg de BrCN par ml d'eau PPI dans un flacon stérile. La petite ampoule à couler du réacteur est remplie avec de la soude 10 N. Après les quatre lavages du Sepharose en eau PPI, la solution de bromure est filtrée sur 40 µm puis elle est versée rapidement dans la grande ampoule à couler.

A l'aide du robinet de l'ampoule à couler, le bromure est versé rapidement dans le réacteur, puis le gel est mis en agitation et le pH est ajusté et maintenu entre 10 et 11 avec la soude 10 N.

Dès la stabilisation du pH au bout de 10 min environ, le Sepharose activé est lavé quatre fois 5 min avec deux volumes V de carbonate, pH 8,5 pour éliminer l'excès de BrCN.

La solution d'anticorps est introduite à raison d'un volume V puis elle est mise à incuber sous agitation lente pendant une nuit à température ambiante.

L'excédent d'anticorps est récupéré en vue de son dosage et le gel est lavé ensuite cinq fois 15 min avec un volume V d'une solution de carbonate pH 8,5. Ces fractions de lavage sont également récupérées en vue du dosage des anticorps.

Un volume V d'éthanolamine pH 8 est introduit afin de saturer les sites de liaison et l'ensemble est laissé incuber pendant deux heures sous agitation lente.

L'excédent d'éthanolamine est éliminé, ainsi que les protéines résiduelles fixées par des liaisons électrostatiques, par lavage du gel avec une solution de glycine 0,3 M pH 2,8. Six lavages successifs de 10 min chacun sont effectués pour abaisser le pH à 2,8 dans le réacteur.

Six lavages de 10 min chacun d'une solution de PBS, pH 7,2, sont effectués ensuite afin d'assurer la neutralisation du pH.

-Stockage du gel

Le gel est remis en suspension avec un volume V d'eau PPI à 20 % d'éthanol, puis le gel est récupéré dans un flacon stérile.

En fin de manipulation, le réacteur est entièrement démonté afin d'être lavé à l'aide d'une solution détergente, puis rincé abondamment et séché pour être conditionné en vue d'une nouvelle stérilisation.

III.B.1.5 Conditionnement stérile en colonnes

Deux personnes sont également nécessaires à la réalisation du montage et du remplissage des colonnes destinées à l'immunoépuration afin de préserver les conditions de stérilité et d'apyrogénicité.

Les éléments qui composent la colonne, à savoir les raccords et Luers

Lock sont assemblés sous une hotte stérile dans un ordre précis, puis la colonne est installée sur un support sous une hotte à flux laminaire.

Dans un premier temps, la colonne est remplie avec une solution d'éthanol à 20 %.

Dans un deuxième temps, le gel est remis en suspension puis il est pompé par l'entrée latérale à raison de 300 ± 30 ml.

Une fois coulé, le gel est lavé avec environ cinq volumes de colonne en PBS stérile et apyrogène. En fin de lavage, un prélèvement d'environ 100 ml est effectué en sortie de colonne en prévision des contrôles, puis la colonne est remise en éthanol 20% par passage de deux volumes de colonne.

En fin de remplissage, la colonne est verrouillée avec des bouchons Luers Lock, puis elle est conditionnée en position verticale et stockée à 4°C.

III.B.1.6 Contrôles

III.B.1.6.a Sécurité des gels préparés en réacteur

Le contrôle de la stérilité, de la pyrogénicité et de la toxicité des colonnes prêtes à l'emploi est réalisé par un laboratoire de contrôle spécialisé et agrémenté conformément aux normes établies par la Pharmacopée française (Cf p. 65).

III.B.1.6.b Capacité des gels préparés en réacteur

La capacité de fixation des anticorps anti Apolipoprotéine B est déterminée sur une colonne Pharmacia (1 cm x 10 cm) remplie avec 5 ml de Sepharose CL-4B/anticorps anti Apolipoprotéine B, prélevés stérilement après couplage en réacteur. 30 ml de plasma frais sont alors déposés à un débit permettant un temps de contact de 10 min. Des échantillons sont ensuite prélevés et analysés avant et après passage sur la colonne dans les conditions classiques d'utilisation. Une électrophorèse en SDS-P.A.G.E. est réalisée sur les différents échantillons. Dans le cadre d'une étude comparative, trois types d'anticorps, monoclonaux de souris, polyclonaux de mouton et polyclonaux de chèvre, ont été couplés en réacteur sur Sepharose CL-4B dans les mêmes conditions. Après couplage, leur capacité d'épuration a été testée.

III.B.1.7 Inactivation des virus par solvant/détergent

Un essai d'inactivation des virus par un mélange solvant/détergent est réalisé à l'échelle du laboratoire selon deux des protocoles établis par le New York Blood Center (70) sur la solution d'anticorps purifiée et concentrée à 8,3 g/l. Après inactivation des virus et élimination des solvant/détergent, ces anticorps sont couplés au Sepharose CL-4B et la capacité de couplage est testée par comparaison avec une solution d'anticorps non inactivée.

III.B.1.7.a Inactivation TNBP/cholate de sodium

10 ml d'une solution d'anticorps purifiés et concentrés à 8,3 g/l sont incubés 6 heures à 30°C avec 0,3 % de TNBP et 0,2 % de cholate de sodium.

III.B.1.7.b Inactivation TNBP/Tween 80

6 ml de la même solution d'anticorps sont incubés 6 heures à 24°C avec 0,3 % de TNBP et 1 % de Tween 80.

III.B.1.7.c Elimination des solvant/détergent

Après l'inactivation virale et avant l'étape de couplage des anticorps sur le Sepharose CL-4B, les agents de l'inactivation virale sont éliminés de la solution d'anticorps par chromatographie d'exclusion sur une colonne Pharmacia (1,6 x 100 cm) contenant 150 ml de Sephadex G 25 prééquilibrée par une solution de carbonate de sodium 0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 8,5 à un débit de 30 ml/h.

Après élution, les anticorps sont récupérés et sont couplés à 5 ml de Sepharose CL-4B selon la technique d'activation au bromure de cyanogène de CUATRECASAS et Coll. (28). Après couplage, les immunoadsorbants sont coulés dans des colonnes Pharmacia (1 x 10 cm) et la capacité d'épuration des anticorps vis à vis du LDL-cholestérol est testée par rapport à un témoin n'ayant pas subi d'inactivation virale. Trois cycles successifs d'immunoépuration sont ainsi réalisés avec 30 ml de PFC normal.

III.B.2. TECHNIQUES ANALYTIQUES

III.B.2.1 Dosage des protéines

Les Protéines totales sont dosées selon la technique de coloration par l'acide Bicinchoninique (131), à l'aide d'un kit de dosage Pierce BCA provenant des laboratoires Sigma. Ce dosage est réalisé avec un étalon albumine dans une gamme d'étalonnage comprise entre 0 et 1 g/l.

III.B.2.2 Dosage des Apolipoproteines B

Les Apolipoproteines B sont dosées par la technique d'électroimmunodiffusion de LAURELL (88) précédemment citée à l'aide d'anticorps polyclonaux purifiés dans le laboratoire. La solution standard d'apolipoprotéines B utilisée pour ce dosage est un plasma titré provenant des laboratoires Sébia (Issy les Moulineaux, France).

III.B.2.3 Dosage des anticorps anti Apo B

III.B.2.3.a Dosage par densité optique

Les anticorps immunopurifiés sont dosés par densité optique à 280 nm dans une gamme de D.O. comprise entre 0,1 et 0,8 unités. Le coefficient d'extinction spécifique des immunoglobulines est alors utilisé pour obtenir la valeur effective de la concentration de l'échantillon dosé ($A_{1cm}^{1mg/ml}$ = 1,4).

III.B.2.3.b Dosage par E.I.D.

Une variante de l'électroimmunodiffusion selon la technique de LAURELL (88) a été mise au point dans le laboratoire. Son but est de doser dans le plasma de chèvres immunisées, les anticorps spécifiques des Apo B humaines.

Une gamme étalon est réalisée en incorporant lors de la préparation de cinq gels d'agarose, différentes dilutions d'une solution d'anticorps de titre connu (2 à 8 g/l).

Pour cela, cinq plaques de verre (10 x 12 cm) sont disposées afin de couler par plaque, 15 ml d'une solution d'agarose Litex HBS à 0,1% en tampon véronal pH 8,6 contenant 200 µl de l'une des différentes dilutions de la solution d'anticorps préparées.

Sur chacun de ces cinq gels, sont ensuite déposés dans des puits de 3 mm de diamètre, 5 µl des différentes dilutions d'une solution standard d'Apo B titrée à environ 1 g/l (0,125 à 0,5 g/l).

Après migration électrophorétique pendant 16 heures, sous une intensité de 20 milliampères par plaque, les fusées sont révélées au bleu de coomassie. La hauteur des fusées observée pour une concentration donnée d'Apo B, varie d'une plaque à l'autre et elle est proportionnelle à la concentration d'anticorps incorporé au gel.

Ainsi il est possible de réaliser une courbe étalon, pour chaque dilution d'Apo B, donnant la hauteur des fusées en fonction de la concentration en anticorps.

Il suffit ensuite d'appliquer le même protocole pour les différents échantillons d'anticorps à doser, puis de se référer aux courbes étalons pour déterminer la concentration des anticorps en fonction de la hauteur des pics observés pour chaque dilution d'Apo B.

III.B.2.4 Pureté des anticorps

III.B.2.4.a Analyse en SDS-P.A.G.E.

La pureté des fractions d'anticorps anti Apolipoprotéine B est évaluée de manière qualitative par électrophorèse en gradient de densité sur gel de polyacrylamide en présence de Dodécyl Sulfate de Sodium. Cette technique repose sur le principe suivant : lorsqu'une protéine, incorporée à un gel

d'électrophorèse est soumise à l'action d'un champ électrique, elle va migrer dans le gel selon deux de ses propriétés physico-chimiques intrinsèques, à savoir, sa taille d'une part, sa charge électrique d'autre part. Après révélation par une méthode colorimétrique appropriée, une ou plusieurs bandes électrophorétiques seront mise en évidence et caractériseront l'échantillon analysé. Dans le cas d'un mélange de plusieurs protéines, il est intéressant de pouvoir analyser la migration électrophorétique en fonction d'un seul de ces deux paramètres. Le Dodécyl Sulfate de Sodium qui est un détergent anionique, permet alors par son action dénaturante, de neutraliser la charge nette des protéines en leur conférant à toutes, une charge électrique négative. Ainsi, la migration électrique des protéines, ne dépendra donc plus que de leur taille. Cette migration pourra même être reliée directement à leur masse moléculaire du fait de l'uniformisation conformationnelle des protéines en milieu dénaturant. Il est à noter, que soumises à un tel traitement, la plupart des protéines de nature multimérique auront perdu leur structure quaternaire, et que leurs formes monomériques seront principalement mises en évidence.

L'électrophorèse des anticorps polyclonaux anti Apolipoprotéines B est réalisée sur Phastsystem selon la procédure décrite par Pharmacia (Uppsala, Suède), dérivée de la méthode de WEBER et OSBORN (152). Les gels utilisés sont des gels de polyacrylamide réticulés selon un gradient allant de 4% à 15%. Ces gels, fournis par la société Pharmacia, permettent l'analyse en SDS-P.A.G.E. de toutes les protéines caractérisées par un poids moléculaire compris entre 30 kDa et 300 kDa. Sur ce type de gel, Les protéines caractérisées par un poids moléculaire inférieur à 30 kDa apparaîteront sur le gel, mais leur distance de migration ne sera pas proportionnelle au logarithme de leur masse moléculaire.

Le tampon de migration électrophorétique est réalisé à l'aide d'une solution de TRIS-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8 contenant 2,5 % de SDS. Les échantillons sont dilués dans le tampon de migration à raison de 1 mg pour 10 ml, puis 1 µl de chaque échantillon est déposé sur le gel d'électrophorèse. Après migration 25 min sous une intensité de 10 mA, les bandes protéiques sont révélées par une solution de nitrate d'argent selon un protocole Pharmacia dérivé de la méthode de HEUKESHOVEN et DERNICK (64). Des marqueurs électrophorétiques de bas poids moléculaire sont utilisés pour caractériser les échantillons testés. Par ordre de poids

moléculaire croissant, ce sont l'α-lactalbumine (14,4 kDa), l'inhibiteur de trypsine (20,1 kDa), l'anhydrase carbonique (30 kDa), l'ovalbumine (43 kDa), l'albumine (67 kDa) et la phosphorylase B (94 kDa).

III.B.2.4.b Analyse en F.P.L.C.

La pureté des anticorps obtenus par chromatographie d'affinité a également été étudiée de manière qualitative et analytique par Fast Protein Liquid Chromatography. Cette technique chromatographique, mise au point par la société Pharmacia, est basée sur la séparation des protéines en fonction de leur charge. Son intérêt principal réside dans sa rapidité d'exécution et son haut pouvoir de résolution tout en préservant les propriétés biologiques de ces protéines. Le critère de pureté sélectionné dans ce type de technique repose sur la mise en évidence d'un ou de plusieurs pics caractérisant l'échantillon analysé. Le support chromatographiques utilisé ici est le mono Q qui est un échangeur d'anions fort. Ce support est conditionné dans une colonne HR 5/5 (50x5 mm) par la société Pharmacia qui fourni également l'ensemble des matériels destinés à l'expérimentation.

Le support est équilibré en tampon triéthanolamine 20 mM, pH 7,7, puis 500 µl d'échantillon, concentré à 1 g/l de protéines et dialysé contre le tampon d'équilibration, sont déposés sur la colonne. L'élution est réalisée à un débit de 1 ml/min à l'aide d'un gradient linéaire de force ionique. Ce gradient est réalisé par mélange d'un tampon initial triéthanolamine 20 mM, pH 7,7 et d'un tampon final triéthanolamine 20 mM, pH 7,7, NaCl 1 M. Le profil d'élution chromatographique est suivi par lecture de la densité optique à 280 nm en sortie de colonne.

