

UNIVERSITE DE NEUCHATEL  
FACULTE DES SCIENCES

APPROCHE DE LA STRUCTURE MOLECULAIRE  
DU FACTEUR VIII PAR DIFFERENTES TECHNIQUES  
IMMUNOLOGIQUES ET BIOMOLECULAIRES

THESE PRESENTEE A LA FACULTE DES SCIENCES PAR  
TRAN HUU TRI  
INGENIEUR CHIMISTE DIPLOME  
DE L'UNIVERSITE DE NEUCHATEL  
POUR L'OBTENTION DU GRADE  
DE DOCTEUR ES SCIENCES

LABORATOIRE DE COAGULATION  
HOPITAL CANTONAL DE BALE

MAI 1980

# IMPRIMATUR POUR LA THÈSE

Approche de la structure moléculaire du  
facteur VIII par différentes techniques  
immunologiques et biomoléculaires

de Monsieur Huu Tri Tran

---

## UNIVERSITÉ DE NEUCHÂTEL FACULTÉ DES SCIENCES

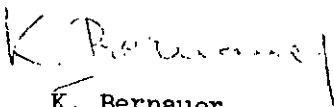
La Faculté des sciences de l'Université de Neuchâtel,  
sur le rapport des membres du jury,

MM. les professeurs D. Vonderschmitt,  
F. Duckert (Bâle), E. Stutz et F. Bachmann  
(Lausanne)

autorise l'impression de la présente thèse.

Neuchâtel, le 20 juin 1980

Le doyen:

  
K. Bernauer

A mon père  
ma mère

A mes frères et soeur

## TABLE DES MATIERES

1. INTRODUCTION ET BUT DU TRAVAIL	1
1.1. La coagulation du sang	1
1.2. L'hémophilie A et le facteur VIII	7
1.3. But du travail	18
2. PARTIE EXPERIMENTALE	19
2.1. Matériel et méthodes	19
2.1.1. Matériel	19
2.1.2. Détermination immunologique de l'activité antigénique du facteur VIII (ou activité VIII-AG)	20
2.1.2.1. Immunoelectrophorèse d'après Laurell	20
2.1.2.2. Méthode immunoradiométrique (IRMA)	22
- 1. Radioiodination et purification de l'anti-VIII-AG spécifique	23
- 2. Mode opératoire de l'IRMA	23
2.1.2.3. Immunoelectrophorèse d'après Scheidegger	26
2.1.3. Détermination de la partie porteuse de l'activité coagulante	27
2.1.3.1. Méthode biologique (activité VIII-C)	27
2.1.3.2. Méthode immunologique (activité VIII-C(Ag) )	29

2.1.4.	Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS et d'agarose	30
2.1.5.	Couplage des protéines au CNBr-Sepharose	31
2.1.6.	Préparation des anticorps	32
2.1.6.1.	Mode opératoire	32
2.1.6.2.	Diagramme de préparation	33
2.1.7.	Test de neutralisation par les anticorps	35
2.1.8.	Tampons	36
2.2.	Résultats	38
2.2.1.	Isolement et dissociation du facteur VIII	38
2.2.2.	Recombinaison des fragments VIII-AG et VIII-C	42
2.2.3.	Combinaison du fragment VIII-C et du facteur VIII	43
2.2.4.	Activation du facteur VIII et du fragment VIII-C par la thrombine	46
2.2.4.1.	En présence de chlorure de calcium	48
2.2.4.2.	En présence d'hirudine	48
2.2.4.3.	Détermination par la méthode en 2 temps	51
2.2.5.	Réduction du facteur VIII par le mercapto-2-éthanol	52
2.2.6.	Neutralisation du facteur VIII et du fragment VIII-C par différents anticorps	54
2.2.6.1.	Neutralisation du facteur VIII	54
2.2.6.2.	Neutralisation du fragment VIII-C	55

2.2.7.	Stabilité de l'activité VIII-C(Ag), de l'anti-VIII-C et du complexe VIII-C(Ag)-anti-VIII-C en fonction de la température et du pH	59
2.2.7.1.	Neutralisation de l'activité VIII-C(Ag) par l'anti-VIII-C	59
2.2.7.2.	Principe de l'étude de stabilité	61
2.2.7.3.	Stabilité en fonction de la température	64
2.2.7.4.	Stabilité en fonction du pH	68
2.2.8.	Adsorption du facteur VIII en système solide-liquide	73
2.2.8.1.	Préparation de l'anti-VIII-C-Sepharose 2BCL	73
2.2.8.2.	Adsorption du plasma humain sur l'anti-VIII-C-Sepharose 2BCL	74
2.2.8.3.	Adsorption du plasma humain sur l'anti-VIII-AG-Sepharose 2BCL	77
2.2.9.	Recherche du CRM dans les plasmas d'hémophile	79
2.2.9.1.	Description du test de blocage	79
2.2.9.2.	Blocage de l'anti-VIII-C par les plasmas d'hémophile	80
3.	DISCUSSION	82
4.	RESUME	93
5.	BIBLIOGRAPHIE	94

# 1. INTRODUCTION ET BUT DU TRAVAIL

## 1.1. LA COAGULATION DU SANG

La coagulation du sang est caractérisée par la formation d'un caillot insoluble. Cela est dû à la conversion du fibrinogène, une protéine de poids moléculaire élevé de 340.000, en fibrine insoluble sous l'action de la thrombine, une protéase à centre actif sérine. Une transamidase à centre actif cystéine ( facteur XIII<sub>a</sub> ) consolide ensuite la structure de la fibrine par formation de liaisons covalentes entre les chaînes (Fig.3).

Deux mécanismes de coagulation conduisent à la formation de la fibrine: le système intrinsèque (Fig.1) et le système extrinsèque (Fig.2). Le système intrinsèque est actionné par exposition du sang à des surfaces étrangères, autrement dit toutes les surfaces qui ne sont pas constituées par un endothélium vasculaire intact: in vivo par exemple les fibres de collagène de la paroi vasculaire, in vitro le verre. Le système extrinsèque est mis en action quand la thromboplastine tissulaire vient en contact avec les facteurs du sang lors d'une lésion vasculaire.

