

**UNIVERSITÉ PARIS-SUD**

**Faculté de pharmacie de Châtenay-Malabry**

**Année universitaire : 2014-2015**

**Master 1 de recherche**

**Étude par électrophorèse 2D des glycoformes de  
l'antithrombine et de la protéine C plasmatiques dans le  
choc septique avec ou sans *Purpura fulminans***

**Laboratoire d'accueil  
UMR-S-1193 INSERM (Equipe du Pr.Christian Poüs)  
Physiopathogenèse et traitement des maladies du foie**

**Etudiante : Asma BLEL**

**Maîtres de stage :**

**Pr Delphine BORGEL  
Dr Arnaud BRUNEEL**

## **REMERCIEMENTS**

Je remercie d'abord Delphine Borgel de m'avoir accepté sans hésitation pour ce stage de recherche, d'avoir donné confiance en moi et de m'avoir fourni tout les moyens pour avancer dans ce travail.

Je remercie également Arnaud Bruneel pour sa disponibilité (même pendant ses vacances !), ses encouragements continus, sa patience, ses conseils et tous les apprentissages qu'il m'a prodigués.

Je remercie toute l'équipe du laboratoire (Ameetha, Anita, Antoine, Béatrice, Benjamin, Christian, Daniel, Hélène, Ingrid, Isabelle, Najat...) pour leur accueil chaleureux, leur aide précieuse, l'ambiance agréable qu'ils créaient et tous les bons moments qu'ils m'ont fait vivre.

Je remercie enfin, avec beaucoup d'amour et de reconnaissance, mes parents, mon mari, ma famille et toute personne qui a donné de sa vie pour ma vie. Ils ont généreusement contribué à mon épanouissement moral, social et académique. Je n'aurais jamais accompli de succès sans leur aide.

*N'allez pas là où le chemin peut mener. Allez là où il n'y a pas de chemin et laissez une trace.*

*Ralph Waldo Emerson*

# SOMMAIRE

- I. LISTE DES ABRÉVIATIONS
  
- II. INTRODUCTION
  - 1. La coagulation sanguine
    - a. Cascade
    - b. Régulation
  - 2. L'antithrombine
    - a. Structure
    - b. Fonction
  - 3. La protéine C
    - a. Structure
    - b. Fonction
  - 4. La glycosylation des protéines
    - a. La glycosylation de l'antithrombine
    - b. La glycosylation de la protéine C
  - 5. Le sepsis
  - 6. Le *purpura fulminans*
  - 7. Les CDG
  - 8. Objectif de l'étude
  
- III. MATERIELS ET METHODES
  - 1. Patients inclus dans l'étude
  - 2. Electrophorèse bi-dimensionnelle
    - a. Principe
    - b. Matériel et protocole technique
  
- IV. RESULTATS ET INTERPRETATION
  - 1. Résultats pour l'AT
    - a. Dans le choc septique
    - b. Dans les CDG
  - 2. Résultats pour la PC
  
- V. DISCUSSION ET PERSPECTIVES
  
- VI. CONCLUSIONS
  
- VII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

## I. LISTE DES ABREVIATIONS

Asn :	Asparagine
AT :	Antithrombine
BSA :	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CDG :	<i>Congenital Disorder of Glycosylation</i>
CHAPS :	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate
CIVD :	Coagulation Intra-Vasculaire Disséminée
DTT :	Dithiotréitol
EGF :	<i>Epidermal Growth Factor</i>
Glc :	Glucose
GlcNac :	N-acétylglucosamine
ECL:	<i>Enhanced ChemiLuminescence</i>
EGF :	<i>Epithelial Growth Factor</i>
F :	femme
FT :	Facteur Tissulaire
H :	homme
HRP :	<i>HorseRadish Peroxidase</i>
IEF :	Isoélectrofocalisation
IPG :	<i>Immobilized pH Gradient</i>
KHPM :	Kininogène de Haut Poids Moléculaire
LPS :	LipoPolySaccharide
Man :	Mannose
PAGE-SDS :	PolyAcrylamid Gel Electrophoresis – Sodium Dodecyl Sulfate
PAMP :	<i>Pathogen Associated Molecular Patterns</i>
PC :	Protéine C
Pca :	Protéine C activée
PF :	<i>Purpura Fulminans</i>
pI :	Point isoélectrique
PK :	Prékallikréine
PM :	Poids Moléculaire
PS :	Protéine S
PVDF :	Polyfluorure de vinylidène
RE :	Réticulum endoplasmique
SC :	<i>Single Chain</i>
Serpine :	<i>Serine Protease Inhibitor</i>
SIRS :	<i>Systemic Inflammatory Response Syndrome</i>
TFPI :	<i>Tissue Factor Pathway Inhibitor</i>

## II. INTRODUCTION

### 1. La coagulation sanguine

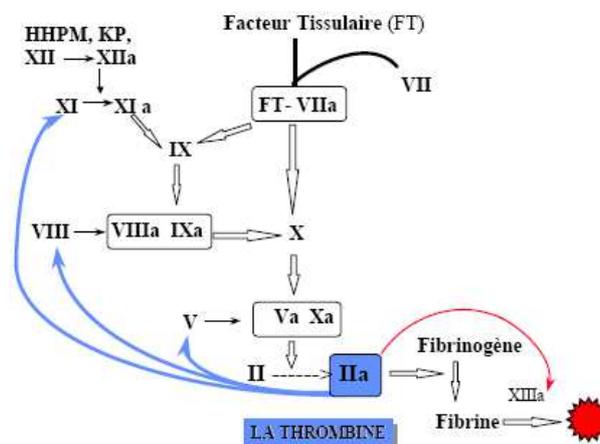
L'hémostase est l'ensemble des mécanismes qui concourent à maintenir le sang à l'état fluide à l'intérieur des vaisseaux (arrêter les hémorragies et empêcher les thromboses).

La coagulation est le deuxième temps de l'hémostase (encore appelée hémostase secondaire), le premier temps étant l'hémostase primaire au cours duquel se forme le clou plaquettaire (ou thrombus blanc) riche en plaquettes et pauvre en fibrine.

Ce thrombus blanc est consolidé par la coagulation pour se transformer en thrombus rouge (car riche en globules rouges) constitué essentiellement d'un réseau de fibrine. La coagulation met en jeu plusieurs acteurs notamment l'endothélium vasculaire, des cytokines et les facteurs de la coagulation qui sont des pro-enzymes synthétisés essentiellement par le foie.

#### a. Cascade de la coagulation

La coagulation est une cascade de réactions enzymatiques activant les facteurs de la coagulation et aboutissant à la formation de fibrine (Figure 1). Schématiquement, il existe deux voies d'activation de ce processus : la voie intrinsèque et la voie extrinsèque se réunissant en une voie commune avec la formation du complexe prothrombinase (facteur Xa et facteur Va) qui transforme la prothrombine (facteur II) en thrombine (facteur IIa). La génération de la fibrine (Ia) à partir du fibrinogène (I) est assurée par la thrombine. La thrombine est responsable, par ailleurs, de l'amplification de la coagulation en favorisant sa propre formation (favorise la génération des facteurs VIIIa, Va, XIa) et de la stabilisation du caillot formé (active le facteur XIII).



**Figure 1 : Cascade de la coagulation**  
(cours "Physiologie de l'hémostase" J.F.Schved)

La coagulation peut être activée, dans certaines situations pathologiques comme le sepsis, par les PAMP comme le LPS de la paroi des bactéries Gram négatif et les exotoxines induisant une expression anormale de FT sur les monocytes, les macrophages et les plaquettes.<sup>1</sup>

## b. Régulation de la coagulation

La coagulation plasmatique a tendance à s'activer spontanément. Les enzymes formés lors de cette activation (thrombine, FX activé) ne doivent pas circuler librement dans le plasma au risque d'entraîner une activation diffuse de la coagulation et un processus pathologique grave comme la CIVD. Afin d'éviter une telle activation diffuse de la coagulation, un système de régulation est mis en jeu.

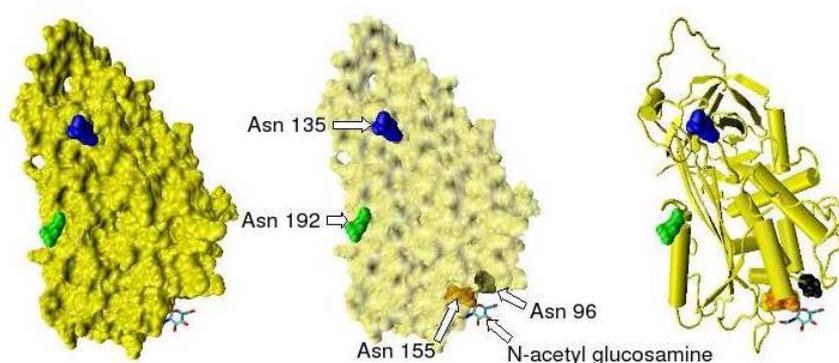
On connaît trois systèmes inhibiteurs<sup>2</sup>:

- Le système antithrombine
- Le système protéine C et protéine S
- Le système TFPI

## 2. L'antithrombine

### a. Structure

Il s'agit d'un monomère protéique de masse moléculaire d'environ 58 kDa<sup>3</sup> (Figure 2). Elle contient 3 ponts disulfure intra-chaîne<sup>4</sup>, 4 sites de N-glycosylation mais aucun site de O-glycosylation n'a été identifié<sup>3</sup>. Aucune phosphorylation ni sulfatation de la protéine n'est connue.



**Figure 2 : Structure de l'AT et sites de N-glycosylation**  
(Source : Wikipédia)

Cheng-Ming Tsao\_Acta Anaesthesiologica Taiwanica\_2014<sup>1</sup>

Marcel Schouten\_Journal of Leukocyte Biology\_2008<sup>2</sup>

Kremser L\_Electrophoresis\_2003<sup>3</sup>

www.uniprot.org/uniprot/P01008<sup>4</sup>

## Fonctions de l'AT

L'AT est l'inhibiteur physiologique le plus important de la coagulation sanguine<sup>3</sup>. Il est présent dans le plasma humain à une concentration physiologique de l'ordre de 150 mg/L. Elle est synthétisée par les hépatocytes et elle appartient à la famille des serpinés<sup>5</sup>.

Comme indiqué Figure 3, elle inhibe principalement le facteur IIa mais aussi le facteur Xa, le facteur IXa et partiellement le facteur XIa. Son activité anticoagulante est augmentée de façon très importante par l'héparine. Les déficits homozygotes en AT sont des maladies sévères responsables de thromboses veineuses et artérielles qui peuvent survenir dès l'enfance. Elle présente également des propriétés anti-inflammatoires et des études suggèrent un rôle de l'AT dans le contrôle de l'angiogenèse<sup>3</sup>.