III.C. RESULTATS

III.C.1. SELECTIVITE D'EPURATION DES IMMUNOADSORBANTS

En préliminaire, une étude comparative a été réalisée *in vitro* sur différents adsorbants capables d'épurer sélectivement le LDL-cholestérol en circulation extracorporelle. Ont été sélectionnés pour cette étude, l'héparine-Sepharose, le sulfate de dextran-Cellulose et trois différents immunoadsorbants à base d'anticorps polyclonaux de chèvre, de mouton, et d'anticorps monoclonaux de souris couplés à du Sepharose CL-4B. Les profils chromatographiques obtenus avec ces différentes colonnes, testées en parallèle, sont représentés dans la figure 30.

Ces différents adsorbants sont capables d'extraire 80 à 90 % du LDL-cholestérol plasmatique, tout en préservant le HDL-cholestérol qui ne se fixe pas sur les colonnes. Ces résultats sont d'ailleurs confirmés par le dosage des apolipoprotéines A et B qui donnent les mêmes rendements de fixation. Les triglycérides sont légèrement adsorbés par les différents supports, puisque ne sont retrouvées que 60 à 70 % de la quantité de départ (figure 31). Parmi les principaux facteurs de la coagulation dosés, il est à noter toutefois une différence d'adsorption entre les adsorbants à base d'héparine et de sulfate de dextran d'une part, et les immunoadsorbants d'autre part. L'héparine Sepharose adsorbe fortement les facteurs de la coagulation V, VIII, et IX, ainsi que la fibronectine et moyennement le fibrinogène. Le sulfate de dextran adsorbe les mêmes facteurs, dans une proportion moindre vis à vis du fibrinogène, de la fibronectine et du facteur VIII (figure 32). Les facteurs du complément C3a et C5a quant à eux, n'ont pas été affectés lors d'un seul passage sur les différents supports.

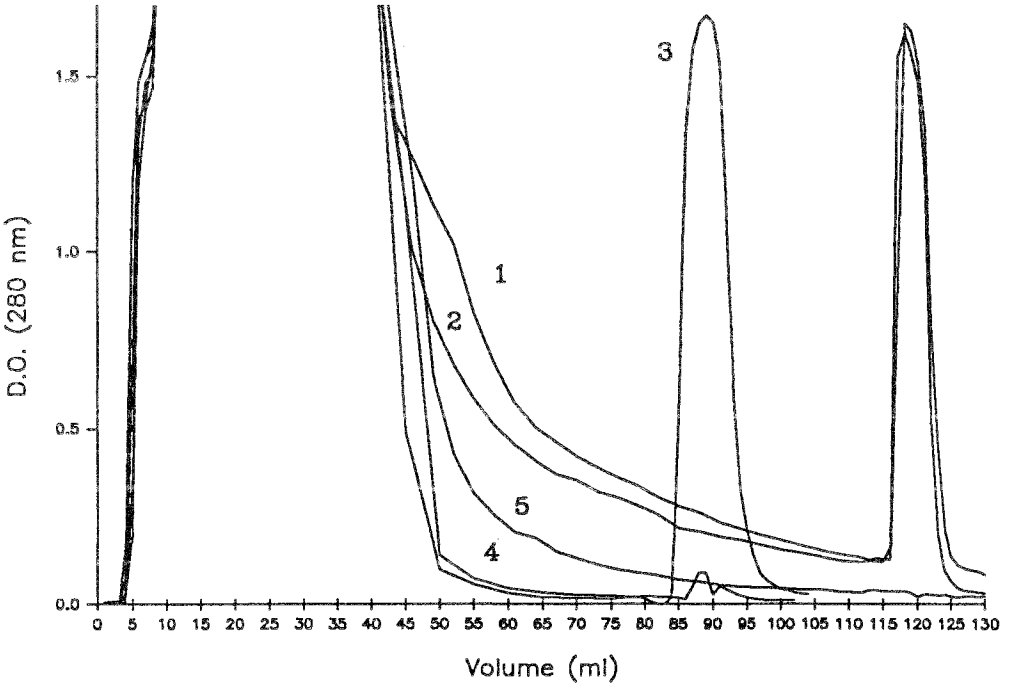


FIGURE 30 : PROFIL D'ELUTION DE DIFFERENTES MATRICES CAPABLE D'EPURER LE LDL-CHOLESTEROL. Pour cette étude comparative, ont été sélectionnés l'héparine-Sepharose (1), le sulfate de dextran-Cellulose (2), et trois différents immunoadsorbants à base d'anticorps polyclonaux de chèvre, de mouton, et d'anticorps monoclonaux de souris. Pour ces 3 types d'anticorps, les profils d'élution étant superposables, seul est représenté le profil d'élution des anticorps polyclonaux de chèvre (3). Deux matrices neutres ont servi de témoin, la cellulose (4) et le Sepharose CL-4B (5). L'épuration est réalisée *in vitro* en déposant 30 ml de plasma frais normal sur 5 ml de chacun des supports. Après retour de la D.O. à sa ligne de base, le LDL-cholestérol est élué. Débit de travail : 30 ml/h.

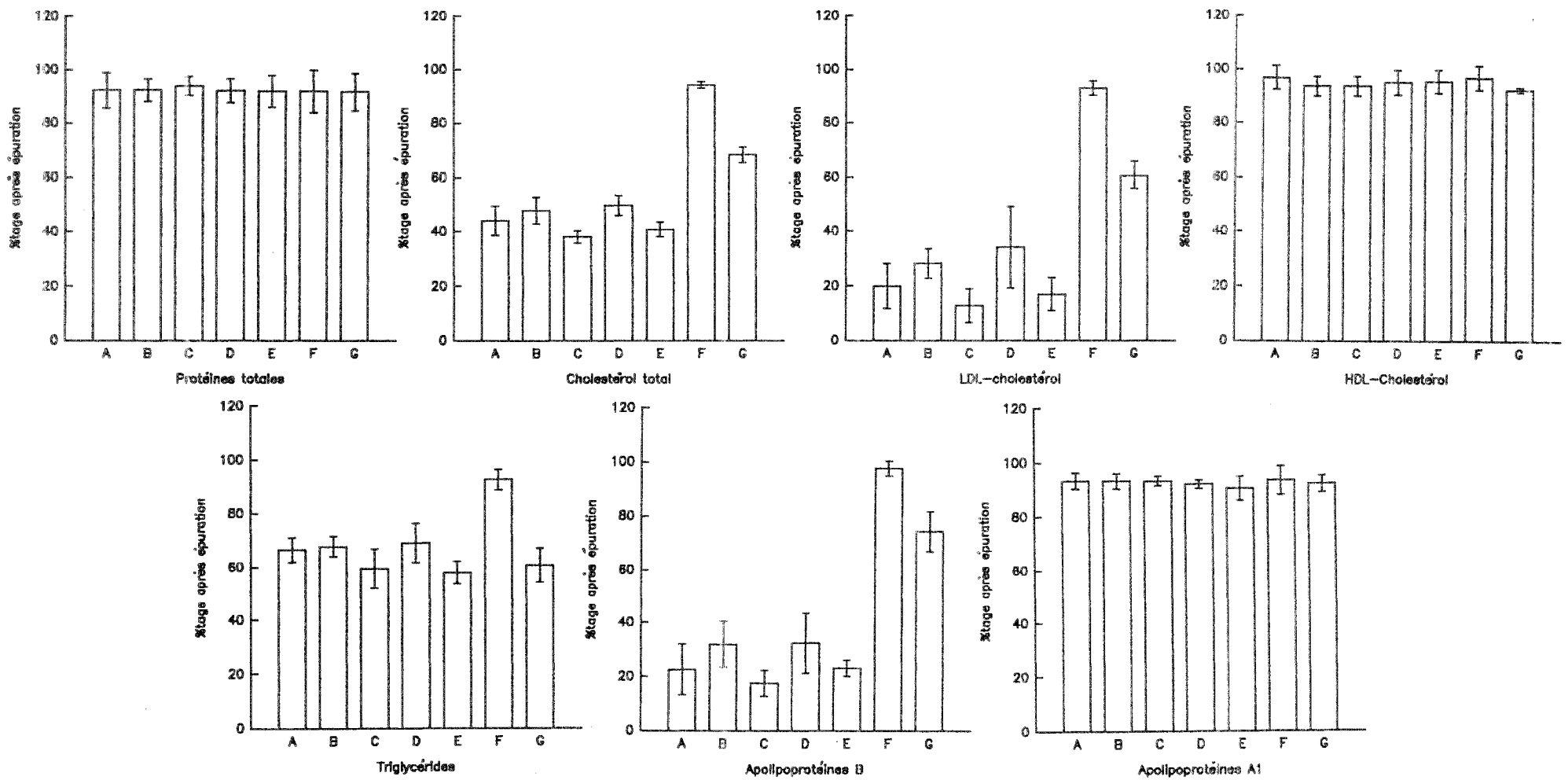


FIGURE 31 : SELECTIVITE D'EPURATION DES ANTICORPS ANTI APO B (1). Une étude comparative entre différents adsorbants capable d'épurer le LDL-cholestérol montre une meilleure sélectivité des adsorbants à base d'anticorps vis à vis des principaux paramètres lipidiques. Héparine-Sepharose (A), Sulfate de dextran-Cellulose (B), Anticorps polyclonaux de chèvre (C), Anticorps polyclonaux de mouton (D), Anticorps monoclonaux de souris (E). Cellulose (F), Sepharose Cl-4B (G), (n=5).

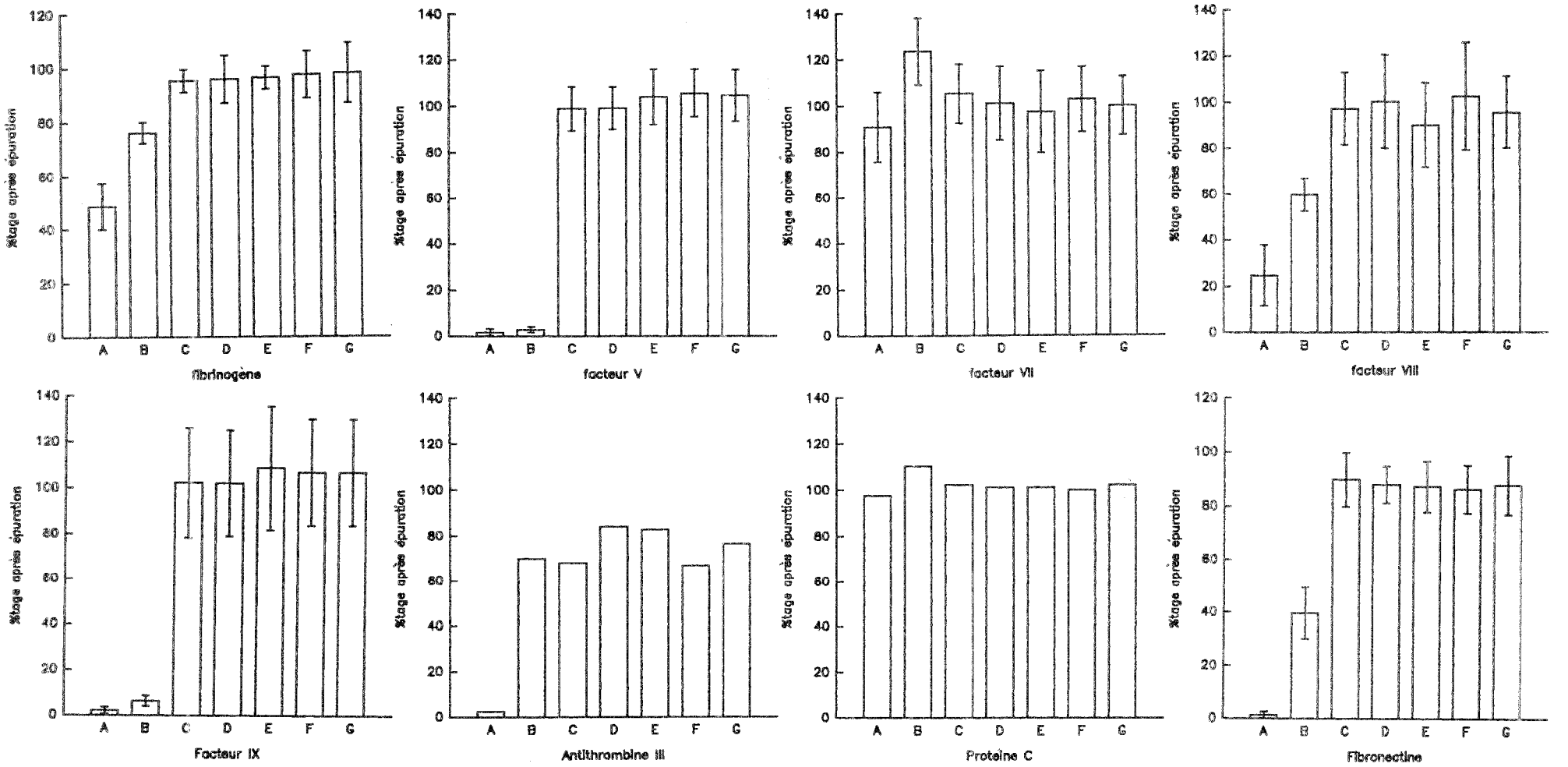


FIGURE 32 : SELECTIVITE D'EPURATION DES ANTICORPS ANTI APO B (2). Une étude comparative entre différents adsorbants capable d'épurer le LDL-cholestérol montre une meilleure sélectivité des adsorbants à base d'anticorps vis à vis des principaux facteurs de la coagulation. Héparine-Sepharose (A), Sulfate de dextran-Cellulose (B), Anticorps polyclonaux de chèvre (C), Anticorps polyclonaux de mouton (D), Anticorps monoclonaux de souris (E). Cellulose (F), Sepharose Cl-4B (G), (n=5).