Quelques facteurs de la coagulation sont désignés par des noms ( fibrinogène, prothrombine, thromboplastine tissulaire, et calcium ). Pour les autres, les facteurs V à XIII, on utilise la numération romaine qui représente approximativement l'ordre chronologique dans lequel l'existence de ces facteurs a été reconnue par le " International Committee on Blood Clotting Factors ". La forme enzymatiquement active est désignée par la lettre a.

Les facteurs de coagulation (Tableau 1) sont de deux types: d'une part les proenzymes ou zymogènes ( facteurs XIII, XII, XI, X, IX, VII et prothrombine ) et d'autre part les protéines régulatrices participant soit à l'activation ( thromboplastine tissulaire, facteurs VIII et V ) soit à l'inhibition ( antithrombine III ).

La conversion des zymogènes en enzymes actives se fait invariablement par un processus de protéolyse limitée, conduisant presque toujours à la perte de fragments peptidiques et en même temps de glucides. La diminution du poids moléculaire varie, la fragmentation de la prothrombine pendant la conversion en thrombine est la plus importante. Elle représente une perte de la moitié du poids moléculaire ( 70.000 à 37.000 ).

La synthèse de quatre zymogènes ( facteurs X, IX, VII et prothrombine ) dépend dans la phase finale de la présence de la vitamine K. Cette vitamine est nécessaire au système de carboxylation d'un nombre déterminé de résidus d'acide glutamique à l'extrémité N-terminale de la protéine, 10 pour la prothrombine, 14 pour le facteur X. Ces restes  $\gamma$ -carboxy-glutamiques permettent la fixation par chélation des ions  $Ca^{2+}$  et sont importants dans la liaison de ces enzymes à la surface des phospholipides.

Le plasma normal contient de puissants inhibiteurs de protéases parmi lesquels, l'antithrombine III, de loin la plus importante, inhibe la thrombine en formant un complexe stoichiométrique 1:1 avec elle. Cette réaction est accélérée en présence de l'héparine. En outre, l'antithrombine III inhibe presque toutes les protéases de la cascade de coagulation ayant comme centre actif la sérine.

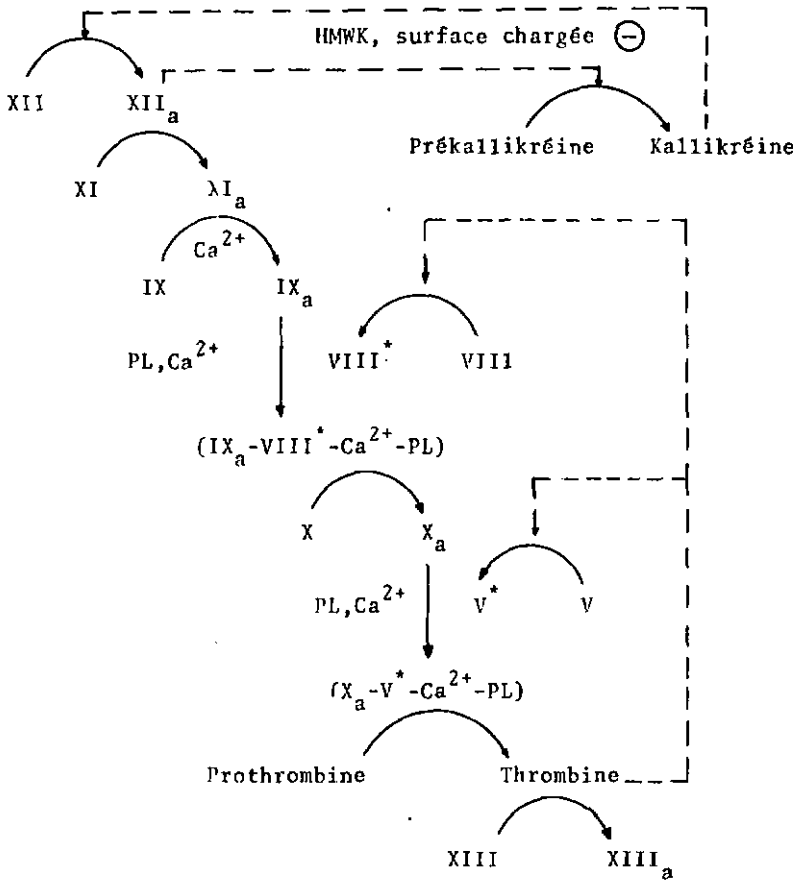
La coagulation du sang est contre-balançée par la fibrinolyse. Ainsi le réseau de fibrine peut être redissous par la plasmine, une protéase à centre actif sérine, et dont la proenzyme est le plasminogène.

### Interaction des facteurs VIII et IX dans le système intrinsèque

Dans le système intrinsèque, l'activation par contact est provoquée par l'interaction entre le facteur XII, la prékallikréine, le kininogène de poids moléculaire élevé (HMWK) et une surface chargée négativement (telle que collagène et kaolin). L'activation protéolytique réciproque du facteur XII et de la prékallikréine conduit à la formation du facteur XII<sub>a</sub> et de la kallikréine, HMWK accélère les réactions d'activation à la surface activatrice. Le facteur XII<sub>a</sub> à son tour active le facteur XI en facteur XI<sub>a</sub>.

La conversion du facteur IX en facteur IX<sub>a</sub> par le facteur XI<sub>a</sub> en présence des ions Ca<sup>2+</sup> se fait en 2 étapes (1). Dans la première étape, une liaison peptidique interne du facteur IX est hydrolysée, donnant naissance à un intermédiaire non actif composé de 2 chaînes polypeptidiques reliées par un ou plusieurs ponts disulfures. Dans la seconde étape, un polypeptide de poids moléculaire de 9000 est séparé du composé intermédiaire produisant ainsi le facteur IX<sub>a</sub>. Dans la réaction subséquente du système intrinsèque, le complexe formé par les facteurs IX<sub>a</sub> et VIII, les ions Ca<sup>2+</sup> et les phospholipides catalyse la conversion du facteur X en facteur X<sub>a</sub> (2). Le facteur VIII nécessite d'abord une modification moléculaire par la thrombine avant sa participation dans le système intrinsèque (3). Il agit alors comme protéine régulatrice dans la génération de X<sub>a</sub>.