L'effet anti-inflammatoire de l'AT peut être expliqué par l'inhibition de la thrombine, ou l'inhibition du facteur XIIa et de la kallikréine qui active les neutrophiles.<sup>6</sup>

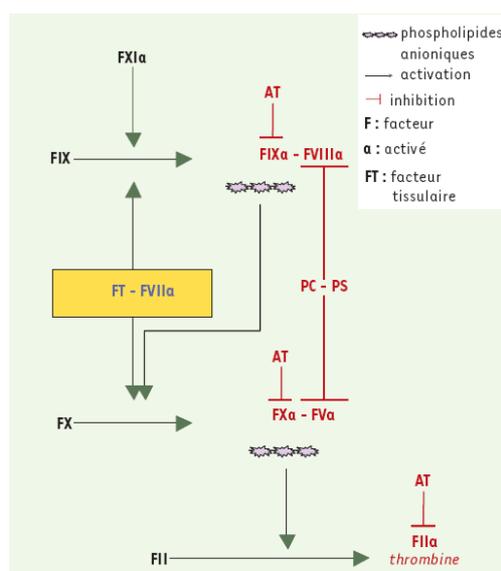


Figure 3: Mécanisme de régulation de la production de thrombine par l'AT, la PC et la PS<sup>5</sup>

### 3. La protéine C

#### a. Structure<sup>7</sup> :

La PC circule dans le sang majoritairement sous la forme d'un hétérodimère composé d'une chaîne lourde – de PM 41 kDa – et d'une chaîne légère – de PM 21 kDa –

Martine Aiach \_ Medecine/Sciences \_ 2006<sup>5</sup>

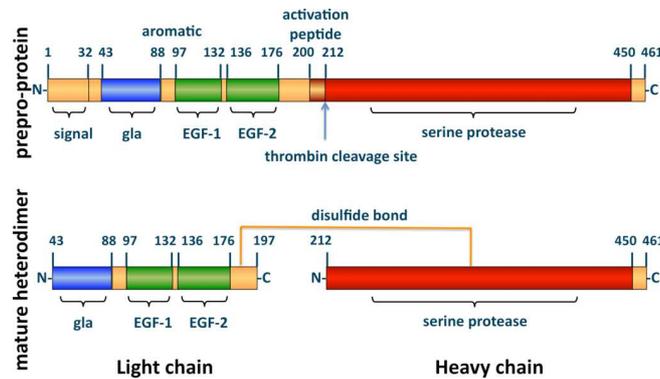
Y. Ozier \_ MAPAR \_ 1999<sup>6</sup>

Kevin E. Van Cott \_ Journal of molecular recognition \_ 1996<sup>7</sup>

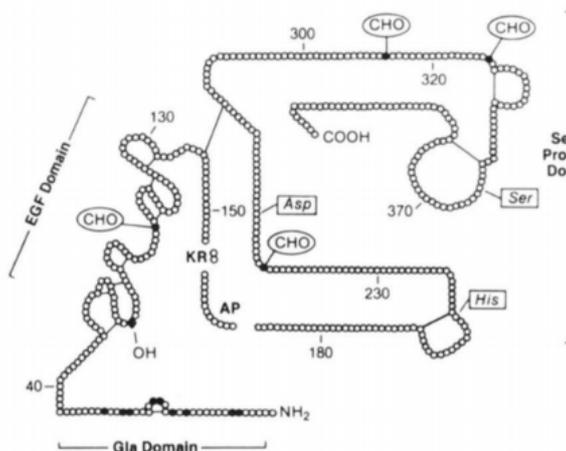
reliées par un pont disulfure entre la Cys<sup>183</sup> et la Cys<sup>319</sup> (Figures 4 et 5). Une faible proportion (5 à 10 %) circule sous forme de monomère (SC) de PM 55-68 kDa traduisant l'absence de clivage du dipeptide Lys<sup>198</sup>-Arg<sup>199</sup> normalement effectué au cours des modifications post-traductionnelles.

L'activation du zymogène est catalysée par le complexe thrombine-thrombomoduline au niveau de la surface endothéliale (grâce au récepteur endothélial de la PC : EPCR) afin d'acquérir une activité sérine protéase (Figure 6). Cette activation correspond au clivage d'un dodécapeptide (de PM ~1,4 kDa) au niveau de l'extrémité N-terminale de la chaîne lourde.

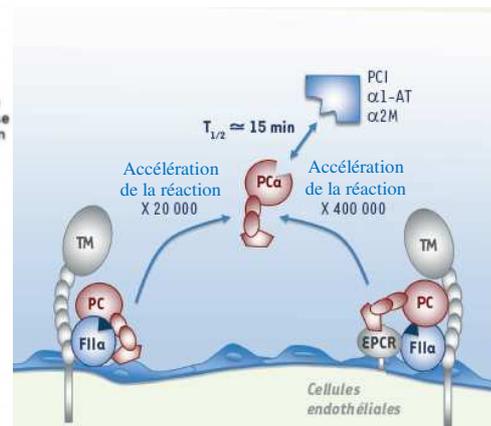
La PC présente 11 ponts disulfures intra-chaînes (en plus du pont inter-chaîne), 4 sites de N-glycosylation ainsi qu'un site de O-glycosylation. Alors que la chaîne légère contient un domaine Gla (Gamma carboxylation vitamine K dépendante de 9 résidus acides glutamiques) et deux domaines EGF-like, la chaîne lourde, elle, contient le site catalytique (domaine sérine protéase) (Figure 4).



**Figure 4: Transformation de la PC d'un monomère inactif à un hétérodimère activé**  
(Source : Wikipédia)



**Figure 5 : structure primaire de la PC** <sup>8</sup>



**Figure 6 : Activation de la PC** <sup>9</sup>

Brian W. Grinell \_ The journal of biological chemistry \_ 1991 <sup>8</sup>  
Delphine Borgel \_ Medecine/Sciences \_ 2011 <sup>9</sup>

## b. Fonction de la PC<sup>9</sup> :

A des taux plasmatiques relativement faibles (4 mg/L), la PC, une fois activée peut dégrader les cofacteurs Va et VIIIa indispensables à la phase d'amplification de la cascade de la coagulation et limiter ainsi la génération de thrombine (Figure 7). Cet effet est potentialisé par la présence d'un cofacteur de la PCa, la PS, une protéine elle aussi vitamine K dépendante.

D'autres propriétés de la PC ont été décrites, notamment un rôle anti-inflammatoire, anti-apoptotique et cytoprotecteur.

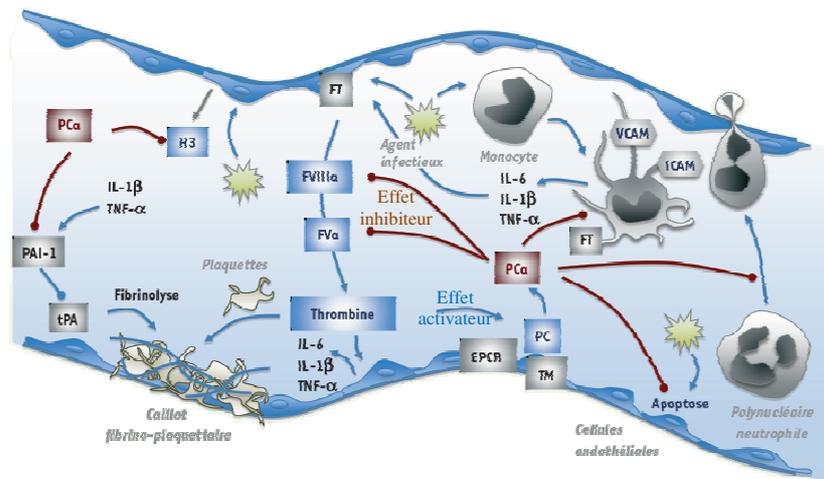


Figure 7 : Effets de la PCa au cours du sepsis<sup>9</sup>

## 4. La glycosylation des protéines

La glycosylation des protéines est une modification co- et post-traductionnelle qui commence au niveau du RE et se poursuit dans l'appareil de Golgi. Elle consiste en une greffe de chaînes glycanes sur des résidus d'acides aminés. Selon les sites d'ancrage, on distingue différents types de glycosylation dont les plus connus (et courants) sont la N-glycosylation et la O-glycosylation.

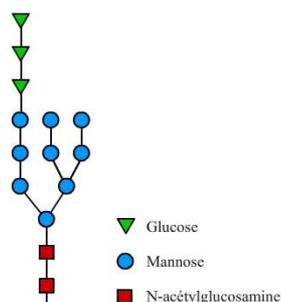
Les chaînes liées par des liaisons O-glycosidiques sont plus courtes (1 à 3 résidus d'oses) et plus variables que celles liées par des liaisons N-glycosidiques qui peuvent former des arborescences<sup>10</sup>.

La N-glycosylation se fait sur le groupement NH<sub>2</sub> d'un résidu asparagine d'une séquence consensus -N-X-S/T- (X = acide aminé autre que la proline). L'oligosaccharide greffé dans le RE est une unité stéréotypée de 14 résidus glucidiques comprenant : 2 GlcNac, 9 Man et 3 Glc<sup>10</sup> (Figure 8).

Delphine Borgel \_ Medecine/Sciences \_ 2011<sup>9</sup>

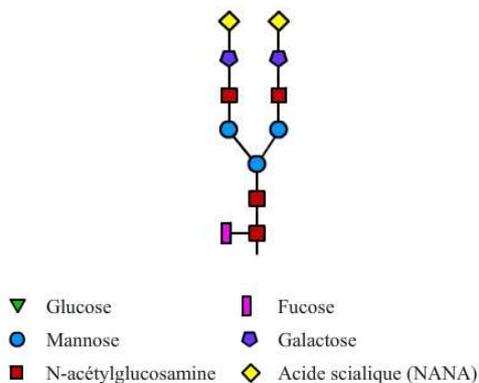
<http://biochimej.univ->

[angers.fr/Page2/COURS/7RelStructFonction/2Biochimie/2ModifPOSTtraduc/8Glycosylation/1Glycosylation.htm](http://angers.fr/Page2/COURS/7RelStructFonction/2Biochimie/2ModifPOSTtraduc/8Glycosylation/1Glycosylation.htm)



**Figure 8 : Arbre glucidique transféré sur la protéine en cours de synthèse dans le RE** <sup>11</sup>

Suite au greffage de la structure à 14 résidus, la maturation de ces glycanes dans l'appareil de Golgi combine le clivage et l'addition d'oses pour aboutir majoritairement à une structure bi-antennée composée de 4 Glc-Nac, 3 Man, 2 Gal et 2 acides sialiques terminaux (Figure 9).



**Figure 9: Arbre glucidique mature sur la protéine (Golgi)** <sup>12</sup>

Les N-glycoformes secrétées d'une protéine plasmatique diffèrent significativement soit par leur masse, selon le nombre de chaînes glycanes (déterminé au niveau du RE), soit par leur charge, selon le nombre d'acides sialiques terminaux (déterminé au niveau du Golgi).

La structure glycanne des glycoprotéines joue un rôle important dans le repliement des protéines, dans la reconnaissance spécifique d'autres protéines, (notamment les récepteurs cellulaires), dans l'immunogénicité (cas des glycoprotéines à la surface des hématies responsables des groupes sanguins), etc.