III.C.2. MISE AU POINT D'UN DOSAGE D'ANTICORPS

Une variante de l'électroimmunodiffusion selon la technique de Laurell a été mise au point au laboratoire dans le but de doser spécifiquement les anticorps anti Apolipoprotéine B contenus dans les différents plasmas de chèvres hyperimmunisées ainsi que dans les différentes fractions au cours du processus de purification.

L'étalonnage est réalisé avec une solution d'anticorps purifiée par chromatographie d'affinité sur LDL-Sepharose à raison de 4,4 g/l, titre déterminé par densité optique à 280 nm après application du coefficient d'extinction moléculaire des IgGs ($A^{1\%}_{1cm}$=14).

Après dépôt de différentes dilutions d'une solution standard d'Apo B, les électrophorèses sont réalisées puis les différentes courbes étalons, hauteur de pic en fonction de la concentration en anticorps incorporés, sont tracées (figure 33).

Des droites de régression linéaire sont ensuite tracées après ajustement logarithmique (figure 34).

Une fois l'étalonnage réalisé, le même protocole est appliqué pour les différents échantillons afin de déterminer leur titre en anticorps par référence aux différentes droites étalons.

Une bonne corrélation est observée en comparant cette technique de dosage avec le dosage des anticorps par densité optique à 280 nm ($A^{1\%}_{1cm}$=14) pour les différentes fractions d'anticorps purifiés (figure 35).

Le dosage des anticorps contenus dans les différents plasmas est réalisé par cette même technique afin de permettre d'établir un bilan chromatographique des anticorps purifiés (tableau X). Il est à noter cependant que le dosage de certains plasmas dont le titre en anticorps anti Apo B est élevé par rapport à la gamme d'étalonnage (> 8 g/l) pose des problèmes quant à la reproductibilité de la méthode (tableau IX).

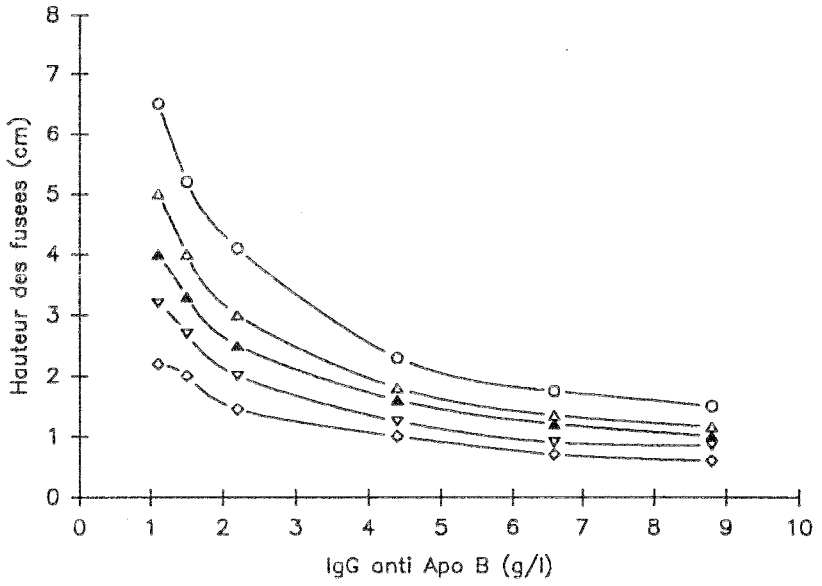


FIGURE 33 : COURBES D'ETALONNAGE PAR ELECTROIMMUNODIFFUSION. Six gels d'électrophorèse contenant chacun une concentration différente d'anticorps ont servi à la réalisation d'une gamme d'étalonnage à partir de différentes dilutions d'un étalon Apo B titré à 1 g/l.○Apo B au 1/2,△Apo B au 1/3,▲Apo B au 1/4,▽Apo B au 1/6,◇Apo B au 1/8.

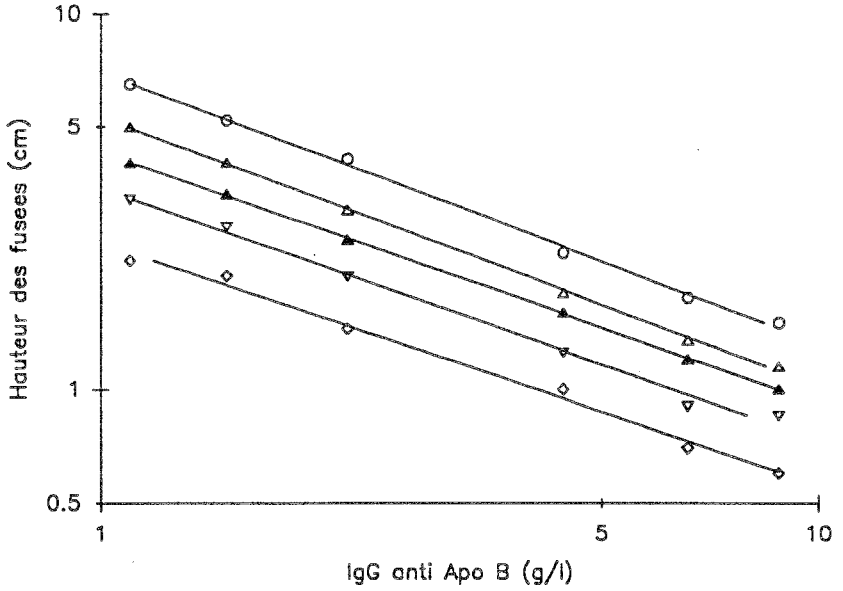


FIGURE 34 : DROITES D'ETALONNAGE APRES AJUSTEMENT LOGARITHMIQUE. Après ajustement logarithmique des courbes d'étalonnage pour chaque dilution d'Apo B, des droites de régression linéaire sont tracées afin de corréler la concentration en anticorps avec la hauteur des pics de précipitation.

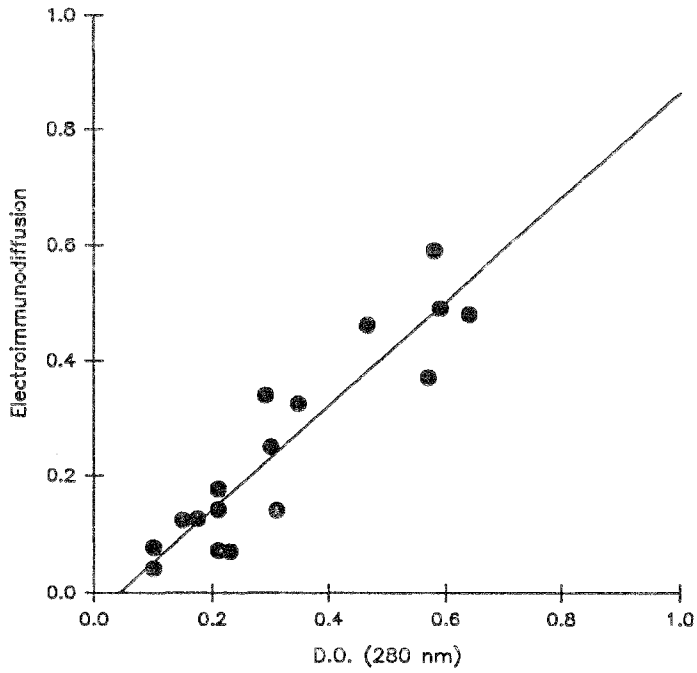


FIGURE 35 : RELATION ENTRE L'ESTIMATION DE LA CONCENTRATION DES ANTICORPS PAR LAURELL ET PAR DENSITE OPTIQUE. La méthode de Laurell adaptée au dosage des anticorps immunopurifiés est corrélée avec la méthode de dosage par densité optique à 280 nm. Le coefficient de corrélation entre les deux méthodes est de 0,95.

	Coefficient de concentration	Dosage E.I.D.	Moyenne
Plasma 1	x2,5	4,6 g/l	4,5 g/l
	x0,5	4,4 g/l	
Plasma 2	x2,5	9,5 g/l	8,5 g/l
	x0,5	7,5 g/l	

TABLEAU IX : LIMITATIONS DANS LE TITRAGE PAR E.I.D. DES PLASMAS HYPERIMMUNISES. Des problèmes de faible reproductibilité ont été observés pour le dosage des plasmas dont le titre en anticorps anti Apo B sort de la gamme d'étalonnage qui est comprise entre 1 et 8 g/l. Dans ce dernier cas, l'écart observé entre deux mesures est plus important.

III.C.3. PREPARATION DES IMMUNOADSORBANTS

III.C.3.1 Purification des anticorps polyclonaux

16 cycles de purification des anticorps polyclonaux ont été réalisés successivement sur une colonne de deux litres de LDLs immobilisées sur Sepharose CL-4B à partir de différentes poches de plasma. Un total de 15,5 g d'anticorps ont été purifiés, soit un rendement moyen de 1 g par cycle chromatographique. De part la grande hétérogénéité des plasmas utilisés, les rendements chromatographiques obtenus sont variables et sont compris entre 30 et 130 % de la quantité d'anticorps déposée sur la colonne (tableau X). Les cycles 1 et 16 laissent supposer un vieillissement du support, mais ces résultats ne sont pas confirmés par les cycles 5 et 15.

N° de cycle	Dépôt (g)	IgG adsorbées* (%)	IgG éluées (g)	Rendement de l'étape
1	0,66	100	0,78	117,0
2	0,37	100	0,45	121,6
3	0,23	100	0,29	129.0
4	4,85	100	1,92	39,6
5	3,57	100	1,49	41,7
6	1,33	100	1,00	75,2
7	0,86	100	0,51	59,3
8	0,90	100	0,69	76,7
9	0,85	100	0,50	72,9
10	7,40	73	2,35	33,0
11	2,00	100	1,02	51.0
12	1,90	69	0,97	51,3
13	0,73	100	0,15	21.2
14	1,79	100	1,43	79,8
15	3,25	87	1,72	53,1
16	0,62	100	0,25	40.3

*Le taux d'adsorption est déterminé par différence entre les plasmas avant et après passage sur le support.

TABLEAU X : PURIFICATION DES ANTICORPS SUR LDL-SEPHAROSE. Différents plasmas de chèvres hyperimmunisées sont déposées sur une colonne de deux litres de LDL-Sepharose. Après élution du plasma par une solution de PBS pH 7,2, les anticorps sont élués par une solution de glycine 0,3 M, pH 2,8 (débit de dépôt: 2 l/h, débit d'élution: 4 l/h), puis ils sont dosés par E.I.D..

La quantité maximale d'anticorps qui a pu être éluée au cours d'un cycle chromatographique est de 2,35 g, soit 1,17 g par litre de gel (figure 36).

En se fixant à 80 % de cette valeur maximale d'élution dans des conditions saturantes de dépôt, la capacité optimale d'élution de la colonne utilisée est d'environ 1 g d'anticorps par litre de gel. Avec un rendement global de 60 %, cela permet de purifier 2 g d'anticorps par cycle chromatographique pour un dépôt initial de 3,5 g d'anticorps.

Le dosage des protéines totales contenues dans les fractions purifiées des quatres derniers cycles montre une bonne corrélation entre les taux de protéines et les taux d'anticorps mesurés. Le taux de protéines dans la fraction concentrée est supérieur, mais il est en partie lié à la précision du dosage (tableau XI).

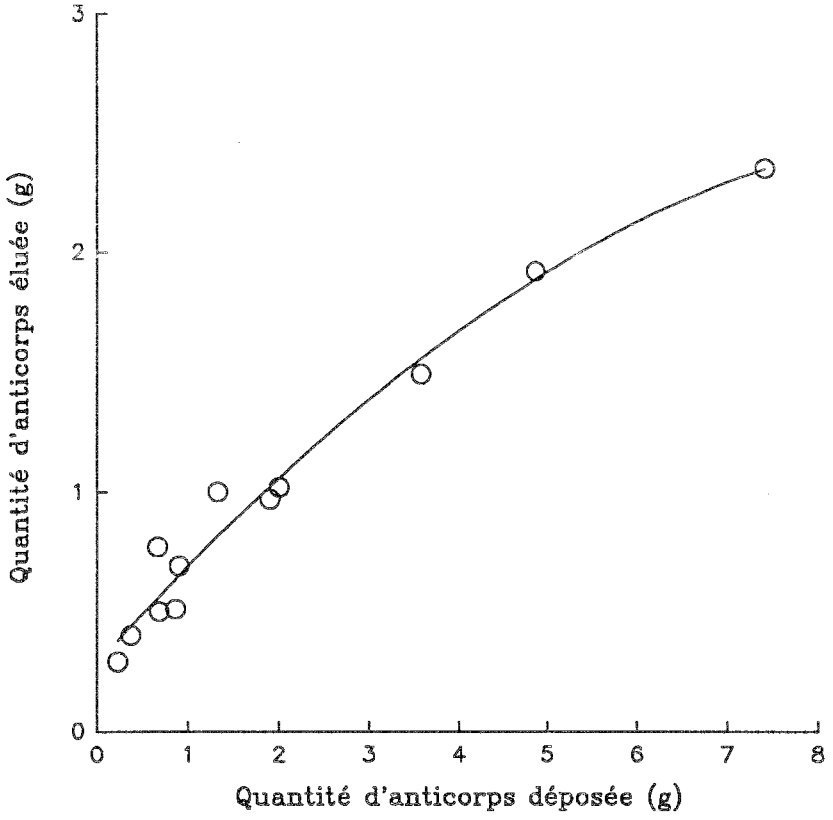


FIGURE 36 : CAPACITE D'ADSORPTION DU LDL-SEPHAROSE. La capacité maximale d'élution de la colonne de LDL-Sepharose est de 2,35 g d'anticorps, soit 1,17 g par litre de gel. La capacité optimale d'élution est d'environ 1 g pour 2 g d'anticorps déposés par litre de gel.