La coïncidence des 2 systèmes intrinsèque et extrinsèque après la formation du facteur X<sub>a</sub> vaut aux dernières réactions de la coagulation le nom de système commun.



**Fig.1.** Cascade de génération des enzymes dans le système intrinsèque. PL = phospholipides, \* indique l'activation du facteur régulateur concerné. HMWK = kininogène de poids moléculaire élevé (high molecular weight kininogen).



Facteur de coagulation	Systeme intrinsèque	Systeme extrinsèque	Poids moléculaire
Fibrinogène (facteur I)	+	+	340 000
Prothrombine (facteur II)	+	+	68 000 - 72 000
Thromboplastine (facteur III)		+	
Ions calcium(II) (facteur IV)	+	+	40
Facteur V	+	+	290 000 - 400 000
Facteur VII		+	53 000 - 63 000
Facteur VIII	+		>10 <sup>6</sup>
Facteur IX	+		55 000 - 70 000
Facteur X	+	+	55 000
Facteur XI	+		160 000
Facteur XII	+		90 000
Facteur XIII	+	+	320 000 (plasma) 146 000 (thrombocytes)

Tableau 1. Quelques propriétés des facteurs de coagulation.

## 1.2. L'HEMOPHILIE A ET LE FACTEUR VIII

La maladie hémorragique appelée hémophilie est connue dès l'antiquité. En Suisse, plusieurs grandes familles atteintes d'hémophilie ont été décrites au siècle dernier de façon très complète (4). La caractérisation de cette maladie héréditaire est beaucoup plus récente. La mesure du temps de coagulation du sang complet a été la première technique de laboratoire employée pour la détection de l'hémophilie (5). Plus tard on a remarqué que le sang d'un hémophile pouvait corriger le temps de coagulation d'un autre, distinguant ainsi deux sortes d'hémophilie, l'hémophilie A ou classique et l'hémophilie B, caractérisées par la déficience de deux facteurs de coagulation différents, le facteur VIII ( ou facteur antihémophilique AHF ou globuline antihémophilique AHG ) pour le type A et le facteur IX ( ou facteur Christmas (6) ou "plasma thromboplastin component" (7) ) pour le type B. Chimiquement, ces deux facteurs de coagulation se distinguent facilement. Le facteur IX est adsorbé par le sulfate de harium, alors que le facteur VIII ne l'est pas (8).

Le facteur VIII est également diminué dans une autre maladie hémorragique héréditaire, la maladie von Willebrand (9).

### Principales méthodes de préparation du facteur VIII

Les hémorragies provoquées par la déficience héréditaire ne peuvent être jugulées que par remplacement du facteur déficient au moyen de transfusion de sang, de plasma ou mieux de concentrés.

Dans le traitement des hémophiles A, on utilise souvent le cryoprécipité préparé à partir du plasma normal (10) et le concentré du facteur VIII préparé par différentes méthodes (11,12,13). En dégelant lentement et à froid le plasma congelé,

on obtient un petit résidu non soluble à cette température, appelé alors cryoprécipité et contenant une quantité appréciable de facteur VIII.

Le cryoprécipité et le concentré de facteur VIII contiennent du fibrinogène en grande quantité. Celui-ci peut être éliminé par adsorption sur la bentonite (14), par précipitation fractionnée avec le polyéthylène glycol (11,15), par protéolyse sélective (16,17) ou par filtration sur gel. Dans le plasma la bentonite adsorbe sélectivement le fibrinogène, malheureusement dans les fractions partiellement purifiées, elle adsorbe aussi le facteur VIII (15). La filtration sur gel d'agarose semble être la méthode la plus efficace pour séparer le facteur VIII du fibrinogène; avec cette technique le facteur VIII apparaît le premier dans l'effluent tandis le fibrinogène est élué plus tardivement (18). La chromatographie sur des échangeurs d'ions donne souvent un rendement faible et variable. La sensibilité du facteur VIII aux protéases rend la purification plus difficile. La combinaison de plusieurs étapes de purification permet d'obtenir un facteur VIII hautement purifié (15,19).

#### Caractérisations physicochimiques

Les premières caractérisations physicochimiques du facteur VIII montrent qu'il s'agit d'une protéine de poids moléculaire très élevé ( $> 10^6$ ) (19,20,21) et qu'il est formé par la polymérisation de polypeptides de poids moléculaire de 200.000 liés entre eux par des ponts disulfures (19,22,23).

La composition en acides aminés du facteur VIII bovin (19) et humain (15,23,24) a été décrite dans la littérature. Les analyses de différents laboratoires donnent des résultats similaires.

La proportion des lipides varie de 0 à 10% selon les méthodes de préparation (15,17,24). Ce sont apparemment des contaminants, car leur composition dans les préparations purifiées dépend de la quantité des chylomicrons contenus dans le plasma (20).

Les chaînes polypeptidiques ( ou sous-unités ) du facteur VIII humain réduit contiennent entre 5 - 10% de glucides (15,17,24) qui pourraient jouer un rôle important dans l'activité de von Willebrand (25).

#### Activités biologiques et immunologique

Biologiquement le facteur VIII possède deux activités différentes:

- a) l'activité coagulante, déficiente dans l'hémophilie A, responsable de la normalisation du temps de coagulation du sang ou du plasma du malade. Elle est déterminée par les techniques de coagulation. Cette activité est aussi diminuée dans la maladie von Willebrand.
- b) l'activité von Willebrand, diminuée ou absente dans la maladie von Willebrand. Elle est responsable d'une part de la rétention des plaquettes sanguines sur une colonne de billes de verre et d'autre part de l'agrégation plaquettaire en présence de Ristocétine A. On l'appelle pour cela aussi cofacteur de la Ristocétine A. Les plaquettes du sang de malade sont moins retenues sur le verre que celles du sujet normal (26,27). La mesure de rétention des plaquettes sur les billes de verre nécessite une bonne standardisation de la méthode en particulier de la vitesse d'écoulement du sang dans la colonne. La Ristocétine est un antibiotique abandonné dès les premiers essais cliniques. Elle cause en effet une thrombocytopénie. On a trouvé que, in vivo, elle provoque l'agrégation des plaquettes (28) et démontré in vitro que le facteur VIII humain est nécessaire à cette agrégation (29,30).