La détermination de la structure des glycoprotéines est un travail difficile car chaque ose possède plusieurs hydroxyles libres et chacun peut établir une liaison avec un autre ose ou un autre composé. Parmi les méthodes actuelles d'analyse des glycoprotéines, on peut citer la spectrométrie de masse, la capture par des lectines spécifiques <sup>12</sup> et l'électrophorèse bi-dimensionnelle (2D).

Glycosylation et glycation : quelles différences ? Auteur : Gilles Camus \_ Article publié le : 20 février 2014 <sup>11</sup>  
 Hiroyuki Kaji \_ Nature biotechnology\_2003 <sup>12</sup>

### a. La glycosylation de l'antithrombine

Les 4 sites de N-glycosylation de l'AT sont : l'Asn<sup>96</sup>, l'Asn<sup>135</sup>, l'Asn<sup>155</sup> et l'Asn<sup>192</sup>.

On distingue deux groupes de glycoformes de l'AT : l'isoforme  $\alpha$ , la plus abondante et glycosylée sur les 4 sites, et l'isoforme  $\beta$  (10 %<sup>13</sup>) pour laquelle manque une chaîne N-glycane sur l'Asn<sup>135</sup>. Le PM des deux isoformes diffère de ~2,206 kDa correspondant à une chaîne de 9 monosaccharides avec une structure bi-antennée se terminant par deux acides sialiques (cf. Figure 9). Elles présentent également une affinité différente (plus forte affinité pour la forme  $\beta$ <sup>13</sup>) pour l'héparine permettant de les séparer par chromatographie d'affinité<sup>3</sup>. D'autre part la demi-vie plasmatique de la forme  $\beta$  est plus courte que celle de la forme  $\alpha$ .

Les différences en nombre d'acides sialiques terminaux affectent le pI de la protéine. Ainsi, par exemple, entre les isoformes  $\alpha$  et  $\beta$ , en plus de la perte de masse, le groupe d'isoformes  $\beta$  présente des pI plus grands par rapport au groupe  $\alpha$  (moins acides car il y a une perte de deux acides sialiques normalement portés par la chaîne N-glycane sur l'Asn<sup>135</sup>). Une étude en électrophorèse 2D de l'AT<sup>3</sup> (Figure 10) décrit au moins 6 glycoformes pour chacune des isoformes  $\alpha$  et  $\beta$ , confondues en 8 spots sur l'AT totale.

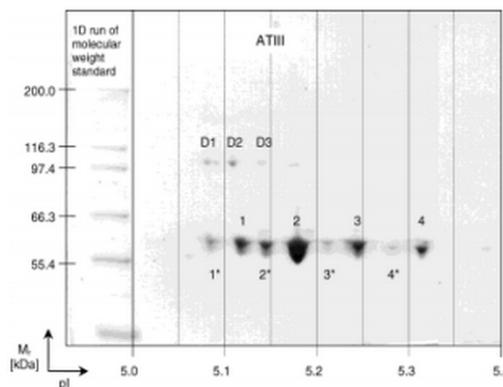


Figure 10 : Electrophorèse 2D de l'AT<sup>3</sup>

### b. La glycosylation de la protéine C

Les 4 sites de N-glycosylation de la PC sont : l'Asn<sup>97</sup> du domaine EGF-like sur la chaîne légère et l'Asn<sup>248</sup>, l'Asn<sup>313</sup> et l'Asn<sup>329</sup> sur la chaîne lourde.

La glycosylation de la PC est déterminante dans son trafic intracellulaire, sa sécrétion et les différentes activités qu'elle exerce. Par exemple, la glycosylation du site Asn<sup>248</sup> affecte le site de clivage KR (Lys-Arg). D'autre part, l'élimination des sites de glycosylation sur la chaîne lourde augmentent l'activité anticoagulante de la PC. L'activité enzymatique ( $K_m$  et  $K_{cat}$ ) de la PC est également dépendante de la

glycosylation<sup>8</sup>. On a aussi montré que la chaîne glycanne sur l'Asn<sup>329</sup> module l'activité anti-apoptotique et la fonction protectrice de la barrière endothéliale<sup>14</sup>.

## 5. Sepsis :

Le sepsis est une réponse systémique de l'organisme à une infection. Au plan physiopathologique, cette réponse se traduit par une réponse inflammatoire intense (SIRS), l'activation de la coagulation (induite par les PAMPs) et une inhibition de la fibrinolyse.

On distingue différents stades de sepsis :

- Le sepsis
- Le sepsis sévère : au sepsis vient se rajouter une hypotension artérielle et/ou une (des) défaillance(s) (multi)viscérale secondaire(s) à la diminution de la perfusion tissulaire.
- Le choc septique : l'hypotension artérielle devient réfractaire à l'expansion volumique et nécessite la perfusion d'amines vasopressives.

L'activation des facteurs de la coagulation entraîne un déficit acquis des inhibiteurs de la coagulation comme la PC et la PS et un déséquilibre de la balance hémostatique. On retrouve également une activation plaquettaire ainsi qu'une altération de l'endothélium vasculaire pouvant mener à une CIVD. La mortalité associée est très élevée (~30 %) et parmi les approches intéressantes de traitement, on peut administrer de la PCa<sup>9</sup>. En effet, les taux de PC et d'AT sont des facteurs pronostiques du sepsis<sup>15,16</sup>.

## 6. Le *Pupura fulminans* :

Le PF est un trouble de l'hémostase rapidement progressif caractérisé par un infarctus hémorragique au niveau cutané (Figure 11) et une CIVD. Il s'agit d'une urgence hématologique majeure avec une grande mortalité (jusqu'à 80 %) <sup>17</sup> et une morbidité importante chez les survivants. Elle affecte aussi bien les enfants que les adultes.

L'aspect initial des lésions purpuriques est caractérisé par des macules érythémateuses bien délimitées qui progressent rapidement formant des zones irrégulières nécrotiques. Ceci peut vite évoluer en une défaillance multi-viscérale induite par des thromboses au niveau des vaisseaux sanguins de petit et moyen calibre <sup>18</sup>.

Les causes pouvant être incriminées dans la genèse du PF sont essentiellement le sepsis sévère et les déficits congénitaux en PC ou PS.

---

Fionnuala Ni Ainle \_ The journal of biological chemistry \_ 2011 <sup>14</sup>

Shorr AF \_ J Clin \_ Invest 1987 <sup>15</sup>

Levi M. \_ Clin Chest Med \_ 2008 <sup>16</sup>

Nicolas Lerolle \_ American Journal of respiratory and critical care medicine \_ 2013 <sup>17</sup>

E Chalmers \_ Arch Dis Child \_ 2011 <sup>18</sup>



**Figure 11 : Enfant avec PF**

## **7. Les CDG (*Congenital disorders of glycosylation*)<sup>19</sup>**

Les CDG sont des maladies congénitales autosomiques récessives du métabolisme des glycanes, cliniquement très polymorphes et regroupés en deux grands types :

- Les CDG I : déficits en enzymes impliquées depuis le monosaccharide jusqu'à l'étape de transfert de l'oligosaccharide à 14 résidus sur le site de N-glycosylation du peptide (RE).
- Les CDG II : altérations d'enzymes ou de transporteurs de monosaccharides impliqués dans la maturation des N-glycoprotéines (essentiellement dans le Golgi).

Ainsi, les CDG sont des anomalies innées de la glycosylation qui entraînent la perte d'une ou plusieurs chaîne(s) glycanne(s) entières pour les CDG de type I et une absence de sialylation terminale pour les CDG de type II.

Les patients CDG ont souvent des anomalies de la coagulation qui peuvent constituer des points d'appel.

## **8. Objectif de l'étude**

Etant donné le rôle majeur de la glycosylation dans les fonctions des inhibiteurs de la coagulation (AT et PC notamment), l'étude qualitative de ces glycoprotéines s'avère particulièrement intéressante dans des contextes pathologiques de l'hémostase.

L'électrophorèse 2D, permettant de séparer précisément les différentes glycoformes d'une protéine, et dont la mise au point technique a été pré-établie dans un précédent travail, a été notre technique de choix pour cette étude.

Nous nous sommes fixés l'objectif de comparer, chez des patients en état de choc septique, dont certains présentent un PF, le profil de glycosylation de l'AT et de la PC plasmatiques.

Par ailleurs, certains plasmas de patients CDG ont été analysés en vue de vérifier si le profil de ces glycoprotéines était affecté par les anomalies innées de la glycosylation notamment chez certains de ces patients présentant des troubles de l'hémostase.

### III. MATERIELS ET METHODES

#### 1- Patients inclus dans l'étude

- **Patients avec choc septique :**

Nous avons travaillé sur des échantillons plasmatiques (plasmas citratés) congelés à -80°C de 3 groupes de patients :

- Un groupe de 7 patients présentant un choc septique.
- Un groupe de 16 patients ayant développé durant leur état de choc septique, un PF (H = 10, F = 6).

Ces deux groupes étaient relativement âgés (42 à 87 ans).

- Un groupe de 8 témoins ne présentant aucun trouble de l'hémostase (H = 4, F = 4).

Pour ce groupe de témoins, nous avons opté pour des patients plus jeunes (23 à 48 ans) puisque les personnes âgées ont souvent des affections intercurrentes pouvant affecter la glycosylation des protéines étudiées, notamment au cours des inflammations chroniques.

- **Patients avec CDG**

Nous avons à notre disposition des plasmas de 2 patients avec un CDG I et de 2 patients avec un CDG II, ces affections étant des maladies rares.

#### 2- Electrophorèse bi-dimensionnelle

##### a. Principe

L'électrophorèse est une technique séparative. Elle est utilisée le plus souvent dans un but analytique mais également pour purifier des molécules solubles. L'électrophorèse bi-dimensionnelle a précédé et accompagné la naissance de la protéomique. Il s'agit d'une technique de séparation de protéines selon leur point isoélectrique (pI) et leur masse moléculaire. On sépare ainsi environ 1000 protéines dans le sérum<sup>20</sup> et on peut établir de cette manière la « carte d'identité protéique » des principaux tissus et organes humains. Nous avons couplé l'électrophorèse 2D à la technique du *Western-blot*.

Elle est constituée de 5 étapes : la préparation de l'échantillon, l'isoélectrofocalisation (IEF : séparation selon le pI), le PAGE-SDS (séparation selon le PM), le transfert sur membrane et l'immunorévélation de protéines.

---

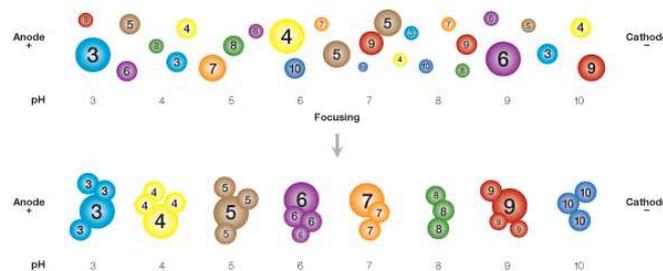
<http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/lafont/electrophorese/E2.html><sup>20</sup>

- Préparation de l'échantillon :

Les protéines sont dénaturées (urée à forte concentration), réduites (DTT) et solubilisées (détergent non ionique). On rajoute également des ampholytes (participent à l'établissement d'un gradient de pH dans les gels d'IEF) et le bleu de bromophénol (colore le front de migration en bleu).