ECHANTILLON	PROTEINES TOTALES(g/l)	IgG par LAURELL(g/l)	IgG/PT %	IgG par D.O.(g/l)	IgG/PT %
1	0,62	0,59	95,20	0,58	93,55
2	0,25	0,34	136,0	0,29	116,0
3	0,32	0,325	101,6	0,35	109,4
4	0,43	0,46	107,0	0,47	109.1
CONCENTRE	12,1	7,30	60,00	9,00	74,40

TABLEAU XI : EVALUATION PROTEIQUE DES ANTICORPS PURIFIES. Le dosage des protéines totales dans les fractions purifiées d'anticorps anti apolipoprotéines B est réalisé par la méthode de coloration à l'acide Bicinchoninique (Pierce BCA). Le dosage spécifique des anticorps est réalisé d'une part par Laurell et d'autre part par densité optique à 280 nm ($A_{1cm}^{1mg/ml} = 1,4$).

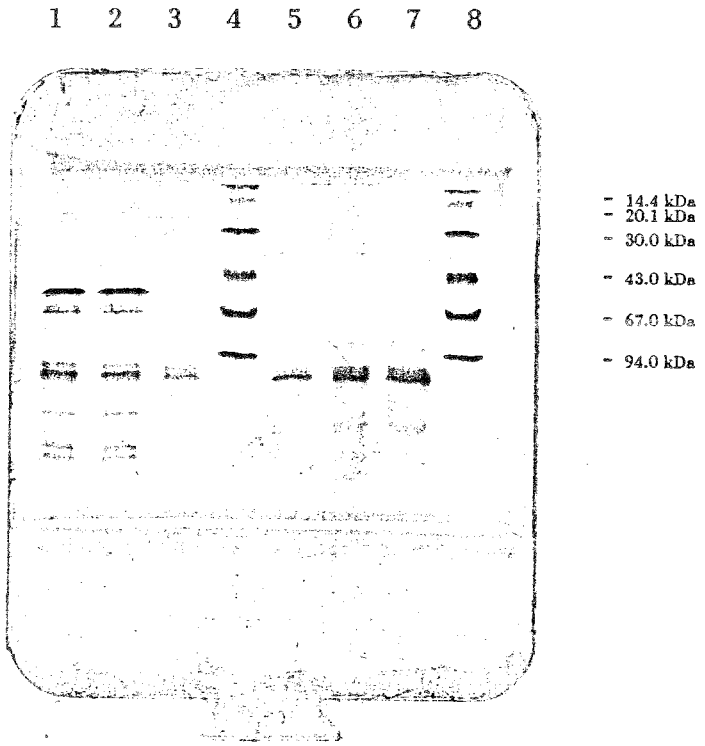


FIGURE 37 : ANALYSE EN SDS-P.A.G.E. DES FRACTIONS D'ANTICORPS. La purification des anticorps anti Apo B sur LDL-Sepharose est réalisée à partir de plasma de chèvre immunisée déposé sur la colonne (1). Le plasma est recueilli en sortie de colonne (2), puis les anticorps sont élués en glycine 0,3 M, pH 2,8 (3). Après plusieurs passages, les anticorps sont mélangés (5) et concentrés (6). Après filtration stérilisante sur 0,22 µm (7), les anticorps sont conservés en prévision de leur couplage sur Sepharose CL-4B. L'analyse des fractions purifiées révèle une bande majeure vers 150 kDa, caractéristique des IgGs, et des bandes mineures dans les fractions concentrées pouvant correspondre à des protéines contaminantes (plasmas dilués au 1/10).

L'analyse en SDS P.A.G.E. des fractions purifiées d'anticorps met en évidence une bande principale vers 150 kDa correspondant vraisemblablement aux IgGs et des bandes de moindre intensité pouvant correspondre à des contaminants mineurs (figure 37).

L'analyse des fractions purifiées en F.P.L.C. sur mono Q (échangeur d'anions fort), révèle deux pics caractérisant ces IgGs polyclonales purifiées (figure 38).

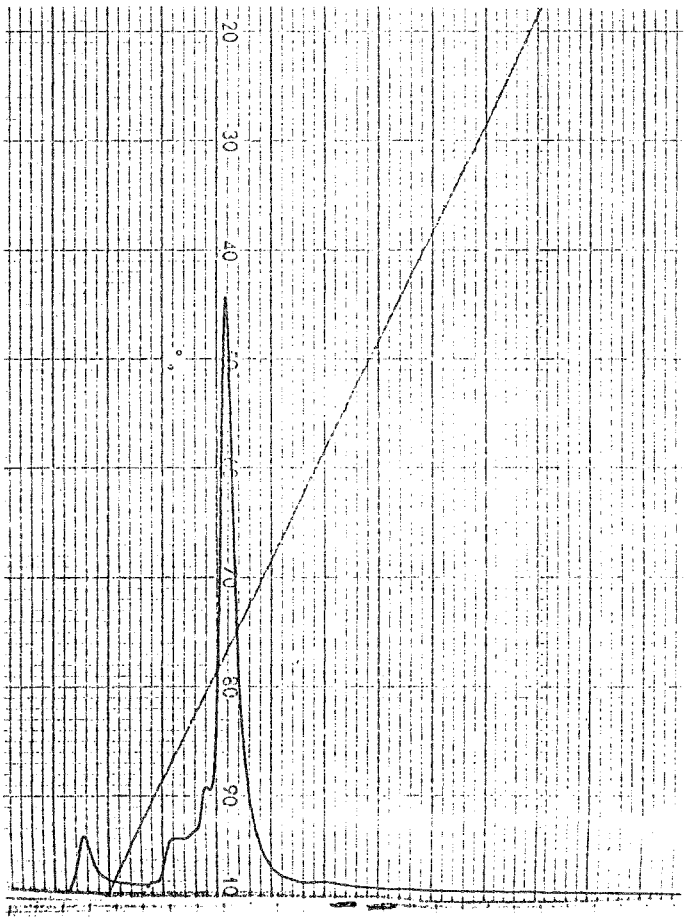


FIGURE 38 : ANALYSE EN F.P.L.C. DES ANTICORPS PURIFIES. L'analyse chromatographique des anticorps anti Apo B, réalisée à l'aide d'un support mono Q sur colonne HR 5/5, révèle deux pics dont un pic principal avec épaulements caractérisant les anticorps polyclonaux. Débit de travail : 1 ml/min. Volume d'échantillon : 500 µl à 1 g/l. Gradient d'élution : triéthanolamine 20 mM, pH 7,7 , triéthanolamine 20 mM NaCl 1M, pH 7,7.

III.C.3.2 Diafiltration des anticorps

Après purification, les anticorps polyclonaux sont mélangés par lots afin de disposer d'une quantité suffisante d'anticorps pour réaliser le couplage, puis ils sont dialysés contre une solution de carbonate de sodium et concentrés en vue de leur couplage sur Sepharose CL-4B.

Les différentes opérations de dialyse et de concentration sont réalisées en une seule étape à l'aide d'un module d'ultrafiltration à flux tangentiel.

Suivant la quantité d'anticorps purifié, 10 à 20 litres de solution sont ainsi dialysés puis sont ajustés au volume désiré (300 ou 600 ml), par élimination de l'ultrafiltrat.

Bien que n'ayant pas fait l'objet d'une optimisation, les pertes d'anticorps enregistrées à cette étape sont estimés à 20 ± 10 % (tableau XII).

N° lot	Volume de départ (l)	IgGs (g/l)	IgGs totales (g)	Volume final (l)	Rendement (%)
1	8,1	0,225	1,82	0,6	84,0 %
2	11,9	0.500	5,96	0,6	82,5 %
3	15,6	0,173	2,70	0,3	66,7 %
4	10,0	0,330	3,30	0,3	90,9 %

TABLEAU XII : DIAFILTRATION DES ANTICORPS. Plusieurs lots d'anticorps purifiés par chromatographie d'affinité sur LDL-Sepharose sont mélangés puis ils sont dialysés et concentrés en une seule étape à l'aide d'un module d'ultrafiltration à flux tangentiel. Surface d'ultrafiltration : 1,395 m^2. Seuil de coupure : 100 kDa. Débit de concentration : 15 l/h.

III.C.3.3 Couplage sur Sepharose CL-4B

Le couplage des anticorps est réalisé dans un réacteur en verre clos et stérile permettant de traiter des volumes de gel inférieurs ou égaux à 1 litre. Le couplage de plusieurs lots de différents types d'anticorps purifiés et concentrés a ainsi été réalisé, soit un lot de 300 ml, et trois lots de 600 ml chacun. La quantité d'anticorps fixés et les rendements de couplage ont été évalués (tableau XIII). Des contrôles de stérilité ont été effectués sur un échantillon de chacun de ces différents lots et ont été déclarés conformes aux normes établies par la Pharmacopée française.

Type d'anticorps	Volume (ml)	Quantité traitée(g)	Quantité fixée(g)	Concentration mg/ml de gel	Rendement (%)
Polyclonal de chèvre	300	1,47	1,20	4,0	81,5
Polyclonal de chèvre	600	3,42	3,03	5,1	89,0
Polyclonal de mouton	600	5,88	4,04	6,7	68,6
Monoclonal de souris	600	3,69	3,32	5,5	89,8

TABLEAU XIII : COUPLAGE DES ANTICORPS SUR SEPHAROSE CL-4B. L'évaluation de la capacité de couplage dans un réacteur clos, stérile, et apyrogène, a été réalisée avec différents types d'anticorps anti Apo B.

III.C.4. CONDITIONNEMENT DES IMMUNOADSORBANTS

Le remplissage des colonnes destinées à l'immunoépuration du LDL-cholestérol en circulation extracorporelle s'est effectué dans des conditions strictes de stérilité et d'apyrogénicité sous une hotte à flux laminaire. Sept colonnes de 300 ± 10 ml chacune ont ainsi été coulées à partir des lots préparés précédemment.

III.C.5. CONTROLES

III.C.5.1 Sécurité des supports

Des contrôles de stérilité et d'apyrogénicité, effectués sur des échantillons de 100 ml d'une solution de PBS, prélevés en sortie de chacune des sept colonnes, ont confirmé l'absence de contamination bactériologique et l'absence de substances pyrogènes et permettent ainsi de conclure à l'innocuité des supports chromatographiques préparés.

III.C.5.2 Capacité d'épuration des supports

La capacité d'adsorption du LDL-cholestérol a été testée en colonne à partir d'échantillons des gels préparés en réacteur. Les anticorps polyclonaux de chèvre possèdent une capacité d'adsorption de 4,0 ± 0,1 mg d'Apo B par ml d'immunoadsorbant (n=3). Cette capacité d'adsorption est comparable à celle obtenue avec les anticorps monoclonaux de souris et les anticorps polyclonaux de mouton (figure 39).

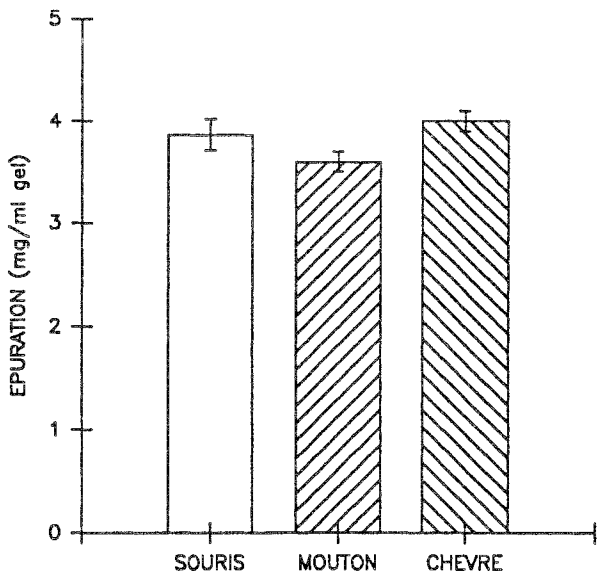


FIGURE 39 : CAPACITE D'EPURATION DES IMMUNOADSORBANTS PREPARES EN REACTEUR. Trois passages successifs de 30 ml d'un plasma frais congelé sont déposés sur 5 ml d'immunoadsorbants préparés à partir d'anticorps monoclonaux de souris ▭, polyclonaux de mouton ▨, et polyclonaux de chèvre ▧. Après élution du plasma par une solution de PBS, pH 7,2, les apolipoprotéines B sont éluées par une solution de glycine 0,3 M, pH 2,8. Débit de travail : 30 ml/h.

III.C.6. INACTIVATION DES VIRUS DANS LES SOLUTIONS D'ANTICORPS

Dans l'optique d'inclure une étape d'inactivation virale au cours du processus de fabrication des colonnes d'immunoépuration, des essais d'inactivation virale aux TNBP/Cholate et TNBP/Tween ont été réalisés sur des petites quantités d'anticorps purifiés et concentrés à 8,3 g/l. Après incubation 6 heures aux températures préconisées, puis élimination des solvant/détergent par gel filtration, l'intégrité des anticorps a été testée après l'inactivation des virus en comparant d'une part les pertes d'anticorps occasionnées par le traitement aux S/D, et en comparant, d'autre part, leur capacité d'immunoépuration par rapport à une solution d'anticorps non traitée. Les résultats obtenus, indiquent une perte d'environ 10 % d'anticorps après inactivation TNBP/Tween, alors qu'aucune perte n'est observée après inactivation TNBP/Cholate (figure 40). Cependant, la capacité d'épuration du LDL-cholestérol n'est pas affectée quelle que soit la technique d'inactivation testée (figure 41).