En plus de ces activités biologiques, comme toutes les protéines, le facteur VIII humain est un antigène: il est par exemple précipité par l'antisérum de lapin par formation de complexe. Cette propriété est aussi désignée par concentration antigénique. On parle alors d'antigène parent du facteur VIII ou encore antigène du facteur von Willebrand. L'antigène se trouve en quantité normale chez les hémophiles, en faible quantité et même parfois absent chez les patients von Willebrand.

#### Anticorps et inhibiteur du facteur VIII

L'antisérum, obtenu par injection du facteur VIII humain à d'autres espèces telles que le lapin, la chèvre et le canard précipite le facteur VIII et inhibe les activités biologiques. Dans certains cas, la neutralisation de l'activité coagulante est faible (31). Ces antisérums hétérologues contribuent grandement à l'étude immunologique de la molécule du facteur VIII. Ils permettent de différencier l'activité von Willebrand et l'antigène du facteur VIII. En phase liquide, l'antigène est précipité, ce qui correspond aussi à la neutralisation de l'activité von Willebrand. Par analyse en immunoelectrophorèse à 2 dimensions, l'hétérogénéité de l'antigène dans le plasma normal est démontrée par la différence de mobilité de plusieurs formes moléculaires séparées par les techniques conventionnelles (32). Les formes moléculaires de faible mobilité se trouvent dans le cryoprécipité et représentent presque toute l'activité von Willebrand (36), tandis que le cryosurnageant contient les formes moléculaires de mobilité élevée. L'antigène dans les variants de von Willebrand ( voir plus loin ) se distingue du facteur VIII/von Willebrand normal par sa mobilité plus élevée (33-35) et par la diminution de l'affinité envers l'anticorps démontrée par la méthode immunoradiométrique (37,38).

L'hémophile peut éventuellement développer un anticorps affectant spécifiquement l'activité coagulante du facteur VIII (40). Cet anticorps homologue, appelé en clinique aussi inhibiteur, se forme plus souvent chez les hémophiles graves que dans les cas modérés. La formation de cet anticorps pose de sérieux problèmes dans le traitement de substitution par transfusion. Dès l'apparition de l'anticorps on arrête, si c'est possible, la substitution pour éviter l'augmentation du titre de l'anticorps qui rend le malade totalement réfractaire au facteur VIII.

L'hémophilie acquise est caractérisée par une diminution de l'activité coagulante du facteur VIII chez un individu auparavant normal, diminution due à l'apparition d'un inhibiteur. Ce phénomène rare a été néanmoins observé chez les malades traités à la pénicilline (39) ou avec d'autres médicaments (55), et dans des cas de polyarthrite chronique évolutive, de grossesse et de lupus érythémateux systémique (54).

Les caractérisations de l'anticorps homologue montrent qu'il s'agit d'immunoglobulines de la classe IgG (41,43,44,46) et plus rarement de la classe IgM (42,45).

L'inhibiteur humain, capable de neutraliser l'activité coagulante en phase liquide sans précipiter l'antigène, est plus spécifique que l'antisérum hétérologue dans l'étude immunologique du facteur VIII d'hémophile. Lorsqu'une protéine du plasma d'hémophile (peu ou pas d'activité coagulante) peut neutraliser l'anticorps humain dans un test en 2 temps, on dit alors que ce plasma contient du "cross-reacting material" (CRM) et qu'il est CRM<sup>+</sup> (ou A<sup>+</sup>). Environ 10% des hémophiles possèdent une quantité de CRM équivalente à celle du plasma normal (représenté alors par l'activité coagulante), détectable par cet anticorps (47-51). De plus, ces hémophiles retiennent fréquemment une certaine activité coagulante dans leur plasma (3-10% de l'activité normale). Apparemment, ce variant d'hémophile

possède une molécule de facteur VIII, légèrement défectueuse quant à l'activité coagulante, mais dont la capacité antigénique dirigée contre l'anticorps homologue est pleinement conservée, contrairement à une autre forme plus sévère où le facteur VIII est complètement dépourvu de ces déterminants antigéniques qui pourraient réagir avec l'inhibiteur humain.

Un malade von Willebrand développe rarement un anticorps contre le facteur VIII. Ce dernier est alors capable de précipiter l'antigène et de neutraliser les activités biologiques coagulante et von Willebrand (52,53). Il s'agit là aussi de la fraction d'immunoglobuline de la classe IgG.

#### Symptômes cliniques et diagnostic

L'hémophilie A est la maladie hémorragique héréditaire la plus fréquente. Les symptômes cliniques les plus caractéristiques sont les saignements dans les articulations provoquant une limitation de la mobilité, l'hématurie, l'épistaxis, ce qui, dans les cas extrêmes, peut avoir des conséquences mortelles. On distingue trois degrés d'hémophilie: sévère ( 0-1% de l'activité normale ), moyen ( 2-6% ) et léger ( 10-15% ).

Dans la maladie de von Willebrand, le temps de saignement de légères blessures est anormalement prolongé mais on observe rarement des hémorragies graves comme on en voit chez les hémophiles.

Ces deux maladies se distinguent aussi de façon très typique par l'effet que produit l'administration du plasma. Chez l'hémophile, l'augmentation de l'activité coagulante du facteur VIII est immédiate et proportionnelle à la quantité de facteur VIII injectée. En cas de maladie de von Willebrand, par contre, si la réponse initiale est semblable à celle de l'hémophilie, l'activité coagulante du facteur VIII augmente ensuite au-delà des valeurs calculées (56,58). L'administration d'un concentré préparé à partir du plasma d'hémophile

produit également une augmentation de l'activité coagulante chez le malade von Willebrand (57). Le mécanisme de cette augmentation in vivo suggère que la partie porteuse de l'activité coagulante et le facteur von Willebrand seraient synthétisés par deux gènes différents (62).

Le tableau 2 rassemble quelques paramètres de laboratoire destinés au diagnostic de ces maladies.

Tableau 2. Quelques paramètres à considérer dans le diagnostic de l'hémophilie A et de la maladie de von Willebrand.