- L'IEF :

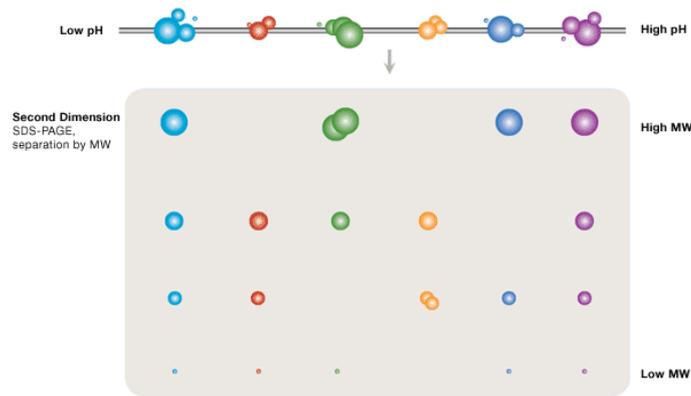
C'est la première étape de séparation des protéines selon leur point isoélectrique. Le pI d'une protéine est le pH auquel elle a une charge nette nulle. Sous l'action d'un champ électrique, la protéine va migrer dans le gel d'IEF pour se focaliser au pH correspondant à son pI (Figure 12). En analyse protéomique, on préfère généralement effectuer l'IEF selon un gradient immobilisé de pH (IPG) et dans des conditions permettant une dénaturation et une solubilisation des protéines de l'échantillon (par opposition à l'IEF native)<sup>21</sup>.



**Figure 12 : Principe de l'IEF**  
(Source : *2-D electrophoresis guide Bio-Rad*)

- L'électrophorèse en gel de polyacrylamide (PAGE-SDS) :

C'est la deuxième étape de séparation des protéines selon leur PM. Le détergent SDS permet à la fois de dénaturer les protéines et de leur conférer une charge négative proportionnelle à leur masse. Ainsi, en appliquant un champ électrique, on fait migrer les protéines du gel d'IEF vers le gel de polyacrylamide selon leurs masses respectives (Figure 13).

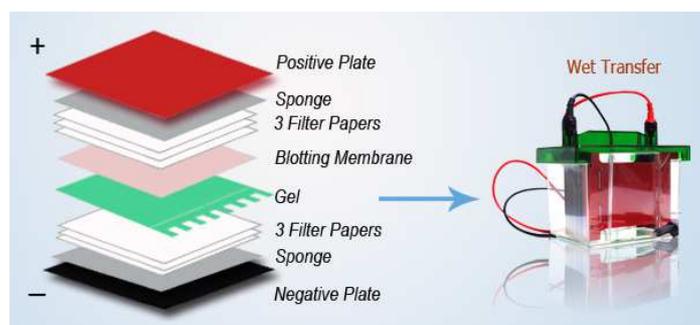


**Figure 13 : Principe du SDS-PAGE**  
(Source : *2-D electrophoresis guide Bio-Rad*)

- Le transfert sur membrane :

C'est le transfert des protéines séparées depuis le gel de polyacrylamide vers une membrane de nitrocellulose ou de PVDF, le but étant de pouvoir réaliser des immunorévélations spécifiques. Néanmoins, on pourrait travailler directement sur le gel obtenu, en faisant des colorations non spécifiques (Bleu de Coomassie, Nitrate d'Argent, etc.).

En appliquant un courant électrique latéral, les protéines chargées négativement (par le SDS) vont quitter le gel (placé du côté de l'électrode -) pour aller se déposer sur la membrane (placée du côté de l'électrode +) qui présente une affinité importante pour les protéines (Figure 14).

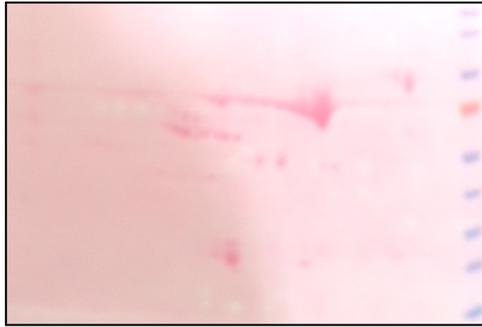


**Figure 14 : Principe du transfert sur membrane<sup>22</sup>**

- Immunorévélation des protéines :

Avant l'immunorévélation, on peut s'assurer de l'efficacité du transfert en faisant une coloration labile au rouge Ponceau. Ceci permet de visualiser les protéines les plus concentrées comme par exemple l'albumine plasmatique (Figure 15).

<http://www.western-blot.us/procedure-of-western-blot/western-blot-transfer> <sup>22</sup>

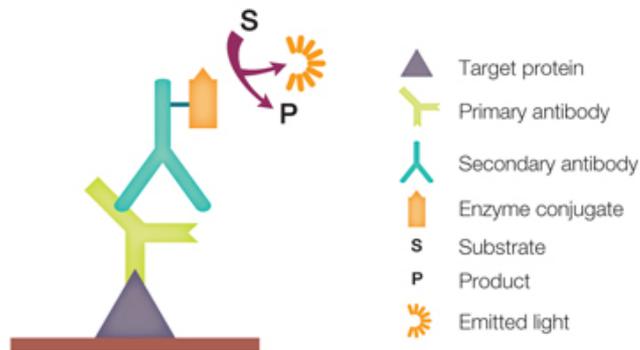


**Figure 15 : Révélation des protéines plasmatiques par le rouge Ponceau sur une membrane de nitrocellulose**

L'immunorévélation consiste à marquer une protéine avec un anticorps primaire spécifique (monoclonal ou polyclonal) couplé (directement ou *via* un anticorps secondaire) à une enzyme. La détection de la protéine se fait plus souvent soit par colorimétrie, soit par chimiluminescence (technique la plus sensible), soit par autoradiographie, soit par fluorescence.

✓ Principe de la chimiluminescence (technique utilisée) :

L'anticorps primaire ou secondaire est couplé à une enzyme : la HRP. Il s'agit d'une peroxydase qui permet, en présence de  $H_2O_2$ , d'oxyder le luminol (substrat) en un produit luminescent. La lumière émise vient impressionner un film photographique (Figure 16).



**Figure 15 : Principe de la chimiluminescence**

### **b. Matériel et protocole technique**

- Préparation de l'échantillon :

Nous mélangeons chaque échantillon plasmatique avec 150  $\mu$ L d'une solution de réhydratation (conservée au congélateur) que nous injectons dans un puits de la cassette *Zoom® IPG Runner* (série de 6 puits) en veillant à ne pas introduire de bulles.

La composition de la solution de réhydratation utilisée est la suivante :

Urée	4.8 g	Agent dénaturant (8M)
CHAPS	0.2 g	Détergent zwitterionique
DTT 50 mM	77 mg	Réduit les ponts disulfure
Ampholytes 0.5% (4-7)	50 µL	
Orange G		Marqueur de migration
Eau déminéralisée	10 mL	

L'utilisation d'un détergent *zwitterionique* et d'eau *déminéralisée* évite d'introduire des ions supplémentaires à la solution qui pourraient perturber la focalisation des protéines lors de l'IEF.

Nous introduisons ensuite un gel d'IEF par puits (*Zoom® IPG strip pH 4-7* conservé à -30°C) et nous laissons incuber pendant au moins une heure à l'abri de l'air (pour éviter la cristallisation de l'urée) (Figure 16).



**Figure 16 : Gels d'IEF en cours de réhydratation**

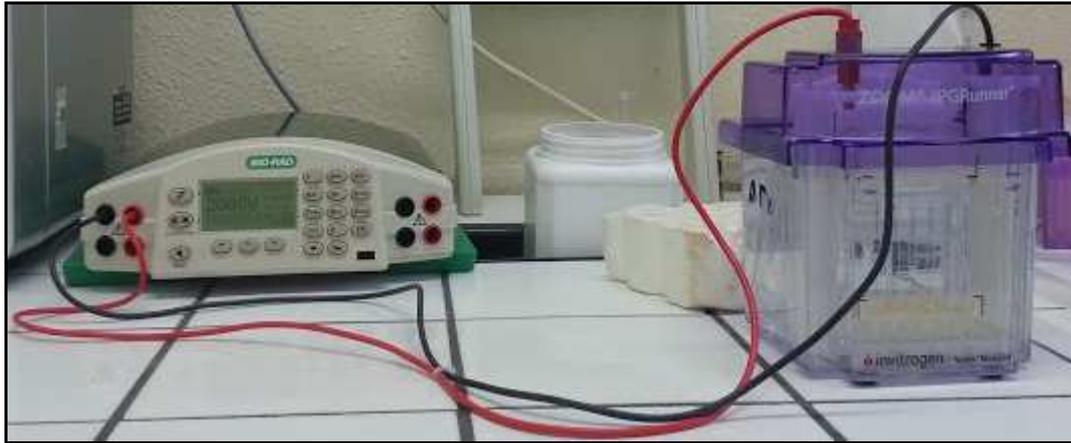
▪ IEF :

Après avoir appliqué deux papiers électrodes imbibés d'eau déminéralisée sur les deux extrémités des gels, nous mettons la cassette dans une cuve *Novex® Mini-Cell Invitrogen* (Figure 17).

Le protocole d'IEF utilisé était le suivant :

- 1) 150 V en mode rapide pendant 30 minutes
- 2) 150V → 2000 V en mode lent pendant une heure
- 3) 2000 V en mode rapide pendant 90 minutes.

L'intensité du courant était plafonnée à 50 µA par gel.



**Figure 17 : montage de l'IEF**

Les gels d'IEF sont ensuite directement utilisés pour l'étape suivante (SDS-PAGE) ou bien ils sont conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$  dans leur cassettes recouvertes de papier aluminium.

▪ PAGE-SDS :

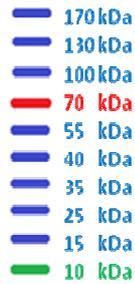
Une fois les gels d'IEF décongelés, nous les traitons (10 min pour chaque incubation) successivement par :

✓ 1 mL d'agent réducteur (*NuPAGE<sup>®</sup> Sample Reducing Agent 10X*) dans 9 mL d'une solution de *NuPAGE<sup>®</sup> LDS* (Lauryl Dodecylsulfate : équivalent du SDS) *sample Buffer 4X* diluée au  $\frac{1}{4}$ . Cet agent permet de réduire les ponts disulfures. La coloration bleue de la solution du LDS est conférée par le Bleu de bromophénol qui permet de visualiser le front de migration électrophorétique.