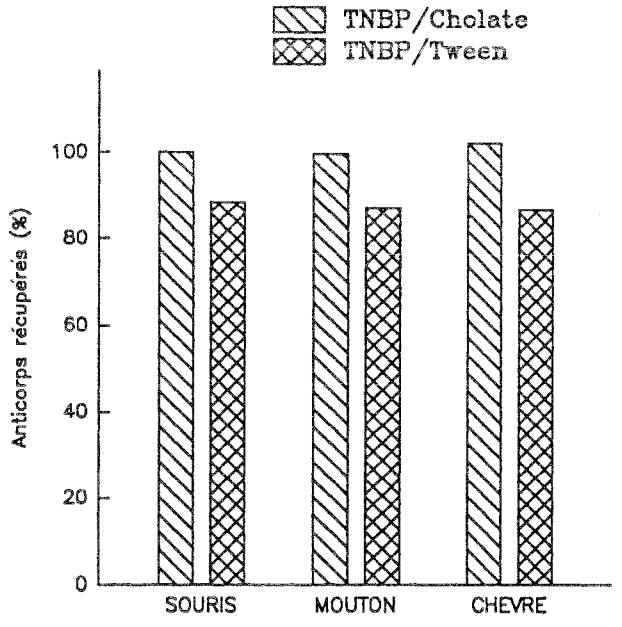


FIGURE 40 : EVALUATION DES PERTES D'ANTICORPS APRES INACTIVATION DES VIRUS. L' inactivation par solvant/détergent a été appliquée sur les anticorps purifiés selon les deux protocoles suivants : TNBP 0,2 %/ Cholate de sodium 0,3 %, 6 heures à 30 °C, et TNBP 0,2 %/ Tween 80 1%, 6 heures à 24°C. Après élimination des agents de l'inactivation des virus par gel filtration, la perte d'anticorps a été évaluée.

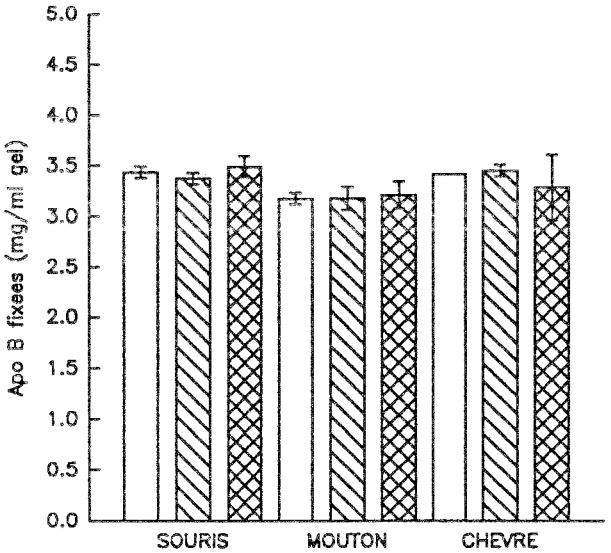


FIGURE 41 : CAPACITE D'EPURATION DES ANTICORPS APRES INACTIVATION DES VIRUS. Les différents types d'anticorps anti Apo B ont été testés en parallèle sans avoir subi d'inactivation ▭, après avoir subi une inactivation TNBP/Cholate ▧, ou après avoir subi une inactivation TNBP/Tween ▩ (n=3).

III.D. DISCUSSION

La technique d'immunoépuration du LDL-cholestérol en circulation extracorporelle par anticorps polyclonaux de chèvre à été sélectionnée pour une fabrication à grande échelle en raison de sa capacité d'épuration qui est de 4 mg d'Apo B/ml de support et qui est comparable à celle obtenue avec des anticorps polyclonaux de mouton ou monoclonaux de souris comme l'a démontrée l'étude comparative réalisée avec le centre de recherche cardiologique de Moscou (1). Elle a également été choisie en raison de sa sélectivité d'épuration qui est supérieure aux adsorbants à base d'héparine ou de sulfate de dextran, notamment vis à vis des principaux facteurs de la coagulation qui ne sont que très légèrement affectés lors de leur passage sur le support. Elle a été choisie enfin pour des raisons économiques, le prix de revient des anticorps polyclonaux étant plus faible que celui des anticorps monoclonaux.

le dosage spécifique des anticorps anti Apolipoprotéines B par électroimmunodiffusion de Laurell a été retenu pour sa rapidité et sa facilité d'exécution. Cependant, l'interprétation de ses résultats n'est pas sans inconvénient car cette technique est inadaptée dans le cas du dosage de plasmas dont le titre en anticorps sort de la gamme d'étalonnage comprise entre 1 et 8 g/l. Dans ce dernier cas, il n'y a pas vraiment de corrélation observée entre la dilution des plasmas incorporés aux gels d'électrophorèse et la hauteur des pics obtenus, et ce quelle que soit la dilution effectuée.

Pour le passage à l'échelle pilote, la purification des anticorps de chèvre anti Apolipoprotéine B a été réalisée sur une colonne de deux litres de LDL-Sepharose avec des rendements variables. En effet, la principale difficulté rencontrée à cette étape, empéchant l'éventualité d'une optimisation de la procédure à l'échelle utilisée, provient de la qualité des plasmas traités, leur titre en anticorps anti Apo B n'étant pas uniforme d'un lot à l'autre. La difficulté précédemment rencontrée lors du dosage des anticorps par Laurell s'est alors répercutée sur le choix de la quantité de plasma à traiter lors de la phase chromatographique. A cette étape de

production, il été donc nécessaire de titrer chaque poche de plasma avant d'en extraire les anticorps anti Apolipoprotéine B. Le passage à une échelle plus importante, impliquant le mélange de plusieurs poches de plasma, permettrait de résoudre ce problème. En effet, l'homogénéisation de la quantité d'anticorps présente dans ce mélange, permettrait de définir un titre moyen d'environ 5 g/l et ainsi, d'optimiser l'étape chromatographique. Cela permettrait également d'évaluer le vieillissement du support au cours de son utilisation. Ainsi, si le choix de l'utilisation des anticorps polyclonaux présente de nombreux avantages, l'inconvénient majeur réside au niveau du rendement d'immunisation des animaux qui est très variable d'un animal à l'autre.

L'utilisation d'un module d'ultrafiltration à cassette dans l'étape suivante, dans l'optique de concentrer et de dialyser les anticorps purifiés, permet une automatisation de la procédure quelque soit l'échelle envisagée. En effet, l'ultrafiltration à flux tangentiel, qui à déjà fait ses preuves dans l'industrie permet une bonne concentration des anticorps tout en préservant leur intégrité. Etant donné que ce système est modulable à l'infini, il suffit d'optimiser la surface d'ultrafiltration en fonction de la quantité d'anticorps à traiter.

L'utilisation de différents réacteurs de capacité variable, lors du couplage des anticorps sur Sepharose CL-4B, permet également une automatisation de la procédure. Les rendements de couplage obtenus dans ces réacteurs assurant la complète stérilité de la réaction, sont légèrement inférieurs à ceux obtenus à l'échelle du laboratoire. Cependant, avec une perte d'environ 10 %, ils restent dans les normes acceptables pour une réalisation à grande échelle.

Ainsi, dans l'état actuel du procédé et en première estimation, le rendement global de la chaîne de production serait d'environ 40 % avec un rendement moyen de 60 % pour la purification des anticorps polyclonaux de chèvre, 80 % pour la concentration de ces anticorps et 90 % pour leur couplage sur Sepharose CL-4B.

Le conditionnement des colonnes d'immunoépuration, qui constitue l'étape suivante dans le processus de fabrication, est également adaptable pour une production à grande échelle. Celui ci doit faire l'objet de contrôles

stricts afin d'assurer la totale inocuité de ces supports.

La qualité des immunoadsorbants préparés en réacteur est comparable à celle des immunoadsorbants obtenus au laboratoire. La transposition d'échelle n'a pas affecté la capacité de fixation des anticorps vis à vis des LDLs. Il était toutefois nécessaire de le confirmer.

Dans la mesure où il s'avérerait nécessaire de réaliser une inactivation virale sur les lots d'anticorps destinés à la fabrication des colonnes d'immunoépuration, des essais d'inactivation virale aux solvant/détergent ont montré une bonne stabilité des anticorps durant le traitement. Toutefois, il resterait à valider la technique dans le but d'assurer l'efficacité de ce traitement.

Quelques uns des problèmes soulevés lors de l'optimisation à l'échelle du laboratoire n'ont pas été solutionnés de manière radicale lors du passage à l'échelle pilote. Il s'agit en l'occurrence du problème de relargage des anticorps couplés à la matrice de Sepharose qui ont fait l'objet d'une quantification lors d'un précédent travail (119) (120). La solution envisagée à l'époque pour réduire ce relargage consistait à traiter l'immunoadsorbant avec une solution de glutaraldéhyde à 0,005%. Cette solution n'a pas été retenue en raison de la toxicité reconnue du glutaraldéhyde et de la perte de capacité qu'il occasionnait aux anticorps ainsi traités. Bien qu'aucune publication à ce jour n'ai fait mention d'une intolérance vis à vis de ce type de support, il ne faut pas pour autant négliger ce problème de relargage car son immunogénicité reconnue pourrait devenir non tolérée à long terme (55).

Un autre problème abordé dans ce précédent travail, concerne la préparation des immunoadsorbants dans des conditions strictes de stérilité et d'apyrogénicité. La nécessité de conserver ces immunoadsorbants stériles durant toute leur durée d'utilisation, a fait l'objet d'une étude dans laquelle différents agents stérilisants ont été testés *in situ*. Cependant, aucun n'a donné satisfaction, compte tenu de la relative fragilité des anticorps couplés au Sepharose. Aussi la solution retenue dans l'immédiat pour conserver ces immunoadsorbants fut l'utilisation d'un agent bactériostatique à savoir une solution d'éthanol à 20%. Cela implique donc une manipulation du matériel dans des conditions préservant la stérilité du produit et l'obligation de réaliser des contrôles de stérilité et d'apyrogénicité avant toute utilisation.

III.E. CONCLUSION

La maîtrise des techniques mises en oeuvre dans la réalisation des premières colonnes destinées à l'immunoépuration du LDL-cholestérol permet d'envisager un transfert vers l'industrie. Cependant, des efforts devront être entrepris afin d'optimiser la production, notamment dans le choix des matériels et des équipements nécessaires à la fabrication à grande échelle de ces colonnes.

Des essais d'étude *ex vivo* chez l'homme devraient prochainement être entrepris en collaboration avec un service de plasmaphérèse afin de valider le procédé pour une application en thérapeutique humaine.

En fonction des remarques et suggestions qui seront faites lors de ces premiers essais, nous pourrons être amenés à modifier certaines étapes du processus de fabrication, et ce, dans le souci d'améliorer la qualité de ces colonnes d'immunoépuration.

De plus l'expérience acquise au cours de la préparation de ces immunoadsorbants, permettra de réaliser une transposition rapide des techniques utilisées en vue de la préparation d'autres supports d'affinité destinés à la séparation et à la valorisation de certaines protéines du plasma tel que la fibronectine, la préalbumine, ou bien encore la protéine C...

CONCLUSION GENERALE

Les deux exemples d'application présentés dans ce travail illustrent bien les différents aspects du transfert de technologies mises au point au laboratoire et adaptées à une production industrielle.

Ces deux exemples d'application illustrent également bien les différentes possibilités de l'usage de la chromatographie dans la préparation de composés biologiques à usage thérapeutique. Dans le premier exemple d'application, la chromatographie sert de support à la purification de protéines "déficitaires" comme le facteur VIII. Dans le deuxième exemple d'application, la chromatographie sert de support à l'épuration de protéines "excédentaires" comme l'apolipoprotéine B. Avec ces deux possibilités distinctes mais complémentaires, le champ d'application de la chromatographie dans le domaine biomédical est vaste, et les exemples d'application thérapeutique qui sont encore peu nombreux à l'heure actuelle vont croître au cours des prochaines années, au fur et à mesure des progrès qui seront accomplis dans la caractérisation et le traitement des pathologies liées à des dysfonctionnements d'origine protéique ainsi que dans l'analyse structurale de ces protéines.

La purification et l'utilisation des protéines dépend essentiellement de la résolution des problèmes liés à leur structure. La complexité structurale de ces produits obligent souvent le biochimiste à utiliser des routines de purification de manière empirique puis à sélectionner une méthode particulière de purification en fonction des résultats obtenus. En ce sens, il n'y a pas de règle absolue en matière de purification. Cependant, il est essentiel de planifier une stratégie en fonction des informations recueillies sur la protéine sélectionnée, tout en tenant compte des contraintes de pureté et de rendement ainsi que des exigences économiques du moment.

Pendant longtemps, les techniques de purification des protéines à base de précipitations semi sélectives ont été utilisées avec des résultats plus ou moins satisfaisants, cependant l'arrivée de la chromatographie d'affinité a permis de remettre en question ces techniques de purification de par sa haute spécificité, permettant ainsi de réduire au minimum le nombre des étapes nécessaires à l'obtention du produit désiré. Il ne faut pas pour autant sous estimer le choix du ligand qui intervient pour une grande part dans le coût de production du produit final.

BIBLIOGRAPHIE

1 ADAMOVA I., REGNAULT V., RIVAT C., de SEYSSEL M., STOLTZ J.F., POKROVSKY S.,
Evaluation of affinity sorbents for LDL-apheresis. *In vitro* study.
9th International Symposium on Atherosclerosis, Rosemont, Illinois, October 6-11, 1991, (Abstract).

2 ALAUPOVIC P.,
Structure and function of plasma lipoproteins with particular regard to hyperlipoproteinemias and atherosclerosis.
Ann. Biol. Clin., 1980; 38: 83-93.

3 ALLAIN J.P., FROMMEL D.,
Antibodies to factor VIII. V. patterns of immune response to factor VIII in hemophilia A.
Blood, 1976; 47: 973-982.

4 ANDERSSON L.O., FORSMAN N., HUANG K., LARSEN K., LUNDIN A., PAVLU B., SANDBERG H., SEWERIN K., SMART J.,
Isolation and characterization of human factor VIII: Molecular forms in commercial factor VIII concentrate, cryoprecipitate, and plasma.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1986; 83: 2979-2983.

5 ARONSON D.L.,
The development of the technology and capacity for the production of factor VIII for the treatment of hemophilia A.
Transfusion, 1990; 30: 748-758.

6 ASSOGBA U., DAIROU F., ROTTEMBOURG J., FOURNEL J.J., de GENNES J.L.,
LDL-aphérèse : techniques de traitements, indication et perspectives.
S.T.V., 1991; 3: 467-470.