Paramètre	Hémophilie A	von Willebrand
Symptômes cliniques	Hémorragie profonde dans les tissus musculaires et articulations, épistaxis, hématurie	Déformations rares des articulations, épistaxis fréquente
Temps de saignement	normal	prolongé
Activité coagulante du facteur VIII	diminuée	plus ou moins diminuée
Activité von Willebrand (rétention des plaquettes et cofacteur de Ristocétine)	normale	plus ou moins diminuée
Antigène du facteur VIII	normal	plus ou moins diminué
Réponse à la perfusion de plasma normal ou de concentré de facteur VIII	augmentation immédiate de l'activité coagulante correspondant à la quantité de facteur VIII perfusée	augmentation de l'activité coagulante dépassant la quantité de facteur VIII perfusée
Développement d'anticorps homologues contre le facteur VIII	chez environ 10% des hémophiles	très rare

Les variants de von Willebrand rencontrés chez les malades nécessitent une subdivision de cette maladie (Tableau 3).

Tableau 3. Quelques variants de von Willebrand (58-61).

d = diminué, n = normal (ou apparemment normal), TS = temps de saignement, VIII-C = activité coagulante, VIII-AG= antigène VWA = activité von Willebrand.

Variant	TS	VIII-C	VIII-AG	VWA
type 1	prolongé	d	d	d
type 2	prolongé	n ou d	n	d
type 3	prolongé	n	d	d
type 4	normal ou légèrement prolongé	d	d	d

L'antigène et l'activité coagulante du facteur VIII dans la détection des conductrices

Les études génétiques de l'hémophilie A soutiennent la thèse d'une maladie récessive liée au chromosome X. Au départ, on a observé que seuls les hommes étaient atteints par la maladie. Toutefois, la fille d'un hémophile bien qu'apparemment saine peut avoir un fils hémophile. Cette particularité s'explique simplement par le mode de transmission de l'hémophilie A.

Chaque cellule somatique contient 23 paires de chromosomes dont 22 paires autosomales ( se composant de 2 chromosomes

identiques dans les 2 sexes ) et une paire de chromosomes liée au sexe ( XY chez l'homme et XX chez la femme ). La conductrice de l'hémophilie A possède un chromosome X normal et un chromosome X anormal, porteur du gène responsable de la maladie. Sa descendance ( masculine ou féminine ) a donc 50% de chance d'hériter du chromosome X anormal, et dans ce cas sa fille sera conductrice et son fils hémophile (Fig.4a). L'hémophile a un chromosome X anormal et un chromosome Y. Par conséquent toutes ses filles seront conductrices, tandis que tous ses fils seront normaux et qu'ils ne pourront plus transmettre la maladie à leur descendance (Fig.4b).

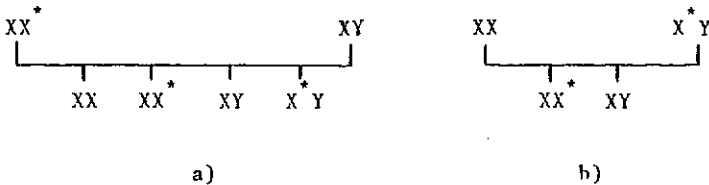


Fig.4. Explication schématique de la transmission du gène malade.  $XX^*$  conductrice,  $X^*Y$  hémophile.

La maladie de von Willebrand est décrite dans la plupart de cas comme autosomale et dominante (63-65), les 2 sexes sont également affectés.

Les observations faites chez les conductrices de l'hémophilie A peuvent être expliquées par l'hypothèse de Lyon (66), c'est-à-dire par l'inactivation d'un des chromosomes X chez l'embryon féminin. Cette inactivation est faite au hasard de sorte que la probabilité de l'inactivation du chromosome X normal ou du chromosome X anormal est la même. Il en résulte que les conductrices ont une activité coagulante équivalente à la

moitié de celle de l'individu normal. Ce n'est vrai que statistiquement. Selon l'hypothèse de Lyon, il est possible dans les cas extrêmes d'avoir 0% de l'activité coagulante si tous les chromosomes X normaux sont inactivés ou au contraire 100% si ce sont les chromosomes X anormaux qui sont éliminés. Toutes les autres variations sont possibles. Ceci est indépendant de la variation physiologique normale. Comme le domaine physiologique normal de l'activité coagulante s'étend de 0,5 à 1,8 U/ml, ce seul paramètre est insuffisant pour détecter les conductrices. En se basant sur les deux paramètres de l'activité coagulante et de l'antigène (70-74), la détection des conductrices s'est révélée plus précise qu'avec la seule détermination de l'activité coagulante (75,76). Le rapport théorique entre l'activité coagulante et la concentration antigénique est donc de l'ordre de 0,5. Cependant, les résultats obtenus avec deux sortes d'anticorps homologue et hétérologue (67-69) et l'apparition de l'activité coagulante liée à une protéine de faible poids moléculaire après la perfusion chez le malade von Willebrand (62) indiquent qu'un gène sur un chromosome contrôle la synthèse de l'antigène du facteur VIII et de l'activité von Willebrand et qu'un autre gène sur le chromosome X est responsable de la production de l'activité coagulante.

#### Facteur VIII: une molécule possédant 2 activités biologiques?

La corrélation entre activité coagulante et antigène chez les individus normaux est importante pour la détection des conductrices. La co-purification des activités coagulante et von Willebrand par des techniques conventionnelles montre un lien biologique entre les 2 entités et suggère qu'elles se trouvent sur la même molécule. Cependant le phénomène clinique observé après transfusion chez le malade von Willebrand montre que l'activité coagulante pourrait être indépendante de la synthèse de l'activité von Willebrand.

Par ultracentrifugation dans un gradient de sucrose aux concentrations élevées de NaCl, le facteur VIII pourrait se dissocier en fragments actifs de faible poids moléculaire (84). Ces résultats ont été confirmés plus tard par filtration sur gel dans un tampon à force ionique élevée (77-83) ou en présence de détergent (79). L'estimation du poids moléculaire du composé portant l'activité coagulante est de l'ordre de 100.000 - 200.000, cependant la quantification de la protéine est moins précise. Le composé de poids moléculaire plus élevé, portant l'activité von Willebrand, représente l'antigène et la majeure partie de la protéine.