✓ 232 mg d'iodoacétamide dissous dans 10 mL de la même solution diluée de LDS. L'iodoacétamide permet d'acétyler les fonctions  $-\text{SH}$  (Sulfure) réduites afin d'empêcher la reformation des ponts  $-\text{S}-\text{S}-$ .

Le temps de manipulation depuis la fin de l'IEF jusqu'au PAGE-SDS doit être réduit au maximum. Autrement, les protéines focalisées à leur pI respectif auront tendance à diffuser latéralement dans le gel d'IEF.

Chaque gel d'IEF est ensuite placé, après rinçage (dans une solution de tampon *NuPAGE<sup>®</sup> MOPS SDS Running Buffer 20X* diluée au  $\frac{1}{20^{\text{ème}}}$ ), au niveau du grand puits du gel de polyacrylamide (*NuPAGE<sup>®</sup> 4-12% Bis-Tris ZOOM<sup>TM</sup> 1,0 mm X IPG well Cell Surelock<sup>TM</sup>*). La jonction électrique entre les deux gels est assurée par 400  $\mu\text{L}$  d'une solution d'agarose à 0,5% dans le tampon MOPS 1X (0,25 g d'agarose dans 50 mL de tampon MOPS). Dans le petit puits à côté, nous déposons 5  $\mu\text{L}$  d'une solution de marqueurs moléculaires (Figure 18).



**Figure 18 : Marqueurs de masse moléculaire utilisés**

Dans la cuve de migration (réservoir central), la plaque de gel baigne dans du tampon MOPS 1X auquel nous rajoutons 500  $\mu$ L d'antioxydant (*NuPAGE<sup>®</sup> Antioxydant*).

La migration électrophorétique se fait en 15 minutes sous 150V puis 45 minutes sous 200V. En fin de migration, la partie d'intérêt du gel est récupérée (on enlève la partie haute où est collé le gel d'IEF et la partie basse avec le front de migration coloré) et on l'immerge dans une cuve contenant le tampon de transfert.

- Transfert sur membrane de nitrocellulose :

Cette étape doit être enchaînée avec l'étape précédente. Nous utilisons un tampon de transfert refroidi que nous préparons comme suit (pour 1 L de tampon) :

- Tampon de transfert 10X 25mM Tris, 192 mM Glycine : 100 mL
- Ethanol 20% final : 200 mL
- Eau distillée : 700 mL

Nous créons alors un « sandwich » où on met le gel de polyacrylamide en contact étroit avec la membrane de nitrocellulose au sein d'une plaque de transfert. Nous utilisons pour ceci des éponges et des papiers Whatman<sup>TM</sup> de part et d'autre de ce système gel-membrane. Tout a été préalablement immergé dans du tampon de transfert. Le transfert dure 1 heure à 100 V (cuve munie de glaçons contrôlant le réchauffement dû à l'intensité du courant électrique).

Les membranes sont ensuite récupérées (transfert vérifié par la disparation des marqueurs de masse moléculaire du gel et leur apparition sur la membrane) et lavées dans du tampon T-TBS 1X. Tous les lavages ultérieurs seront effectués par ce tampon dont la composition est (pour 5 L) :

- TBS 10X : 550 mL
- TWEEN 0,2% : 10 mL
- Eau pure : QSP 5 L

- Immunorévélation de l'AT et de la PC :

Avant tout marquage immunologique, les sites protéiques non spécifiques des anticorps utilisés sur la membrane doivent être saturés par des protéines « inertes ».

Nous incubons les membranes dans une solution de lait à 10 % (10 g de *Régilait* dissous dans 100 mL de tampon T-TBS) pendant une nuit au réfrigérateur (4°C) ou pendant une heure à température ambiante (sur plaque oscillante).

✓ Pour l'AT : le système de marquage utilisé est constitué d'un anticorps primaire de lapin anti-AT humaine (*Siemens*) et d'un anticorps secondaire anti-immunoglobuline de lapin couplé à la HRP. L'incubation avec l'anticorps primaire, dilué au 1/5000<sup>ème</sup> dans une solution de lait à 5%, dure 1 heure sur plaque oscillante, suivie d'un lavage vigoureux (3 x 15 minutes sur plaque rotative). Ensuite, nous incubons les membranes avec l'anticorps secondaire dilué au 1/5000<sup>ème</sup> (dans du T-TBS) pendant 45 minutes. Un deuxième lavage est ensuite effectué.

✓ Pour la PC : nous avons utilisé deux systèmes de marquage :

- un anticorps de mouton anti-PC humaine directement marqué à la HRP (*US biological P9102-33A*). Cet anticorps présentait l'inconvénient d'un bruit de fond important. Plusieurs dilutions ont été essayées afin d'optimiser la révélation.

- Un anticorps primaire de lapin anti-PC humaine (*Sigma Aldrich P4680*) avec un anticorps secondaire anti-immunoglobuline de lapin couplé à la HRP. Ce système était plus performant en termes de marquage spécifique (moins de bruit de fond) par rapport au premier. Afin d'optimiser la technique, nous avons également testé plusieurs dilutions.

Après le dernier lavage, 1 à 2 mL de solution d'ECL sont rajoutés sur chaque membrane (séchée par du papier Whatman<sup>TM</sup>) pendant 1 à 2 minutes. Les membranes sont introduites dans une cassette pour la révélation photographique. Le temps de contact du film photographique avec la membrane dans la chambre noire est variable selon l'anticorps utilisé et selon la concentration de la protéine recherchée.

L'intégration densitométrique des spots obtenus pour l'AT a été réalisée à l'aide du logiciel « Image J ».

#### IV. RESULTATS ET INTERPRETATION

Les électrophorèses 2D ont été effectuées par séries de 6.

Les détails des patients (N° d'identification aléatoire, groupes de patient, pourcentage d'activité d'AT et de PC) et des quantités plasmatiques utilisées sont détaillées dans le tableau suivant :

	N° identifiant	Type de patient	N° de patient	AT (%)	PC (%)	Dilution du plasma	Quantité de plasma (µL)	Manteau de saturation
Série 0	1	Purpura	001	46	27	1/10e	2	Lait
	2	Purpura	001	46	27	1/10e	6	BSA
	3	Purpura	002	34	36	1/10e	2	Lait
	4	Purpura	002	34	36	1/10e	6	Lait
	5	Sepsis	101	52	38	1/10e	2	BSA
	6	Sepsis	101	52	38	1/10e	6	Lait
série 1	11	Purpura	13	47	38	1/10e	4	Lait
	12	Purpura	32	46	33	1/10e	4	Lait
	13	Purpura	34	45	43	1/10e	4	Lait
	14	Purpura	35	42	23	1/10e	4	Lait
	15	Sepsis	105	74	87	1/10e	4	Lait
	16	Sepsis	106	83	62	1/10e	4	Lait
Série 2	21	CDG	312			1/10e	6	Lait
	22	CDG	292			1/10e	6	Lait
	23	Purpura	001	46	27	1/10e	6	Lait
	24	Purpura	11	30	15	1/10e	6	Lait
	25	Sepsis	102	82	10	1/10e	6	Lait
	26	Sepsis	103	34	19	1/10e	6	Lait
Série 3	31	Purpura	14	42	16	1/10e	6	Lait
	32	Purpura	15	28	29	1/10e	6	Lait
	33	Purpura	31	40	19	1/10e	6	Lait
	34	Purpura	104	35	19	1/10e	6	Lait
	35	Sepsis	107	73	32	1/10e	6	Lait
	36	Sepsis	109	36	28	1/10e	6	Lait
Série 4	41	Purpura	33	22	11	1/10e	6	Lait
	42	Purpura	36	16	13	1/10e	6	Lait
	43	Purpura	37	34	24	1/10e	6	Lait
	44	Témoin	N1			1/10e	6	Lait
	45	Témoin	N2			1/10e	6	Lait
	46	Témoin	N3			1/10e	6	Lait
Série 5	51	Purpura	38	45	30	1/10e	6	Lait
	52	Purpura	39	22	22	1/10e	6	Lait
	53	Témoin	N4			1/10e	6	Lait
	54	Témoin	N5			1/10e	6	Lait
	55	Témoin	N6			1/10e	6	Lait
	56	Témoin	N10			1/10e	6	Lait
Série 6	61	Témoin	N9			1/10e	6	Lait
	62	Sepsis	103	34	19	Non Dilué	1	Lait
	63	CDG	02			1/10e	6	Lait
	64	CDG	03			1/10e	6	Lait

## 1. Résultats pour l'AT

La concentration d'anticorps anti-AT humaine (1/5000<sup>ème</sup>) était bien adaptée. Nous constatons un marquage très spécifique de l'AT (Figure 19). Le pI de ses différentes glycoformes allait de 5 à 5.4 pour un PM d'environ 58 kDa. Nous retrouvons essentiellement 5 spots qui correspondraient (selon une étude détaillée des glycoformes de l'AT humaine<sup>3</sup>) :

- Pour le spot 3 majoritaire (pI~5.2) à l'isoforme  $\alpha$  (essentiellement) avec ses 4 chaînes de N-glycannes et la structure bi-antennée disialylée (total de 8 acides sialiques).
- Pour le spot 4 (pI~5.3) à l'isoforme  $\beta$  (essentiellement) avec seulement 3 chaînes N-glycannes et un total de 6 acides sialiques.
- Pour le spot 2 (pI~5.1) à l'isoforme  $\alpha$  avec probablement 9 acides sialiques terminaux (structure tri-antennée).
- Pour le spot 5 (pI~5.4) à l'isoforme  $\beta$  ; on remarque un décalage vers le bas de ce spot qui correspond probablement à la perte de la chaîne N-glycane sur l'Asn<sup>135</sup>.
- Par analogie avec le spot 2, le spot 1 correspondrait probablement à une forme hypersialylée de l'isoforme  $\alpha$ .