7 AXEN R.,
Chemical coupling of peptides and proteins to polysaccharides by means of cyanogen halides.
Nature, 1967; 214: 1302-1303.

8 BACH J.F., LESAVRE P.,
Immunologie
Flammarion and Cie Eds, 3e Ed, Paris 1984; 315p.

9 BIHOREAU N., SAUGER A., YON J.M., Van de POL H.,
Isolation and characterization of different activated forms of factor VIII, the human antihemophilic A factor.
Eur. J. Biochem., 1989; 185: 111-118.

10 BILHEIMER D.W., GOLDSTEIN J.L., GRUNDY S.M., STARZL T.E., BROWN M.S.,
Liver transplantation to provide low-density-lipoprotein receptors and lower plasma cholesterol in a child with homozygous familial hypercholesterolemia.
N. Engl. J. Med., 1984; 311: 1658-1664.

11 BLACKHART B.D., LUDWIG E.M., PIEROTTI V.R., CAIATI L., ONASCH M.A., WALLIS S.C., POWELL L., PEASE R., KNOTT T.J., CHU M.L., MAHLEY R.W., SCOTT J., McCARTHY B.J., LEVY-WILSON B.,
Structure of the human apolipoprotein B gene.
J. Biol. Chem., 1986; 261: 15364-15367.

12 BORBERG H., KADAR J., OETTE K.,
The current status of low-density lipoprotein apheresis.
in: Curr. Stud. Hematol. Blood Transf. Basel, NYDEGGER U.E. Ed, Karger, 1990; 57: 239-248.

13 BOSTROM K., BOREN J., WETTESTEN M., SJOBERG A., BONDJERS G., WIKLUND O., CARLSSON P., OLOFSSON S.O.,
Studies on the assembly of Apo B-100-containing lipoproteins in HepG2 cells.
J. Biol. Chem., 1988; 263; 4434-4442.

14 BRADFORD M.M.,
A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.
Anal. Biochem., 1976; 72: 248-254.

15 BRAKE A.J., MERRYWEATHER J.P., COIT D.G., HEBERLEIN U.A., MASIARZ F.R., MULLENBACH G.T., URDEA M.S., VALENZUELA P., BARR P.J.,
α-factor-directed synthesis and secretion of mature foreign proteins in Saccharomyces cerevisiae.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1984; 81: 4642-4646.

16 BRINKHOUS K.M., SHANBROM E., ROBERTS H.R., WEBSTER W.P., FEKETE L., WAGNER R.H.,
A new high potency glycine-precipitated antihemophilic factor (AHF) concentrate.
J. Amer. Med. Assn., 1968; 205: 613-617.

17 BROWN G., ALBERS J.J., FISHER L.D., SCHAEFER S.M., LIN J.T., KAPLAN C., ZHAO X.Q., BISSON B.D., FITZPATRICK V.F., DODGE H.T.,
Regression of coronary artery disease as a result of intensive lipid-lowering therapy in mem with high levels of apolipoprotein B.
N. Engl. J. Med., 1990; 323: 1289-1298.

18 BROWN M.S., GOLDSTEIN J.L.,
How LDL receptors influence cholesterol and atherosclerosis.
Sci. Am., 1985; 87: 52-60.

19 BROWN M.S., GOLDSTEIN J.L.,
A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis.
Science, 1986; 232: 34-47.

20 BURNOUF T., BURNOUF-RADOSEVICH M., HUART J.J., GOUDEMAND M.,
A highly purified factor VIII:c concentrate prepared from cryoprecipitate by ion-exchange chromatography.
Vox Sang., 1991; 60: 8-15.

21 BURNOUF T., MARTINACHE L., GOUDEMAND M.,
L'inactivation des virus dans les fractions plasmatiques à usage thérapeutique.
Nouv. Rev. Fr. Hematol. 1987; 29: 93-96.

22 CAMPOS C.T., MATTS J.P., FITCH L.L., SPEECH J.C., LONG J.M., BUCHWALD H., et coll.,
Lipid results of partial ileal bypass in patients with heterozygous, type II-A hyperlipoproteinemia.
Surgery, 1990; 108: 601-611

23 CHEN S.H., HABIB G., YANG C.Y., GU Z.W., LEE B.R., WENG S.A., SILBERMAN S.R., CAI S.J., DESLYPERE J.P., ROSSENEU M., GOTTO A.M., LI W.H., CHAN L.,3
Apolipoprotein B-48 is the product of a messenger RNA with an organ-specific in-frame stop codon.
Science, 1987; 238: 363-366.

24 CIENFUEGOS J.A., PARDO F., TURRION V.S., ARDAIZ J., MORA N.P., ESCARTIN P., GARRIDO A., BARRIOS C., CUERVAS-MONS V.,
Metabolic effects of liver replacement in homozygous familial hypercholesterolemia.
Transplant. Proc., 1987; 19: 3815-3817.

25 CLAUSS A.,
Gerinnungsphysiologische schnellmethode zur bestimmung des fibrinogens.
Acta. Haemat., 1957; 17: 237-247.

26 COHEN S.N.,
The manipulation of genes.
Sci. Am., 1975; 233: 24-33.

27 COHN E.J., STRONG L.E., HUGHES W.L. Jr, MULFORD D.J., ASHWORTH J.N., MELIN M., TAYLOR H.L.,
Preparation and properties of serum and plasma proteins. IV. A system for the separation into fractions of the protein and lipoprotein components of biological tissues and fluids.
J. Am. Chem. Soc., 1946; 68: 459-475.

28 CUATRECASAS P., WILCHEK M., ANFINSEN C.B.,
Selective enzyme purification by affinity chromatography.
Biochemistry, 1968; 61: 636-643.

29 DAIROU F.,
Les traitements hypolipidémiants.
Presse Med., 1987; 16; 1277-1281.

30 DAIROU F., ROTTEMBOURG J., de GENNES J.L., ASSOGBA U., BRUCKERT E., JACOBS C., TRUFFERT J.,
Comparaison des traitements des formes sévères d'hypercholestérolémie familiale par échange plasmatique total et épuration sélective des lipoprotéines de basse densité (LDL aphérèse).
Presse Med., 1988; 17; 1679-1682.

31 DAVIE E.W., FUJIKAWA K.,
Basic mechanisms in blood coagulation.
Ann. Rev. Biochem., 1975; 44: 799-829.

32 EATON D., RODRIGUEZ H., VEHAR G.A.,
Proteolytic processing of human factor VIII. Correlation of specific cleavages by thrombin factor Xa, and activated protein C with activation and inactivation of factor VIII coagulant activity.
Biochemistry, 1986; 25: 505-512.

33 EATON D.L., VEHAR G.A.,
Factor VIII structure and proteolytic processing.
Prog. Haemost. Thromb., 1986; 8: 47-70

34 EATON D.L., WOOD W.I., EATON D., HASS P.E., HOLLINGSHEAD P., WION K., MATHER J., LAWN R.M., VEHAR G.A., GORMAN C.,
Construction and characterization of an active factor VIII variant lacking the central one-third of the molecule.
Biochemistry, 1986; 25: 8343-8347.

35 EDELMAN G.M.,
The structure and function of antibodies.
Sci. Am., 1970; 223: 34-42.

36 EDELMAN G.M.,
Antibody structure and molecular immunology.
Science, 1973; 180: 830-839.

37 EDWARDS C.A., PIET M.P.J., CHIN S., HOROWITZ B.,
Tri (n-butyl) phosphate/detergent treatment of licensed therapeutic and experimental blood derivatives.
Vox Sang., 1987; 52: 53-59.

38 EINARSSON K., ERICSSON S., EWERTH S., REIHNER E., RUDLING M., STAHLBERG D., ANGELIN B.,
Bile acid sequestrants : mechanisms of action on bile acid and cholesterol metabolism.
Eur. J. Clin. Pharmacol., 1991; 40 (suppl; 1): S53-S58.

39 EISENHAUER T., ARMSTRONG V.W., WIELAND H., FUCHS C., SCHELER F., SEIDEL D.,
Selective removal of low density lipoproteins (LDL) by precipitation at low pH: First clinical application of the HELP system.
Klin. Wochenschr., 1987; 65: 161-168.

40 ERLICH D., AUBERT I., NEEL D., SCROBOHACI M.L., LOREAU J., BUSSEL A., ROUFFY J., DREUX C., GOUSSAULT Y., WEINTRAUB H.,
Some aspects of the use of dextran sulfate-cellulose columns for the treatment of familial hypercholesterolemia.
Clin. Chim. Acta, 1991; 201: 169-174.

41 FAY P.J., CHAVIN S.I., SCHROEDER D., YOUNG F.E., MARDER V.J.,
Purification and characterization of a highly purified human factor VIII consisting of a single type of polypeptide chain.
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 1982; 79: 7200-7204.

42 FOSTER P.A., FULCHER C.A., HOUGHTEN R.A., ZIMMERMAN T.S.,
An immunogenic region within residues Val1670-Glu1684 of the factor VIII light chain induces antibodies which inhibit binding of factor VIII to von Willebrand factor.
J. Biol. Chem., 1988; 263: 5230-5234.

43 FOSTER P.A., ZIMMERMANN T.S.,
Factor VIII structure and function.
Blood Rev., 1989; 3: 180-191.

44 FOSTER P.R., DICKSON I.H., Mc QUILLAN T.A., PROWSE C.V., BOULTON F.E., GREEDHARRY P., BLOOM A.L.,
Studies on the stability of VIII:c during the manufacture of a factor VIII concentrate for clinical use.
Vox Sang., 1988; 55: 81-89.

45 FREDRICKSON D.S., LEES R.S.,
A system for phenotyping hyperlipoproteinemia.
Circulation, 1965; XXXI: 321-327.

46 FUJIKAWA K., COAN M.H., LEGAZ M.E., DAVIE E.W.,
The mechanism of activation of bovine factor X (Stuart factor) by intrinsic and extrinsic pathways.
Biochemistry, 1974; 13: 5290-5299.

47 FULCHER C.A., ZIMMERMAN T.S.,
Characterization of the human factor VIII procoagulant protein with a heterologous precipitating antibody.
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 1982; 79: 1648-1652.

48 GELLIS S.S., NEEFE J.R., STOKES J.J., STRONG L.E., JANEWAY C.A., SCATCHARD G.,
Chemical, clinical, and immunological studies on the products of human plasma fractionation. XXXVI Inactivation of the virus of homologous serum hepatitis in solutions of normal human serum albumin by means of heat.
J. Clin. Invest., 1948; 27: 239-244.

49 de GENNES J.L., DAIROU F., TRUFFERT J.,
Portacaval shunt in homozygous familial hypercholesterolemia.
in: Arteriosclerosis Brain Disease; GREPALDI G., FELLIN R, OLSSON A.G., TUFFANO G. Eds, Raven Press, New York 1983: 32.

50 de GENNES J.L., TOURAINE R., MAUNAND B., TRUFFERT J., LAUDAT Ph.,
Formes homozygotes cutanéo-tendineuses de xanthomatose hypercholestérolémique dans une observation familiale exemplaire : Essai de plasmaphérèse à titre de traitement héroïque.
Bull. Mem. Soc. Hôp. Paris, 1967; 118: 1377-1402.

51 GIROT P., MOROUX Y., POURADIER DUTEIL X., NGUYEN C., BOSCHETTI E.,
Composite affinity sorbents and their cleaning in place.
J. Chromatogr., 1990; 510: 213-223.

52 GITSCHIER J., WOOD W.I., GORALKA T.M., WION K.L., CHEN E.Y., EATON D.H., VEHAR G.A., CAPON D.J., LAWN R.M.,
Characterization of the human factor VIII gene.
Nature, 1984; 312: 326-330.

53 GITSCHIER J., WOOD W.I., TUDDENHAM E.G.D., SHUMAN M.A., GORALKA T.M., CHEN E.Y., LAWN R.M.,
Detection and sequence of mutations in the factor VIII gene of haemophiliacs.
Nature, 1985; 315: 427-430.

54 GOEDDEL D.V., HEYNEKER H.L., HOZUMI T., ARENTZEN R., ITAKURA K., YANSURA D.G., ROSS M.J., MIOZZARI G., CREA R., SEEBURG P.H.,
Direct expression in Escherichia coli of a DNA sequence coding for human growth hormone.
Nature, 1979; 281: 544-548.

55 GORDON B.R., SLOAN B.J., PARKER T.S., SAAL S.D., LEVINE D.M., RUBIN A.L.,
Humoral immune response following extracorporeal immunoadsorption therapy of patients with hypercholesterolemia.
Transfusion, 1990; 30: 327-332.

56 GORNALL A.G., BARDSWILL C.J., DAVID M.M.,
Determination of serum proteins by means of the biuret reaction.
J. Biol. Chem., 1949; 177: 751-766.

57 GOUDEMAND M.,
Les fractions coagulantes.
Encycl. Méd. Chir. (Paris, France), Sang. 13022 G^{10}, 1987; 3: 12p.

58 GRAHAM J.B., GREEN P.P., MacGRAW R.A., DAVIS L.M.,
Application of molecular genetics to prenatal diagnosis and carrier detection in the hemophilias : Some limitations.
Blood, 1985; 66: 759-764.

59 GRAM H.C.,
New method for determination of fibrin percentage in blood and plasma
J. Biol. Chem., 1921; 49: 279-295.

60 GRIFFITH M., LIU S., MESLUND G., TSANG I., LETTELIER D., BERKEBILE R.,
Preparation of high specific activity plasma AHF by anti F VIIIc immunoaffinity chromatography.
XIth International Congress on Thrombosis and Haemostasis, Bruxelles, July 4-11, 1987, (Abstract).

61 HAMER R.J., KOEDAM J.A., BEESER-VISSER N.H., BERTINA R.M., VAN MOURIK J.A., SIXMA J.J.,
Factor VIII binds to von Willebrand factor via its Mr-80 000 light chain.
Eur. J. Biochem., 1987; 166: 37-43.