La thrombine a été aussi utilisée pour dissocier le facteur VIII (86) qui peut être séparé en deux entités par filtration sur gel en présence de  $\text{CaCl}_2$  0,25 M (93,95), et dont l'activité coagulante sédimente plus lentement par ultracentrifugation (85). Cette dissociation du facteur VIII par la thrombine suggère qu'en présence de  $\text{CaCl}_2$  0,25 M la partie porteuse de l'activité coagulante pourrait être séparée de l'antigène par la protéolyse. En plus, la présence des inhibiteurs de protéases durant tout le processus d'isolement du facteur VIII diminue le phénomène de dissociation (94).

Le traitement du facteur VIII par des réducteurs des ponts disulfures tels que le mercapto-2-éthanol induit une réduction moléculaire de l'antigène (88) de même que le periodate de sodium par oxydation de 2 fonctions hydroxyles adjacentes des carbohydrates (87).

Tout récemment le composé de faible poids moléculaire a été isolé sur les immunoabsorbants (89-91) ou par équilibre de partition entre l'antigène libre et l'antigène immobilisé (92).

### 1.3. BUT DU TRAVAIL

Ce travail est consacré à l'étude des caractéristiques biologiques du fragment VIII-C obtenu par filtration sur gel en présence de  $\text{CaCl}_2$  0,25 M particulièrement à sa recombinaison avec le fragment VIII-AG et à son activation par la thrombine, puis à l'étude des propriétés de l'anticorps contre le fragment VIII-C. L'étude immunochimique du facteur VIII et du fragment VIII-C en fonction de différents anticorps contribue à la caractérisation partielle de la molécule du facteur VIII.

## 2. PARTIE EXPERIMENTALE

---

### 2.1. MATERIEL ET METHODES

---

#### 2.1.1. Matériel

---

Matériel de départ pour l'isolement du facteur VIII:

Cryoprécipité AHF ( SRK Berne, courtoisie du Dr. Stampfli ) ou concentré AHF de même provenance ( produits impropres à la transfusion ). Ces deux préparations sont dissoutes dans l'eau désionisée de façon à donner une densité optique de 50 à 280 nm.

Réactifs:

Tris(hydroxyméthylamino)méthane (TRIS), fluorure de phénylméthylsulfonyle (PMSF), chlorure de benzamidinium (BzHCl), dodécylsulfate de sodium (SDS), iodoacétamide, de Merck (Darmstadt). Alumina C $\gamma$  gel Grade A 25%, di-isopropyfluorophosphate (DPP), mercapto-2-éthanol, de Calbiochem (San Diego). Albumine sérique bovine (BSA) fraction V, de Fluka (Buchs). Liquémine 5000 U-USP/ml, de Hoffmann-La Roche (Bâle). Trasylol 20.000 U-KI/ml, de Bayer AG (Leverkusen). Hirudine 1000 U-AT/mg, de Pentapharm (Bâle). Antisérum de lapin contre le facteur VIII humain Clotimmun AHG, de Behring (Marburg.a.d. Lahn). Polyéthylèneglycol 6000 (PEG), de Serva (Heidelberg). Sepharose 4B, Sepharose 2BCL, Sephadex G-25, DEAE-Sephadex A-50 de Pharmacia (Uppsala). Agarose de Litex (Clostrup). Biogel A-15m de Bio-Rad (Richmond). Membranes d'ultrafiltration XM 100, d'Amicon (Oosterhout). Facteur X<sub>a</sub> 20 U/ml, thrombine 1400 U-NIH/mg courtoisie du Dr.C.M.Jackson, St Louis (Missouri).

## 2.1.2. Détermination immunologique de l'activité antigénique

### du facteur VIII ( ou activité VIII-AG )

#### 2.1.2.1. Immunoélectrophorèse d'après Laurell (96)

L'antigène, ici le facteur VIII ( respectivement le fragment VIII-AG ) migre dans un champ électrique vers l'anode dans un gel d'agarose au pH 8,8 contenant l'antisérum. Le complexe antigène-anticorps précipite quand le rapport des concentrations est favorable. Ce précipité prend la forme de fusée (Fig.5a) mise en évidence par coloration. La hauteur des fusées est proportionnelle à la concentration de l'antigène.

0,1 ml d'antisérum Behring sont ajoutés à 13 ml d'agarose 1% (p/v) dissous dans le tampon TRIS-barbital-glycine pH 8,8 , maintenu liquide à 56°C. Le mélange est versé en couche homogène sur une plaque de verre 9 x 12 cm. Après durcissement de la couche par refroidissement, la plaque est posée dans un support en plastique relié aux 2 pôles par 2 ponts d'agarose. La couche est perforée par une rangée de trous de 2 mm de diamètre dans lesquels les dilutions du facteur VIII sont apposées (5 µl). La plaque, refroidie par contact du support avec un bloc métallique à circulation d'eau froide, est ensuite maintenue sous une tension de 10 V/cm pendant 20 h. Après avoir été enlevée du support, elle est lavée successivement avec du NaCl 0,15 M et de l'eau, pressée après chaque lavage avec du tissu de cellulose et séchée dans un courant d'air chaud. Le lavage élimine toutes les protéines solubles contenues soit dans l'antisérum soit dans la solution d'antigène. Il ne reste que le précipité antigène-anticorps. Finalement la coloration des fusées se fait par immersion de la plaque pendant 10 minutes dans une solution de bleu de Coomassie Brillant R 0,2% (p/v) dissous dans l'acide acétique - méthanol - H<sub>2</sub>O (1:5:5). La courbe

d'étalonnage est représentée par la hauteur de la fusée en fonction de la dilution du plasma humain normal (Fig.5b). 1 U d'activité VIII-AG est l'équivalence contenue dans 1 ml du plasma humain normal préparé par mélange en parties aliquotes du plasma de 11 donneurs et congelé à  $-170^{\circ}\text{C}$ .