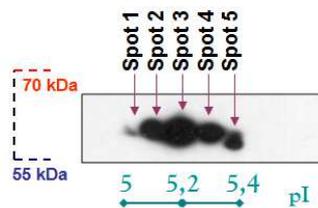


Figure 19 : Profil Témoin (61)

### a. Dans le choc septique

Les profils d'AT observés pour les différents patients avec choc septique (avec et sans PF) ainsi que les témoins sont présentés ci-dessous (Figure 20) :

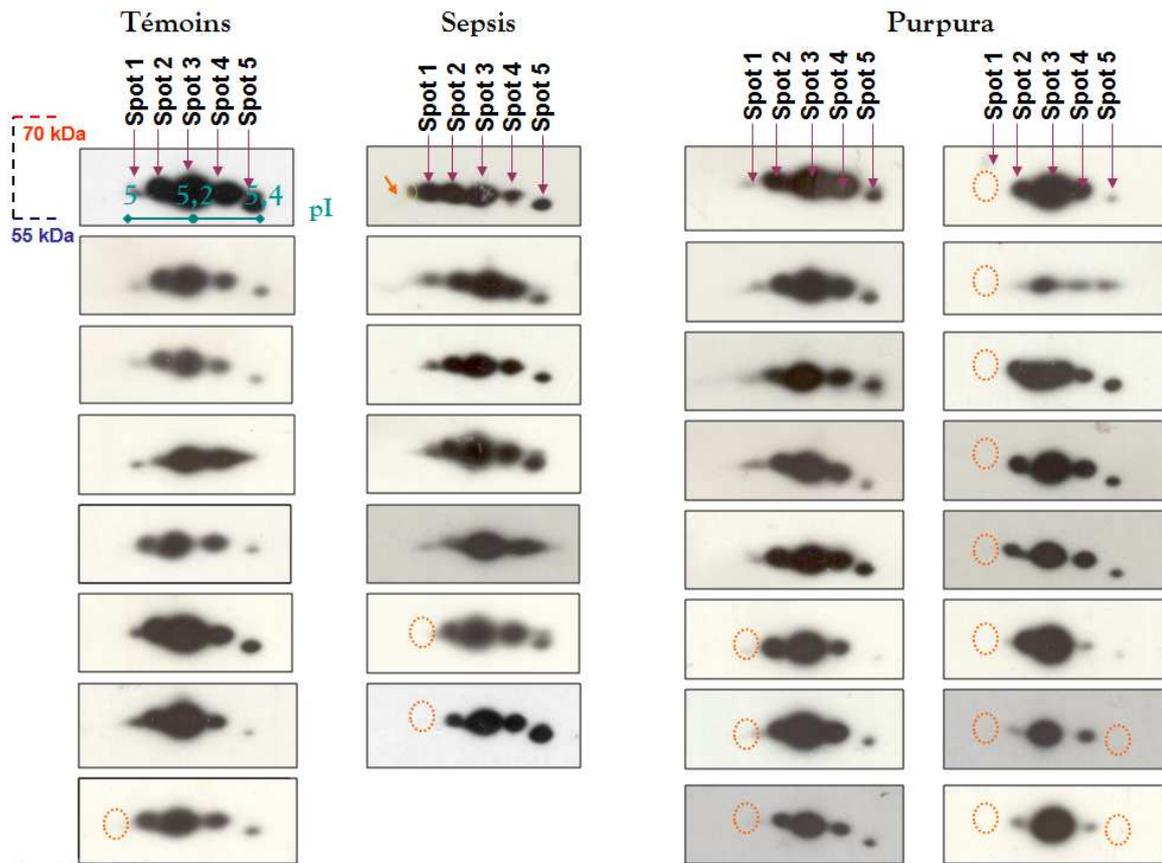


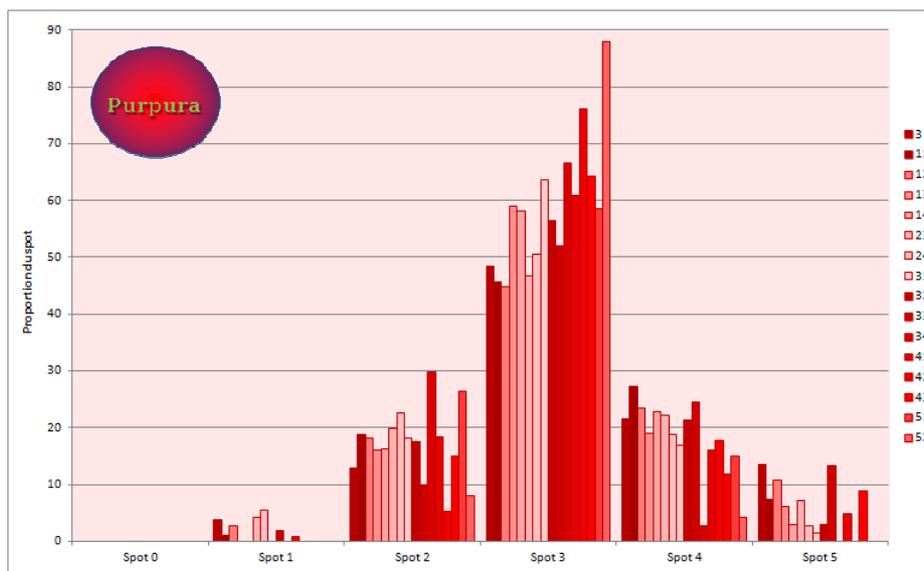
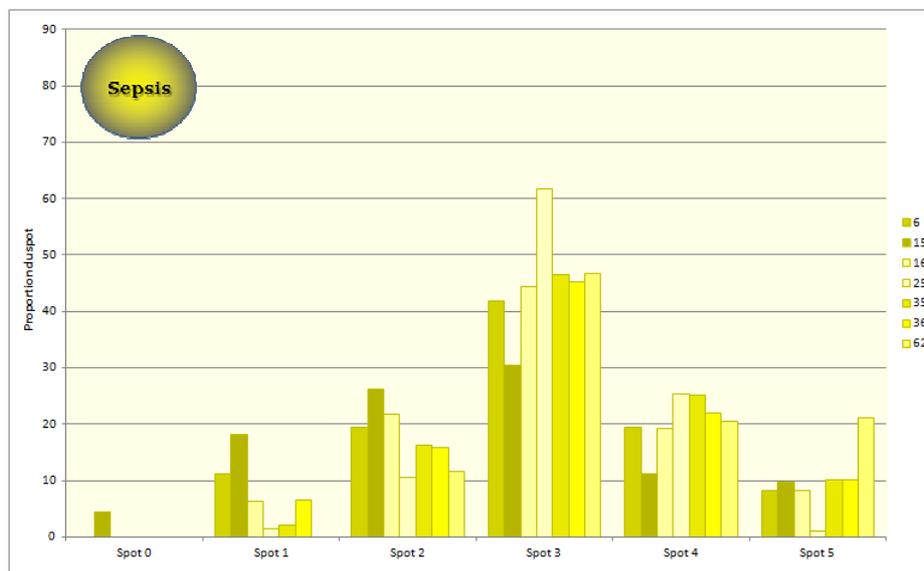
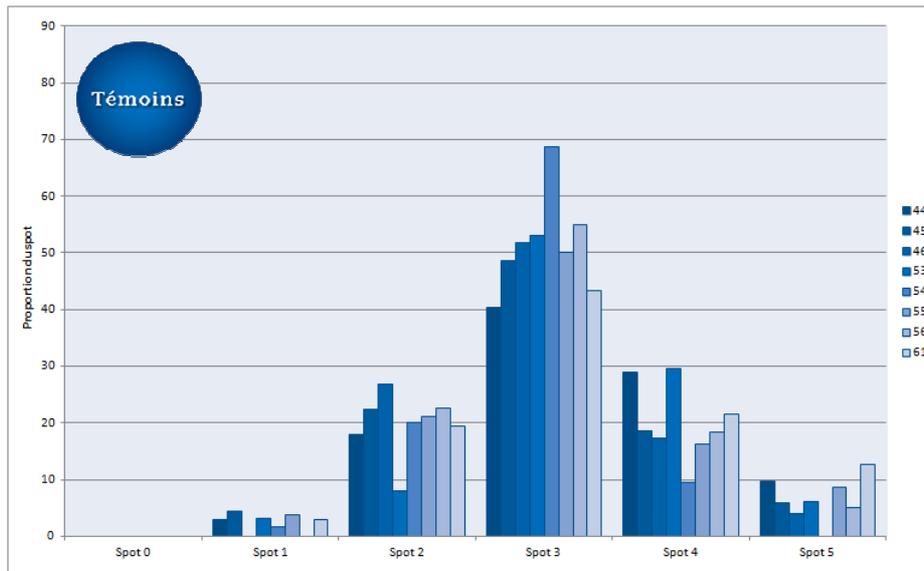
Figure 20 : Profils de l'AT chez les patients « témoins », « sepsis » et « purpura »

Différentes constatations peuvent être faites :

- Une diminution voire une disparition (représentée par un cercle en pointillés) du spot 1 minoritaire essentiellement chez les patients avec PF (pour plus d'un patient sur 2).
- Le profil d'AT chez plusieurs patients avec PF se distingue par une diminution des spots minoritaires en faveur du spot 3. Les derniers patients PF ont un profil très particulier qu'on ne retrouve pas chez les autres types de patients. A l'inverse, les 5 premiers profils de PF sont très similaires aux profils des témoins.
- Le profil d'AT chez les patients avec choc septique et sans PF (sepsis) est très proche de celui des témoins. Une exception : le premier profil présente un spot supplémentaire à gauche (plus acide) qui pourrait correspondre à une hypersialylation (décrite dans les phénomènes inflammatoires chroniques).

Une intégration densitométrique des spots est alors faite suite à ces constatations et le pourcentage de chaque spot a été déterminé (normalisation interne car variabilité importante de la densité des spots selon le taux circulant d'AT et le temps d'exposition du film photographique).

Les résultats sont présentés sous forme d'histogrammes pour les 3 types de patients avec leur N° identifiant et la proportion de chaque spot en ordonnée (Figure 21).



Figures 21 : répartition de la densité des spots en pourcentage chez les patients

Afin de déterminer si les différences observées pour chaque spot et pour chaque groupe de patient sont significatives, nous avons procédé à une étude statistique de ces proportions calculées (Logiciel : *PRISM*).

Les résultats obtenus sont résumés ci-dessous (Figure 22):