62 HAMER R.J., KOEDAM J.A., BEESER-VISSER N.H., SIXMA J.J.,
The effect of thrombin on the complex between factor VIII and von Willebrand factor.
Eur. J. Biochem., 1987; 167: 253-259.

63 HERBERT P.N., ASSMANN G., GOTTO A.M. jr, FREDRICKSON D.S.,
In: The metabolic basis of inherited disease; STANBURY J.B., WYNGAARDEN J.B., FREDRICKSON D.S., GOLDSTEIN J.L., BROWN M.S. Eds. 5th Ed., McGraw-Hill, New York, 1982: 589-651.

64 HEUKESHOVEN J., DERNICK R.,
Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining.
Electrophoresis, 1985; 6: 103-112.

65 HOBBS H.H., RUSSELL D.W., BROWN M.S., GOLDSTEIN J.L.,
The LDL receptor locus in familial hypercholesterolemia : Mutational analysis of a membrane protein.
Ann. Rev. Genet., 1990; 24: 133-170.

66 HOEG J.M., MENG M.S., RONAN R., DEMOSKY S.J. Jr, FAIRWELL T., BREWER H.B. Jr.,
Apolipoprotein B synthetized by Hep G2 cells undergoes fatty acid acylation.
J. Lip. Res., 1988; 29: 1215-1220.

67 HOMBACH V., BORBERG H., GADZKOWSKI A., OETTE K., STOFFEL W.,
Regression der koronarsklerose bei familiärer hypercholesterinämie IIa durch spezifische LDL-Apherese.
Dtsch. Med. Wochenschr., 1986; 45: 1709-1715.

68 HOMMA Y., MIKAMI Y., TAMACHI H., NAKAYA N., NAKAMURA H., GOTTO Y.,
Comparison of selectivity of LDL removal by double filtration and dextran-sulfate cellulose column plasmapheresis, and changes of subfractionated plasma lipoproteins after plasmapheresis in heterozygous familial hypercholesterolemia.
Metabolism, 1987; 36: 419-425.

69 HORNSEY V.S., GRIFFIN B.D., PEPPER D.S., MICKLEM L.R., PROWSE C.V.,
Immunoaffinity purification of factor VIII complex.
Thromb. Haemost., 1987; 57: 102-105.

70 HOROWITZ B., WIEBE M.E., LIPPIN A., STRYKER M.H.,
Inactivation of viruses in labile blood derivatives. I. Disruption of lipid-enveloped viruses by tri(n-butyl)phosphate detergent combinations.
Transfusion, 1985; 25: 516-522.

71 HOYER L.W.,
The factor VIII complex : Structure and function.
Blood, 1981; 58: 1-13.

72 HUANG G., LEE D.M., SINGH S.,
Identification of the thiol ester linked lipids in apolipoprotein B.
Biochemistry, 1988; 27: 1395-1400.

73 HULTIN M.B.,
Role of human factor VIII in factor X activation.
J. Clin. Invest., 1982; 69: 950-958.

74 HYNES H.E., OWEN C.A. jr., BOWIE E.J.W., THOMPSON J.H. Jr.,
Purification of human factor VIII by DEAE-cellulose chromatography.
Blood, 1967; 30: 864-865.

75 ILLINGWORTH D.R., SEXTON G.J.,
Hypocholesterolemic effects of mevinolin in patients with heterozygous familial hypercholesterolemia.
J. Clin. Invest., 1984; 74: 1972-1978.

76 INNERARITY T.L., WEISGRABER K.H., ARNOLD K.S., MAHLEY R.W., KRAUSS R.M., VEGA G.L., GRUNDY S.M.,
Familial defective apolipoprotein B-100 : Low density lipoproteins with abnormal receptor binding.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1987; 84: 6919-6923.

77 JACKSON C.M., HANAHAN D.J.,
Studies on bovine factor X. II. Characterization of purified factor X. Observation on some alterations in zone electrophoretic and chromatographic behavior occurring during purification.
Biochem., 1968; 7: 4506-4517.

78 JOHNSON A.J., KARPATKIN M.H., NEWMAN J.,
Preparation of and clinical experience with antihemophilic factor concentrates.
Thromb. Diat. Haemorr., 1969; 35, suppl.: 49-59.

79 JOHNSON I.S.,
Human insulin from recombinant DNA technology.
Science, 1983; 219: 632-637.

80 KALCKAR H.M.,
Differential spectrophotometry of purine compounds by means of specific enzymes III.
J. Biol. Chem., 1947; 196: 461-475.

81 KANE J.P., HARDMAN D.A., PAULUS H.E.,
Heterogeneity of apolipoprotein B : Isolation of a new species from human chylomicrons.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1980; 77: 2465-2469.

82 KANE J.P., HAVEL R.J.,
Treatment of hypercholesterolemia
Ann. Rev. Med., 1986; 37: 427-435.

83 KAUFMAN R.J.,WASLEY L.C., DORNER A.J.,
Synthesis, processing, and secretion of recombinant human factor VIII expressed in mammalian cells.
J. Biol. Chem., 1988; 263: 6352-6362.

84 KNOTT T.J., PEASE R.J., POWELL L.M., WALLIS S.C., RALL S.C. Jr., INNERARITY T.L., BLACKHART B., TAYLOR W.H., MARCEL Y., MILNE R., JOHNSON D., FULLER M., LUSIS A.J., McCARTHY B.J., MAHLEY R.W., LEVY-WILSON B., SCOTT J.,
Complete protein sequence and identification of structural domains of human apolipoprotein B.
Nature, 1986; 323: 734-738.

85 KOHLER G., MILSTEIN C.,
Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity.
Nature, 1975; 256: 495-497.

86 KOHN J., WILCHEK M.,
Procedures for the analysis of cyanogen bromide-activated sepharose or sephadex by quantitative determination of cyanate esters and imidocarbamates.
Anal. Biochem., 1981; 115: 375-382.

87 LAMBRECHT B., MOHR H., KNUVER-HOPF J., SCHMITT H.,
Photoinactivation of viruses in human fresh plasma by phenothiazine dyes in combination with visible light.
Vox Sang., 1991, 60: 207-213.

88 LAURELL C.B.,
Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies.
Anal. Biochem., 1966; 15: 42-52.

89 LOLLAR P., HILL-EUBANKS D.C., PARKER C.G.,
Association of the factor VIII light chain with von Willebrand factor.
J. Biol. Chem., 1988; 263: 10451-10455.

90 LOLLAR P., PARKER C.G.,
Stoichiometry of the porcine factor VIII-von Willebrand factor association.
J. Biol. Chem., 1987; 262: 17572-17576.

91 LUPIEN P.J., MOORJANI S., AWAD J.,
A new approach to the management of familial hypercholesterolaemia : Removal of plasma-cholesterol based on the principle of affinity chromatography.
Lancet, 1976; i: 1261-1265.

92 MABUCHI H., MICHISHITA I., TAKEDA M., FUJITA H., KOIZUMI J., TAKEDA R., TAKADA S., OONISHI M.,
A new low density lipoprotein apheresis system using two dextran sulfate cellulose columns in an automated column regenerating unit (LDL continuous apheresis).
Atherosclerosis, 1987; 68: 19-25.

93 MARCHEBOEUF M.,
Recherches sur les phosphoaminolipides et les stérides du sérum et du plasma sanguins; entraînement des phospholipides, des stérols et des stérides par les diverses fractions au cours du fractionnement des protéides du sérum.
Bull. Soc. Chim. Biol., 1929; 11 : 268-278.

94 MARDER V.J., MANNUCCI P.M., FIRKIN B.J., HOYER L.W., MEYER D.,
Standard nomenclature for factor VIII and von Willebrand factor : A recommendation by the international committee on thrombosis and haemostasis.
Thromb. Haemost., 1985; 54: 871-872.

95 MARTIN A.J.P., SYNGE R.L.M.,
A new form of chromatogram employing two liquid phases.
Biochem. J., 1941; 35:1358-1368.

96 MATHE D., LUTTON C.,
Le cholestérol : Aspects dynamiques et métaboliques.
J. Physiol., Paris, 1984; 79: 41-97.

97 MEJEAN O., FERT V., DELEZAY M., DELAAGE M., CHEBALLAH R., BOURGEOIS A.,
Immunopurification of human factor VIII/vWF complex from plasma.
Thromb. Haemost., 1988; 59: 364-371.

98 MEZDOUR H., PARRA H.J., AGUIE-AGUIE G., FRUCHART J.C.,
La lipoprotéine (a). Un marqueur additionnel de l'athérosclérose.
Ann. Biol. Clin., 1990; 48: 139-153.

99 MICHAEL S.E., TUNNAH G.W.,
The purification of factor VIII (Antihaemophilic Globulin).
Brit. J. Haemat., 1963; 9: 236-244.

100 MICHAEL S.E., TUNNAH G.W.,
The purification of factor VIII (Antihaemophilic Globulin). II. Further purification and some properties of factor VIII.
Brit. J. Haemat., 1966; 12: 115-132.

101 MIDDLETON S.,
Polyelectrolytes and preparation of factor VIIIc.
In: Unresolved problems in hemophilia; FORBES C.B., LOWE G.T., Eds. Lancaster, United Kingdom: MTP Press 1982: 109-120.

102 MIKAELSSON M.E., FORSMAN N., and OSWALDSSON U.,
Human Factor VIII : A calcium linked protein complex.
Blood, 1983; 62: 1006-1015.

103 MILNE R., THEOLIS R. Jr., MAURICE R., PEASE R.J., WEECH P.K., RASSART E., FRUCHART J.C., SCOTT J., MARCEL Y.L.,
The use of monoclonal antibodies to localize the low density lipoprotein receptor-binding domain of apolipoprotein B.
J. Biol. Chem., 1989; 264: 19754-19760.

104 MILWIDSKY B.M.,
A rapid method for the production control of the non-ionic component in synthetic detergents.
Analyst, 1969; 94: 377-386.

105 MOORE S., STEIN W.H.,
Chemical structures of pancreatic ribonuclease and deoxyribonuclease.
Science, 1973; 180: 458-464.

106 MORRISETT J.D., JACKSON R.L., GOTTO A.M. Jr.,
Lipoproteins : Structure and function.
Annu. Rev. Biochem., 1975; 44: 183-207.

107 NEWMAN J., JOHNSON A.J., KARPATKIN M.H., PUSZKIN S.,
Methods for the production of clinically effective intermediate- and high-purity factor VIII concentrates.
Brit. J. Haem., 1971; 21: 1-20.

108 OETTE K., BORBERG H.,
Variables involved in regression of atherosclerosis in familial hypercholesterolemic patients under long-term LDL-apheresis.
Plasma ther. transfus. technol., 1988; 9: 17-23.

109 OLOFSSON S.O., BJURSELL G., BOSTROM K., CARLSSON P., ELOVSON J., PROTTER A.A., REUBEN M.A., BONDJERS G.,
Apolipoprotein B : structure, biosynthesis and role in the lipoprotein assembly process.
Atherosclerosis, 1987; 68: 1-17.

110 PIET M.P.J., CHIN S., PRINCE A.M., BROTMAN B., CUNDELL A.M., HOROWITZ B.,
The use of tri(n-butyl)phosphate detergent mixtures to inactivate hepatitis viruses and human immunodefiency virus in plasma and plasma's subsequent fractionation.
Transfusion, 1990; 30: 591-598.

111 PITTMAN D.D., KAUFMAN R.J.,
Structure-function relationships of factor VIII elucidated through recombinant DNA technology.
Thromb. Haemost., 1989; 61: 161-165.

112 POKROVSKY S.N., ADAMOVA I.Y., BENEVOLENSKAYA G.F.,
Immunosorbents for LDL-apheresis.
Biomat., Art. Cells, Art. Org., 1990; 18: 623-628.

113 POOL J.G., SHANNON A.E.,
Production of high-potency concentrates of antihaemophilic globulin in a closed-bag system.
N. Engl. J. Med., 1965; 273: 1443-1447.

114 PORATH J., FLODIN P.,
Gel filtration : A method for desalting and group separation.
Nature, 1959; 183: 1657-1659.

115 PORATH J., JANSON J.C., LAAS T.,
Agar derivatives for chromatography, electrophoresis and gel-bound enzymes. I. Desulphated and reduced cross-linked agar and agarose in spherical bead form.
J. Chromatogr., 1971; 60: 167-177.

116 PORTER R.R.,
Structural studies of immunoglobulins.
Science, 1973; 180: 713-716.

117 PRINCE A.M., HOROWITZ B., BROTMAN B.,
Sterilisation of hepatitis and HTLV-III viruses by exposure to tri(n-butyl)phosphate and sodium cholate.
Lancet, 1986; 1: 706-710.

118 PRINCE A.M., STEPHAN W., BROTMAN B.,
ß-Propiolactone/ultraviolet irradiation : A review of its effectiveness for inactivation of viruses in blood derivatives.
Rev. Infect. Dis., 1983; 5: 92- 107.

119 REGNAULT V., RIVAT C., MARCILLIER P., PFISTER M., MICHAELY J.P., DIDELON J., SCHOONEMAN F., STOLTZ J.F., SIADAT M.,
Study of parameters involved in specific immunoadsorption of apolipoprotein B.
Int. J. Artif. Organs, 1990; 13: 760-767.

120 REGNAULT V., RIVAT C., MARCILLIER P., SCHOONEMAN F., MICHAELY J.P., STOLTZ J.F., DURAN-FRANZINI F.,
Immunoépuration des apolipoprotéines B. Optimisation de la méthode sur banc d'essai in vitro.
Ann. Med. Int., 1988; 139 (suppl.1);77-79.

121 RIESEN W.F.,
Experience with low-density lipoprotein apheresis by polyclonal and monoclonal anti-apolipoprotein B antibodies and by dextran sulfate cellulose.
in: Curr. Stud. Hematol. Blood Transf. Basel, NYDEGGER U.E. Ed, Karger, 1990; 57: 208-219.

122 ROCK G.A., CRUICKSHANK W.H., TACKABERRY E.S., GANZ P.R., PALMER D.S.,
Stability of VIII:c in plasma : the dependence on protease activity and calcium.
Thromb. Res., 1983; 29: 521-535.