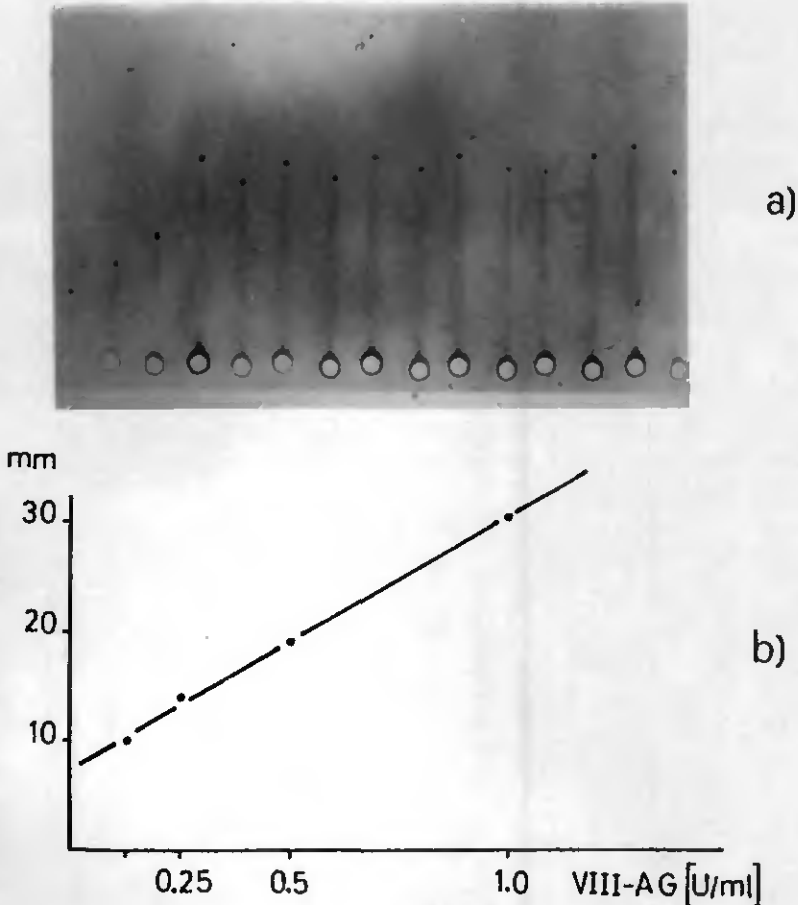


Fig.5. Immunoelectrophorèse d'après Laurell.  
 a) Exemple d'une plaque montrant les fusées de précipitation.  
 b) Courbe d'étalonnage de l'activité VIII-AG. La hauteur de la fusée en mm est représentée en fonction de l'activité VIII-AG en solution. Les 4 premières fusées de gauche constituent la courbe d'étalonnage.

### 2.1.2.2. Méthode immunoradiométrique (IMMUNORADIOMETRIC ASSAY)

Hoyer (97) a développé la méthode RIA (RadioImmunoAssay) pour le facteur VIII en système liquide-liquide. Cette technique a une sensibilité et une précision supérieures à la technique de Laurell. Tout récemment, une seconde technique nommée IRMA à site double, appliquée à la détermination de l'activité VIII-AG (98,99), a été introduite dans notre laboratoire. Le principe consiste à coupler l'anticorps non marqué sur une matrice insoluble qui peut être utilisée pour extraire immunologiquement l'antigène actif du liquide biologique (première réaction) (100). Pourvu que l'antigène ait plus d'un site immunologiquement actif, sa rétention sur l'immunoabsorbant peut être mesurée par réaction subséquente avec le même anticorps radiomarqué (deuxième réaction) (101). La quantité de radioactivité retenue par la seconde réaction est proportionnelle à la concentration de l'antigène retenu dans la première réaction. La méthode est représentée schématiquement par la figure 6.

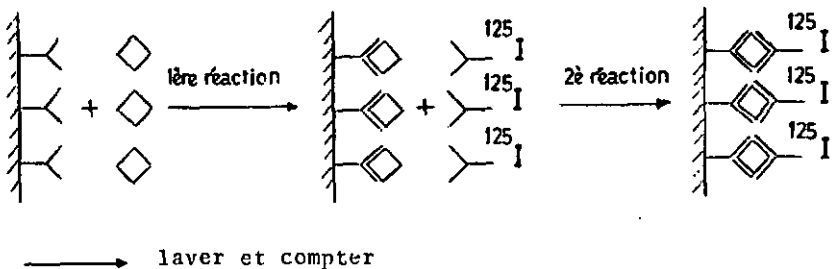


Fig.6. Principe de la technique d'IRMA à site double.

◇ = antigène, Y = anticorps, | | matrice insoluble.

#### 2.1.2.2.1. Radioiodination et purification de l'anti-VIII-AG spécifique

Dans cette méthode, l'antisérum utilisé provient exclusivement de nos lapins. La purification de la fraction IgG est décrite sous §2.1.6 . 0,05 ml de cette fraction (0,6 mg) dans le tampon phosphate de sodium 0,05 M pH 7,5 sont marqués avec l'iodure de sodium  $^{125}\text{I}$  radioactif (1 mCi) par la méthode à la chloramine-T (102) puis séparés de l'iodure en excès par filtration sur gel sur une colonne de Sephadex G-25 prééquilibrée avec le tampon TRIS-NaCl contenant 1 mg/ml BSA pH 7,4. La séparation de l'anti-VIII-AG de la fraction d'immunoglobuline globale radiomarkée est faite par l'adsorption de celui-ci sur l'immunoadsorbant VIII-Sepharose 2BCL et son élution en milieu acide: 2 ml  $^{125}\text{I}$ -IgG sont alors ajoutés à 0,2 ml VIII-Sepharose (50 U VIII-AG/ml) et le mélange est maintenu sous agitation magnétique pendant 2h à température ambiante. Le gel est ensuite lavé avec 8 x 2 ml de tampon TRIS-NaCl contenant 1 mg/ml BSA par resuspension et centrifugation. Dès que la radioactivité de la solution de lavage est très faible, le gel est resuspendu dans 2 ml de tampon glycine-NaCl contenant 1 mg/ml BSA, pH 2,5 , pendant 10 minutes. Le surnageant, séparé du gel par centrifugation, est ramené au pH 7,4 par l'adjonction de TRIS 0,1 M - NaCl 0,1 M contenant 1 mg/ml BSA, pH 8,8. Ce matériel final contient environ  $5 \times 10^6$  cpm par ml (counts per minute).