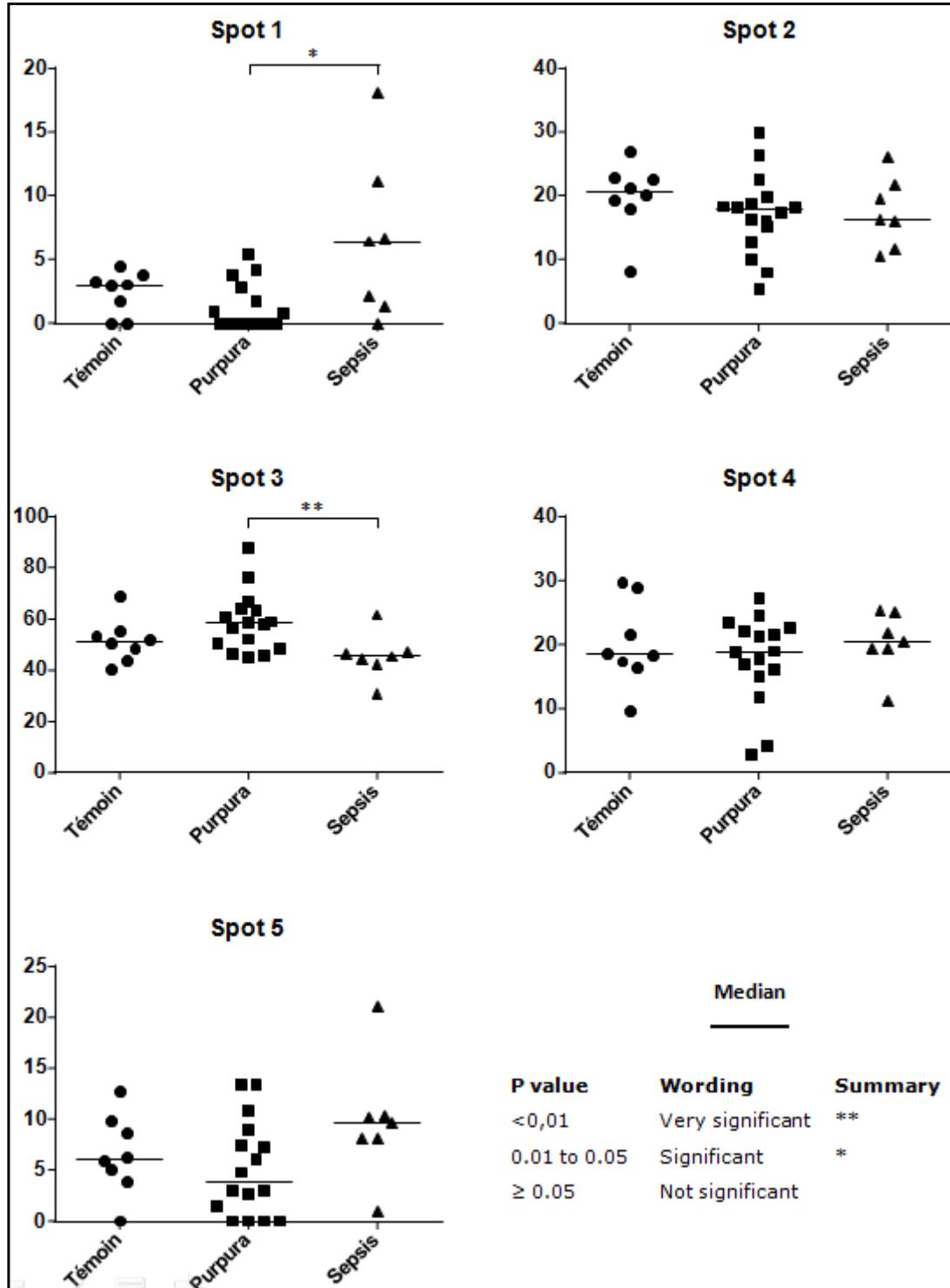


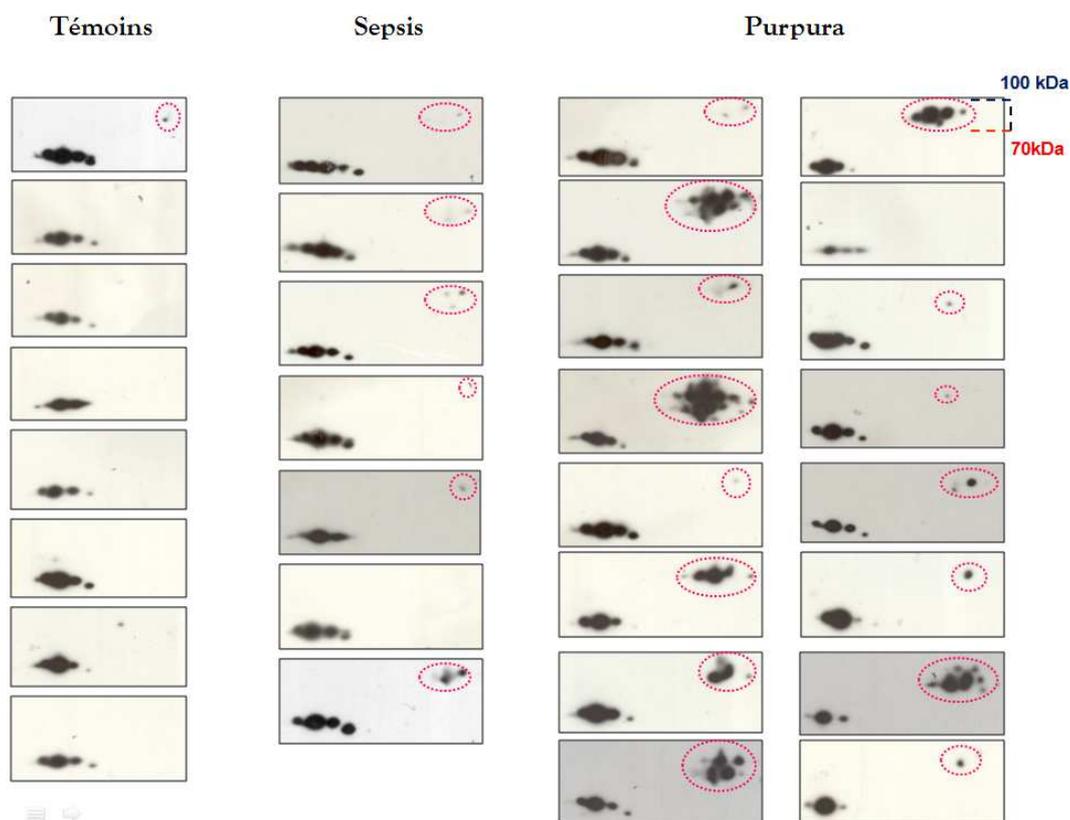
Figure 22 : étude statistique de la significativité des différences entre les profils des patients

Il apparaît :

- Une différence significative pour le spot 1 entre les patients « Purpura » (choc septique avec PF) et « Sepsis » (choc septique sans PF).
- Une différence très significative pour le spot 3 entre les patients « Purpura » et « Sepsis » également.
- Aucune différence significative entre « Témoins » et « Sepsis » pour tous les spots ni entre « Témoins » et « Purpura ».

Ceci suggère que l'électrophorèse 2D de l'AT est en mesure de permettre la différenciation de patients avec PF dans un contexte de sepsis sévère.

D'autre part, nous avons constaté l'apparition non constante de spots (plus ou moins nombreux à un niveau de pI qui va de 5.6 à 6.1 pour un PM d'environ 70-92 kDa (cf. profils ci-dessous, Figure 23 ).



**Figure 23 : spots supplémentaires (entourés en rouge)**

Nous avons également constaté la présence et l'abondance significative de ces spots chez la majorité des patients « Purpura ». Les patients « sepsis » présentent inconstamment ces spots et avec une intensité beaucoup plus faible.

Pour les témoins, ces spots sont complètement absents (sauf pour le premier où un petit spot est visible).

Ceci peut suggérer un lien avec l'activation de la coagulation lors de la CIVD. Au cours de ce phénomène, la formation de complexes actifs de l'AT avec des facteurs de la coagulation dont le FIIa et le FXa a été décrite. Ces deux complexes covalents auraient un PM de 94 kDa pour le complexe AT-FIIa et 102 kDa pour le complexe AT-FXa.

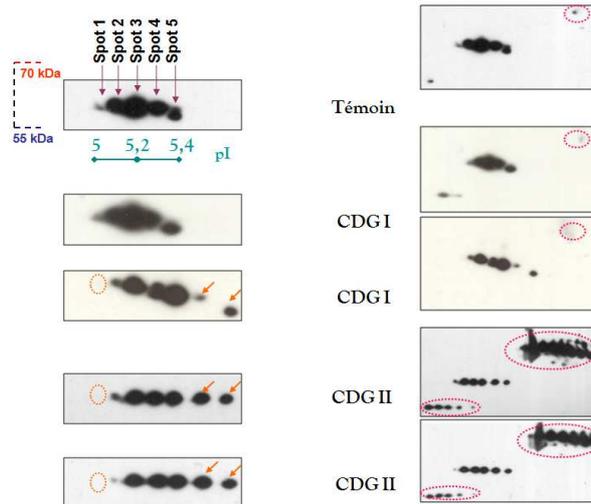
### **b. Dans les CDG**

En ce qui concerne les patients CDG, nous avons obtenu des profils plus ou moins différents (Figure 24):

- Pour le premier patient, son CDG est de type I et il présente un profil d'AT similaire aux patients témoins.
- Pour le deuxième patient, son CDG est également de type I mais son profil d'AT est affecté de manière importante. Nous constatons l'apparition de glycoformes plus basiques avec une perte significative de PM, reflétant la perte de chaînes N-glycannes. De plus, le spot 1 disparaît complètement.
- Pour les deux patients présentant un CDG de type II, l'anomalie de glycosylation se manifeste par l'apparition de glycoformes plus basiques sans perte significative de PM. Ceci correspondant très probablement à un défaut de sialylation terminale.

Il est important de signaler que, à l'exception du premier sujet, ces patients présentent des anomalies importantes de la coagulation notamment pour le dosage (de l'activité) de l'AT. Ceci nous suggère un lien entre profil « anormal » de l'AT et anomalies de la coagulation et *vice versa*.

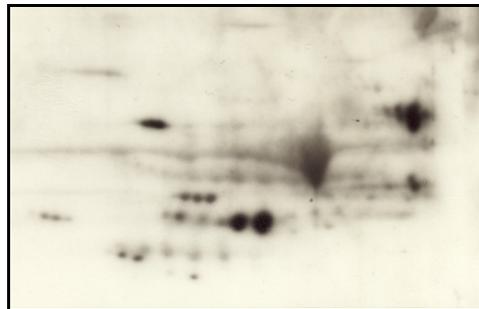
D'autre part, les spots de PM ~70-92 kDa ont été retrouvés chez ces patients, essentiellement pour les sujets CDG de type II, avec un profil très similaire à celui de l'AT (Figure 24). Ceci suggère, encore une fois, l'existence d'un probable complexe de l'AT avec des facteurs activés de la coagulation.



**Figure 24 : Profils de l'AT chez les patients CDG**

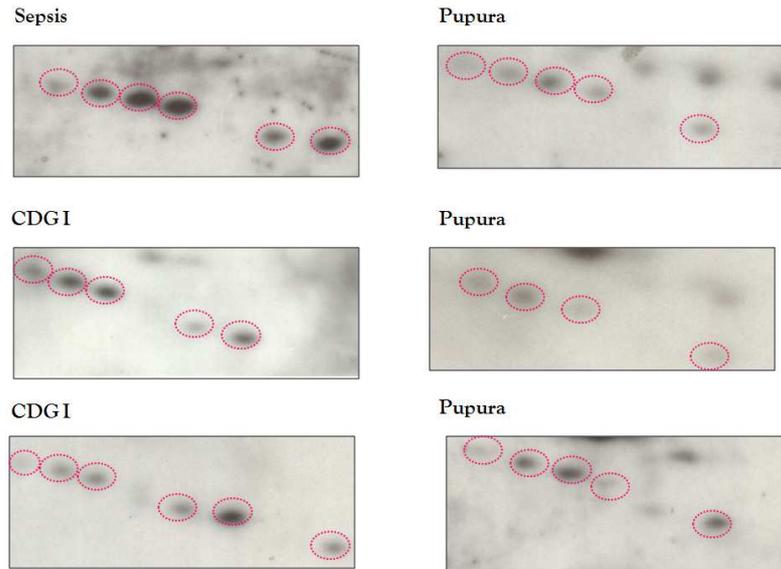
## 2. Résultats pour la PC

Pour la PC, la mise au point technique était plus difficile et le premier anticorps utilisé (*US Biological P9102-33A*) donnait des résultats peu satisfaisants. En effet, le bruit de fond était très important et le marquage était peu spécifique (Figure 25).