123 ROSS R.,
The pathogenesis of atherosclerosis - an update.
N. Engl. J. Med., 1986; 314: 488-500.

124 ROUFFY J., SAUVANET J.P., CHANU B., BAKIR R., GOY-LOEPER J., SAYA C., PINAROLI F.,
Evaluation à long terme de l'activité hypolipidémiante et de la tolérance du fénofibrate.
Nouv. Presse Méd., 1980; 9: 3747-3751.

125 RUSSELL D.W., YAMAMOTO T., SCHNEIDER W.J., SLAUGHTER C.J., BROWN M.S., GOLDSTEIN J.L.,
cDNA cloning of the bovine low density lipoprotein receptor : Feedback regulation of a receptor mRNA.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1983; 80: 7501-7505.

126 RUTTYN Y., BRANDIN M.P., VIJAYALAKSHMI M.A.,
Chromatography of human plasma on aminohexyl Sepharose: Separation of factor VIII/vWf and behaviour of factors II VII IX and X and Antithrombin III.
J. Chromat., Biomed. Appl., 1989; 491: 298-308.

127 SAAL S. D., PARKER T.S., GORDON B.R., STUDEBAKER J., HUDGINS L., AHRENS E.H. Jr., RUBIN A.L.,
Removal of low-density lipoproteins in patients by extracorporeal immunoadsorption.
Am. J. Med., 1986; 80: 583-589.

128 SCHENCK I., KELLER C., HAILER S., WOLFRAM G., ZOLLNER N.,
Reduction of Lp(a) by different methods of plasma exchange.
Klin. Wochenschr., 1988; 66: 1197-1201.

129 SCHIMPF K., MANNUCCI P.M., KREUTZ W., BRACKMANN H.H., AUERSWALD G., CIAVARELLA N., MOSSELER J., DEROSA V., KRAUS B., BRUECKMANN C., MANCUSO G., MITTLER U., HASCHKE F., MORFINI M.,
Absence of hepatitis after treatment with a pasteurized factor VIII concentrate in patients with hemophilia and no previous transfusions.
N. Engl. J. Med., 1987; 316: 918-922.

130 de SEYSSEL M., LEBRETON M., MEJEAN O., GESCHIER C., REGNAULT V., FOLLEA G., MAUREL J.P., ROBERT F., STEFAS E., DELAAGE M., RIVAT C., STOLTZ J.F.,
Immunopurification of factor VIII from a cryoprecipitate or plasma with anti vWF monoclonal antibodies. (Preliminary results).
In: Biotechnology of Plasma Proteins; STOLTZ J.F., RIVAT C. Eds, Editions INSERM, Paris 1989; 175: 295-304.

131 SMITH P.K., KROHN R.I., HERMANSON G.T., MALLIA A.K., GARTNER F.H., PROVENZANO M.D., FUJIMOTO E.K., GOEKE N.M., OLSON B.J., KLENK D.C.,
Measurement of protein using bicinchoninic acid.
Anal. Biochem., 1985; 150: 76-85.

132 SMYTH D.G., STEIN W.H., MOORE S.,
The sequence of amino acid residues in bovine pancreatic ribonuclease : Revisions and confirmations.
J. Biol. Chem., 1963; 238: 227-234.

133 SORIA L.F., LUDWIG E.H., CLARKE H.R.G., VEGA G.L., GRUNDY S.M., McCARTHY B.J.,
Association between a specific apolipoprotein B mutation and familial defective apolipoprotein B-100.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989; 86: 587-591.

134 SOULIER J.P., LARRIEU M.J.,
Nouvelle méthode de diagnostic de l'hémophilie. Dosage des facteurs antihémophiliques A et B.
Le Sang, 1953; 24: 205-215.

135 STARZL T.E., CHASE H.P., PUTNAM C.W., PORTER K.A.,
Portacaval shunt in hyperlipoproteinaemia.
Lancet, 1973; ii: 940-944.

136 STEPHAN W.,
Fractionation of cold-sterilized plasma.
Drug Res., 1982; 32 (II): 799-801.

137 STOFFEL W., BORBERG H., GREVE V.,
Application of specific extracorporeal removal of low density lipoprotein in familial hypercholesterolemia.
Lancet, 1981; II: 105-107.

138 STRYER L.,
Biochemistry
FREEMAN W.H. and Compagny Eds; 2nd edition, San Francisco 1981.

139 SUDHOF T.C., GOLSTEIN J.L., BROWN M.S., RUSSELL D.W.,
The LDL receptor gene : A mosaic of exons shared with different proteins.
Science, 1985; 228: 815-822.

140 TAKEYAMA Y., MALCHESKY P.S., CRESSMAN M.D., YAMASHITA M., HORIUCHI T., USAMI M., KOO A.P., PENCE G., NOSE Y.,
Removal and recovery of cholesterol in thermofiltration.
Int. J. Artif. Organs, 1988; 11: 201-208.

141 TE BOOY M.P.W.M., FABER A., DE JONGE E., WOLTERINK E.P., RIETHORST W., BEUGELING T., BANTJES A., OVER J., KONIG B.W.,
Large-scale purification of factor VIII by affinity chromatography: Optimization of process parameters.
J. Chromat., 1990; 503: 103-114.

142 THOMPSON G.R., MILLER J.P., BRESLOW J.L.,
Improved survival of patients with homozygous familial hypercholesterolaemia treated with plasma exchange.
Brit. Med. J., 1985; 291: 1671-1673.

143 THORELL L., BLOMBACK B.,
Purification of the factor VIII complex.
Thromb. Res., 1984; 35: 431-450.

144 TOOLE J.J., KNOPF J.L., WOZNEY J.M., SULTZMAN L.A., BUECKER J.L., PITTMAN D.D., KAUFMAN R.J., BROWN E., SCHOEMAKER C., ORR E.C., AMPHLETT G.W., FOSTER W.B., COE M.L., KNUTSON G.J., FASS D.N., HEWICK R.M.,
Molecular cloning of a cDNA encoding human antihaemophilic factor.
Nature, 1984; 312: 342-347.

145 TRAKHT I.N., KOVALEVA K.A., JANUSHEVSKAYA E.V., BALMUKHANOV T.S., PRINTSEVA O.Y., PREOBRAZHENSKY S.N., PEKLO M.M., TSIBULSKY V.P., POKROVSKY S.N.,
Investigation of human blood plasma apo B-containing lipoproteins by means of monoclonal antibodies against low density lipoproteins.
Atheros. Rev., 1988; 17: 51-66.

146 TUDDENHAM E.G.D., TRABOLD N.C., COLLINS J.A., HOYER L.W.,
The properties of factor VIII coagulant activity prepared by immunoadsorbent chromatography.
J. Lab. Clin. Med., 1979; 93: 40-53.

147 VAUHKONEN M.,
Complex-type carbohydrates of apolipoprotein-B of human plasma low-density lipoproteins.
Glycoconjugate J., 1986; 3: 35-43.

148 VEGA G.L., GRUNDY S.M.,
In vivo evidence for reduced binding of low density lipoproteins to receptors as a cause of primary moderate hypercholesterolemia.
J. Clin. Invest., 1986; 78: 1410-1414.

149 VEHAR G.A., KEYT B., EATON D., RODRIGUEZ H., O'BRIEN D.P., ROTBLAT F., OPPERMANN H., KECK R., WOOD W.I., HARKINS R.N., TUDDENHAM E.G.D., LAWN R.M., CAPON D.J.,
Structure of human factor VIII.
Nature, 1984; 312: 337-342.

150 VILLA-KOMAROFF L., EFSTRATIADIS A., BROOME S., LOMEDICO P., TIZARD R., NABER S.P., CHICK W.L., GILBERT W.,
A bacterial clone synthesizing proinsulin.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1978; 75: 3727-3731.

151 WATSON J.D., HOPKINS N.H., ROBERTS J.W., STEITZ J.A., WEINER A.M.,
Biologie moléculaire du gène.
Interéditions Eds; 4e édition, Paris 1989.

152 WEBER K., OSBORN M.,
The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis.
J. Biol. Chem., 1969; 244: 4406-4412.

153 WEISGRABER K.H., RALL S.C. Jr.,
Human apolipoprotein B-100 heparin-binding sites.
J. Biol. Chem., 1987; 262: 11097-11103.

154 WHITE G.C., McMILLAN C.W., KINGDON H.S., SHOEMAKER C.B.,
Use of recombinant antihemophilic factor in the treatment of two patients with classic hemophilia.
N. Engl. J. Med., 1989; 320:166-170.

155 WHITE G.C., SHOEMAKER C.B.,
Factor VIII gene and hemophilia A.
Blood, 1989; 73: 1-12.

156 WIKLUND O., ANGELIN B., FAGER G., ERIKSSON M., OLOFSSON S.-O., BERGLUND L., LINDEN T., SJOBERG A., BONDJERS G.,
Treatment of familial hypercholesterolaemia : a controled trial of the effects of pravastatin or cholestyramine therapy on lipoprotein and apolipoprotein levels.
J. Int. Med., 1990; 228: 241-247.

157 WURZNER R., SCHUFF-WERNER P., FRANZKE A., NITZE R., OPPERMANN M., ARMSTRONG V.W., EISENHAUER T., SEIDEL D., GOTZE O.,
Complement activation and depletion during LDL-apheresis by Heparin-induced extracorporeal LDL-precipitation (HELP).
Eur. J. Clin. Invest., 1991; 21: 288-294.

158 WOOD W.I., CAPON D.J., SIMONSEN C.C., EATON D.L., GITSCHIER J., KEYT B., SEEBURG P.H., SMITH D.H., HOLLINGSHEAD P., WION K.L., DELWART E., TUDDENHAM E.G.D., VEHAR G.A., LAWN R.M.,
Expression of active human factor VIII from recombinant DNA clones.
Nature, 1984; 312: 330-336.

159 YAMAMOTO T., DAVIS C.G., BROWN M.S., SCHNEIDER W.J., CASEY M.L., GOLDSTEIN J.J., RUSSEL D.W.,
The human LDL receptor : A cysteine-rich protein with multiple Alu sequences in its mRNA.
Cell, 1984; 39: 27-38.

160 YANG C.Y., CHEN S.H., GIANTURCO S.H., BRADLEY W.A., SPARROW J.T., TANIMURA M., LI W.H., SPARROW D.A., DELOOF H., ROSSENEU M., LEE F.S., GU Z.W., GOTTO A.M., CHAN L.,
Sequence, structure, receptor-binding domains and internal repeats of human apolipoprotein B-100.
Nature, 1986; 323: 738-742.

161 YANG C.Y., GU Z.W., WENG S.A., KIM T.W., CHEN S.H., POWNALL H.J., SHARP P.M., LIU S.W., LI W.H., GOTTO A.M. jr, CHAN L.,
Structure of apolipoprotein B-100 of human low density lipoproteins.
Arteriosclerosis, 1989; 9: 96-108.

162 YOKOHAMA S., HAYASHI R., SATANI R., YAMAMOTO A.,
Selective removal of low density lipoprotein (LDL) by plasmapheresis in familial hypercholesterolemia.
Arteriosclerosis, 1985; 5: 613-621.

163 YOUNG R.A., DAVIS R.W.,
Efficient isolation of genes by using antibody probes.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1983; 80: 1194-1198.

164 YOUNG S.G.,
Recent progress in understanding apolipoprotein B.
Circulation, 1990; 82: 1574-1594.

165 ZANNIS V.I.,
Molecular biology of human apolipoproteins B and E and associated diseases of lipoprotein metabolism.
Adv. Lip. Res., 1989; 23: 1-64.

UNIVERSITE DE NANCY I
FACULTE DE MEDECINE

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE NANCY I

de Monsieur DE SEYSSEL Marc

Mention : GENIE BIOLOGIQUE

AUTORISE A IMPRIMER LA THESE

Nancy, le 14 AVR. 1992 n°125

LE PRESIDENT DE L'UNIVERSITE DE NANCY I

UNIVERSITE NANCY I
LE PRESIDENT

Professeur M. BOULANGÉ

RESUME

L'utilisation de techniques chromatographiques dans la préparation des composés biologiques à usage thérapeutique a permis d'améliorer aussi bien la purification de protéines plasmatiques que le traitement du plasma par épuration en circulation extracorporelle.

Dans le premier exemple d'application destiné à la préparation du facteur VIII antihémophilique, l'insertion d'une étape chromatographique par échangeur d'anions fort a été réalisée dans le procédé classique de purification. Cette étape permet d'obtenir un concentré de facteur VIII de très haute pureté à partir de cryoprécipité. L'optimisation de cette étape au laboratoire a permis de réaliser sa transposition à l'échelle pilote. Le facteur VIII ainsi obtenu possède une activité spécifique de 150 UI/mg de protéines pour un rendement global de 25%. De plus ce composé a été soumis à une inactivation des virus par solvant/détergent.

Dans le second exemple d'application destiné au traitement de l'hypercholestérolémie familiale, la fabrication de supports chromatographiques à base d'anticorps polyclonaux de chèvre a été réalisée pour permettre le traitement du plasma par immunoépuration du LDL-cholestérol. Des colonnes de 300 ml ont été fabriquées par fixation de 5 mg d'anti Apo B/ ml de Sepharose CL-4B activé au BrCN dans des conditions strictes de stérilité et d'apyrogénicité. Une étude comparative réalisée *in vitro* avec 5 adsorbants utilisés en LDL-aphérèse (Héparine Sepharose, Sulfate de Dextran-Cellulose et 3 immunoadsorbants à base d'anticorps polyclonaux ou monoclonaux) révèle une capacité d'adsorption similaire (4 mg d'Apo B/ml de gel) mais une meilleure sélectivité des immunoadsorbants.

MOTS CLES : Chromatographie, Echange d'ions, Facteur VIII, Inactivation des virus, LDL-aphérèse, Immunoadsorption, Hypercholestérolémie familiale, Transfert technologique.