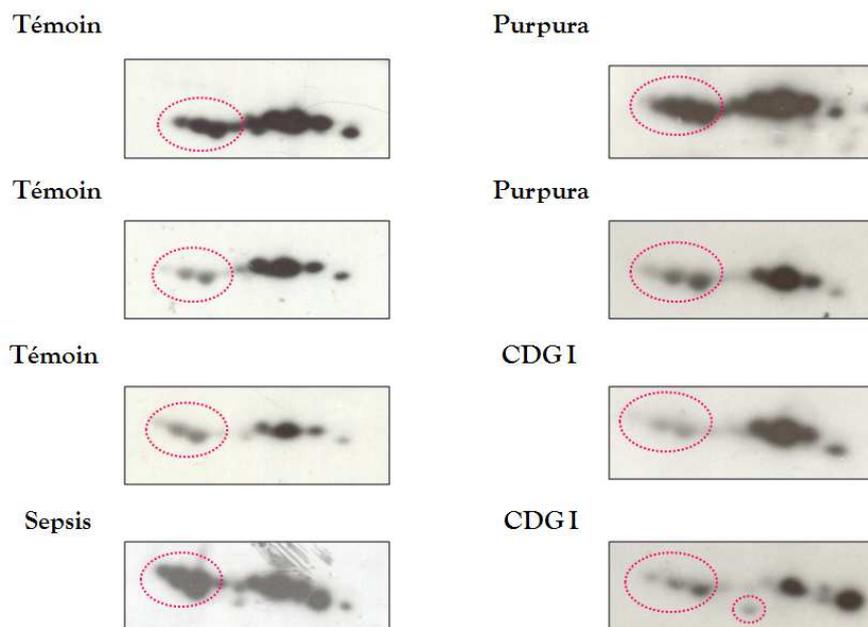
**Figure 25 : marquage d'une membrane avec l'anticorps anti-PC (*US Biological*)**

Sur la base des résultats d'un travail antérieur (qui consistait à étudier de la PC purifiée par une électrophorèse 2D), nous arrivons parfois (Figure 26) à observer des spots qui correspondraient aux glycoformes de la chaîne lourde de PC (PM ~ 35- 40 kDa et pI ~ 4.7-5.2).



**Figure 26 : Profil de la PC (*anticorps US Biological*) chez certains patients**

Un nombre aussi faible de résultats interprétables limite la possibilité de comparer les 3 groupes de patients et le recours à un autre anticorps plus spécifique était indispensable. Le nouvel anticorps anti-PC humaine sur lequel a porté notre choix (*Sigma Aldrich P4680*) était beaucoup plus spécifique mais marquait très faiblement la chaîne lourde de la PC. D'autre part, nous constatons un nouveau marquage fort et constant d'une glycoprotéine de PM ~ 60 kDa et de pI ~ 4.8 - 5.1 (Figure 27) ce qui pourrait correspondre à la PC (SC : chaîne lourde + chaîne légère). Un problème se pose : pourquoi visualise-t-on cette forme en conditions théoriquement réductrices (pont disulfure rompu entre les deux chaînes) ?



**Figure 27 : Profil de la PC (*anticorps Sigma Aldrich*) chez certains patients**

Le nombre de plasmas analysés avec ce nouvel anticorps (à la fin des deux mois de stage) était insuffisant pour envisager une étude complète des profils de la PC. Néanmoins, nous constatons une anomalie de la glycosylation de la PC (SC) chez le deuxième patient CDG I avec un spot supplémentaire.

## V. DISCUSSION ET PERSPECTIVES

- **Pour l'AT :**

Suite à nos résultats de l'étude qualitative de l'AT, nous émettons les hypothèses suivantes :

Les anomalies observées (cliniques pour le PF ou troubles du bilan d'hémostase pour les patients CDG) seraient-elles dues à un déficit qualitatif de l'AT ?

Certaines glycoformes de cette protéine seraient-elles plus « efficaces » que d'autres dans la régulation de l'hémostase sanguine ? Seraient-elles perdues en premier dans le PF ? Seraient-elles absentes ou faiblement présentes dans certains CDG ? Dans ce cas, pourrait-on les doser spécifiquement ?

Les dosages courants d'AT (réalisés pour certains de ces patients) sont des dosages fonctionnels (d'activité). Il serait donc judicieux de réaliser sur les plasmas dont nous disposons des dosages quantitatifs (antigéniques) de l'AT afin de vérifier nos hypothèses. S'il se trouve que le taux d'AT est plutôt normal, nous pencherons préférentiellement vers l'hypothèse d'un déficit qualitatif.

D'autre part, nous pouvons supposer une éventuelle corrélation entre le taux d'AT (dosage d'activité) et le profil unique retrouvé dans plusieurs cas de PF. Nous remarquons, en effet, de plus faibles taux d'AT chez les PF.

Par ailleurs, le « complexe » d'AT devra être identifié (PM et pI) plus précisément avec des expériences complémentaires par spectrométrie de masse.

- **Pour la PC**

En ce qui concerne les résultats de la PC, nous avons optimisé les conditions expérimentales (nouvel anticorps plus spécifique, dilution d'anticorps primaire au 1/1500<sup>ème</sup>). Cependant, nous devons vérifier l'efficacité des conditions réductrices sur la séparation des chaînes lourde et légère de cette protéine. Nous pouvons envisager pour ceci les expériences suivantes :

- Réaliser un marquage (par l'anticorps *Sigma*) sur une membrane d'électrophorèse 2D de la PC purifiée.

- Déterminer à partir d'un Western Blot classique le PM précis des différentes formes de la PC (SC, chaîne lourde et chaîne légère). Les conditions réductrices se rapprocheront de celles respectées dans les manipulations précédentes afin de déterminer l'efficacité de rupture du pont S-S interchaîne.

Ainsi, nous pourrions continuer l'étude comparative du profil de la PC pour les autres patients.

## CONCLUSION

Au bout de deux mois de stage, notre recherche a été fructueuse et nous avons réussi à établir tous les profils de l'AT ainsi qu'une partie pour la PC. Néanmoins, d'autres expériences concernant la PC s'avèrent indispensables afin d'identifier la forme de PC détectée par l'anticorps *Sigma*.

Dorénavant, nous arrêterons l'utilisation de l'anticorps de *US Biological* en faveur de celui de *Sigma*, qui présente un immunomarquage nettement plus spécifique pour la PC.

La quantité optimale d'échantillon utilisée est de 6 µL de plasma dilué au 1/10<sup>ème</sup> pour les deux protéines. Les dilutions optimales d'anticorps sont de 1/5000<sup>ème</sup> pour l'anticorps anti-AT humaine (solution de lait à 5% dans T-TBS), de 1/1500<sup>ème</sup> pour l'anticorps anti-PC humaine (même solution) et de 1/5000<sup>ème</sup> pour l'anticorps secondaire (solution de T-TBS).

Notre choix de révéler, sur une même membrane de nitrocellulose, d'abord le profil de l'AT puis celui de la PC était justifié par la bonne spécificité de l'anticorps anti-AT mais également par une détermination relative des pI et PM de ces deux protéines. On pourra garder cet ordre de révélation comme on pourra révéler simultanément les deux protéines.

La comparaison relative des différentes glycoformes de l'AT était, dans notre cas, une bonne méthode qui nous permettait de nous passer des variations intra et interindividuelles et nous a donné des profils significativement différents entre les patients *Sepsis* et *Purpura*.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1 Tsao CM, Ho ST, Wu CC, Coagulation abnormalities in sepsis, *Acta Anesthesiol. Taiwan*, 2014.
- 2 Schouten M<sup>1</sup>, Wiersinga WJ, Levi M, van der Poll T. Inflammation, endothelium and coagulation in sepsis. *J. Leukoc. Biol.*, 2008.
- 3 **KREMSER L ???**
- 4 [www.uniprot.org/uniprot/P01008](http://www.uniprot.org/uniprot/P01008)
- 5 Aiach M., Alhenc-Gelas M., Borgel D., Emmerich SG, Picard V. Mutations des proteines de la coagulation et thrombosis. *Medecine/Sciences* 2006.
- 6 Ozier Y., Cadic A., Dovergne A. Troubles de l'hémostase et leur correction chez le patient ayant une pathologie hépatique. *MAPAR* 1999.
- 7 Van Cott KE, Williams B, Velandar WH, Gwazdauskas F, Lee T, Lubon H, Drohan WN. Affinity purification of biologically active and inactive forms of recombinant human protein C produced in porcine mammary gland.. *J. Mol. Recognit.* 1996.
- 8 Grinnell BW, Walls JD, Gerlitz B. Glycosylation of human protein C affects its secretion, processing, functional activities, and activation by thrombin. *J. Biol. Chem.* 1991.
- 9 Borgel D., Vieillard-Barron A. La protéine C activée. *Médecine/Sciences* 2011.
- 10 <http://biochimej.univ-Angers.fr/Page2/COURS/7RelStructFonction/2Biochimie/2ModifPOSTraduc/8Glycosylation/1Glycosylation.html>
- 11 <http://www.snv.jussieu.fr/vie/dossiers/glycosylation-glycation/glycosylation-glycation.html>
- 12 Kaji H, Saito H, Yamauchi Y, Shinkawa T, Taoka M, Hirabayashi J, Kasai K, Takahashi N, Isobe T. Lectin affinity capture, isotope-coded tagging and mass spectrometry to identify N-linked glycoproteins. *Nat. Biotechnol.* 2003.

- 13 Picard V, Ersdal-Badju E, Bock SC. Partial glycosylation of antithrombin III asparagine-135 is caused by the serine in the third position of its N-glycosylation consensus sequence and is responsible for production of the beta-antithrombin III isoform with enhanced heparin affinity. *Biochemistry* 1995.
- 14 Ní Ainle F, O'Donnell JS, Johnson JA, Brown L, Gleeson EM, Smith OP, Preston RJ. Activated protein C N-linked glycans modulate cytoprotective signaling function on endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 2011.
- 15 Shorr AF. ????. *J. Clin. Invest.* 1987 **PAS TROUVE ?**
- 16 Levi M<sup>1</sup>. The coagulant response in sepsis. *Clin. Chest Med.* 2008.
- 17 Lerolle N, Carlotti A, Melican K, Aubey F, Pierrot M, Diehl JL, Caille V, Hékimian G, Gandrille S, Mandet C, Bruneval P, Dumenil G, Borgel D. Assessment of the interplay between blood and skin vascular abnormalities in adult purpura fulminans. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2013.
- 18 Chalmers E, Cooper P, Forman K, Grimley C, Khair K, Minford A, Morgan M, Mumford AD. Purpura fulminans: recognition, diagnosis and management.. *Arch. Dis.Child* 2011.
- 19 Durand G, Beaudeau JL. *Biologie Médicale : Marqueurs actuels et perspectives.* Editions Masson 2003.
- 20 <http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/lafont/electrophorese/E2.html>