#### 2.1.2.2.2. Mode opératoire de l'IRMA

La paroi intérieure des tubes en polystyrène 10 x 70 mm (Semadeni, Berne) est d'abord revêtue d'anticorps non marqué: 0,5 ml de la fraction IgG diluée 1:2000 dans le tampon  $\text{NaHCO}_3$  0,05 M , pH 9,6 . On laisse en contact pendant 12 h à 4°C. La solution est ensuite aspirée, le tube lavé une fois avec

0,7 ml de tampon de dilution est incubé pendant 20 h à 37°C avec 0,2 ml de l'échantillon contenant l'antigène à mesurer dilué dans le même tampon. Le plasma normal dilué de 1:200 à 1:12800 est utilisé comme standard. Après l'aspiration de l'échantillon, le tube est rincé avec 2 x 0,5 ml de tampon de dilution. On ajoute alors dans le tube vide 0,2 ml de  $^{125}\text{I}$ -anti-VIII-AG spécifique, dilué dans le tampon de dilution pour donner environ 5000 cpm ( dilution 1:200 du matériel fraîchement préparé ) et on incube pendant 20 h à 37°C. Le réactif est alors enlevé par aspiration, le tube rincé avec 2 x 5 ml d'eau désionisée. La radioactivité retenue à la surface du tube est mesurée pendant 5 minutes dans un scintillateur à rayon  $\gamma$ . Le pourcentage de radioactivité retenue par rapport à la quantité totale ajoutée est exprimé en fonction de la dilution du plasma humain normal. Un exemple de calcul et la courbe d'étalonnage sont représentés dans le tableau 4 et la figure 7.

Tableau 4. Exemple de calcul d'une courbe d'étalonnage.  
QTAA = quantité totale de radioactivité ajoutée

Dilution du plasma humain	VIII-AG (U/ml x 10 <sup>-3</sup> )	Radioactivité (counts/5min)	% retenu
1:200	5,0	15 937	62,5
1:400	2,5	11 801	46,3
1:800	1,25	7 634	29,9
1:1600	0,625	4 202	16,5
1:3200	0,313	2 355	9,2
1:6400	0,157	1 589	6,2
1:12800	0,079	1 089	4,3
QTAA	-	25 513	100

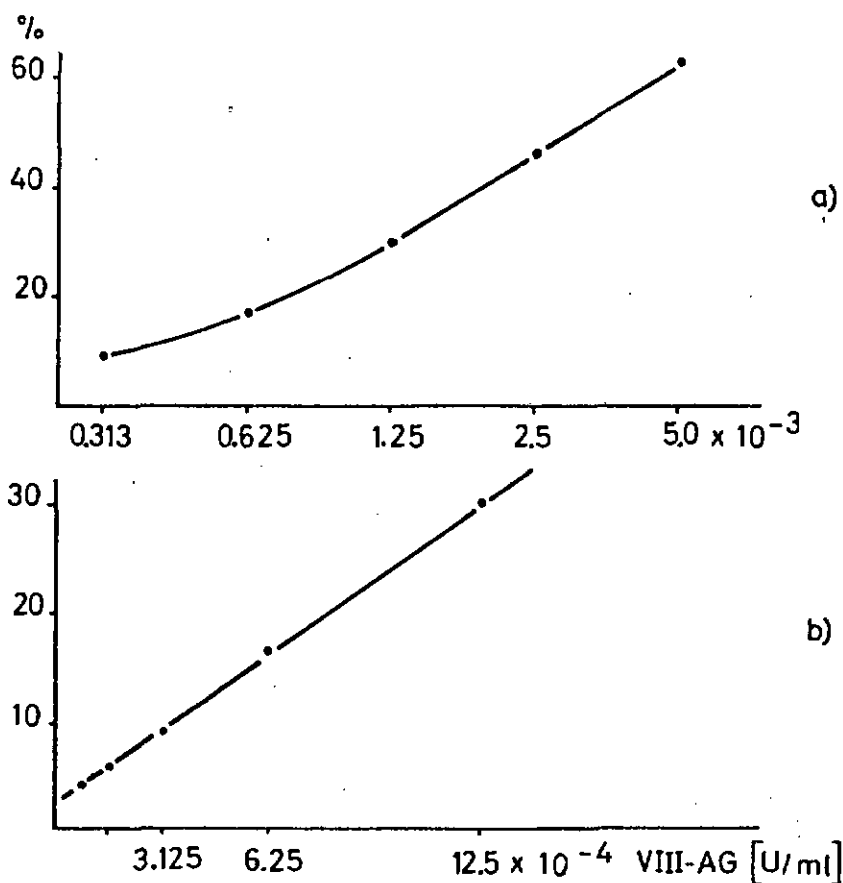


Fig.7. Courbes d'étalonnage de l'activité VIII-AG déterminée par la méthode d'IRMA. La radioactivité retenue à la surface du tube en % par rapport à la quantité totale de radioactivité ajoutée est représentée en fonction de l'activité VIII-AG en solution.

- a) domaine de mesure  $0,625 - 5,0 \times 10^{-3}$  U/ml échelle linéaire (y) - log (U/ml).
- b) domaine de mesure  $0,8 - 12,5 \times 10^{-4}$  U/ml échelle linéaire (y) - linéaire (U/ml).

### 2.1.2.3. Immunoélectrophorèse d'après Scheidegger (103)

La présence de l'anti-VIII-AG est qualitativement mise en évidence par l'immunoélectrodifusion. Le facteur VIII ( respectivement le fragment VIII-AG ) migre dans un gel d'agarose 1% 9 x 12 cm sous une tension de 10 ~ 20 V/cm. Quand le bleu de bromophénol, utilisé comme indicateur, a migré de 5 cm dans le gel, une bande de gel de 2mm de largeur parallèle à la direction de migration, distante latéralement d'1 cm du trou d'application, est enlevée avec une lame et remplacée par 0,07 ml d'antisérum. La diffusion se fait pendant 72 h dans une chambre saturée de vapeur d'eau à température ambiante. Le gel est ensuite lavé, pressé et séché, puis les lignes de précipitation sont colorées avec la solution diluée de bleu de Coomassie Brillant R comme sous § 2.1.2.1. (Fig.8).

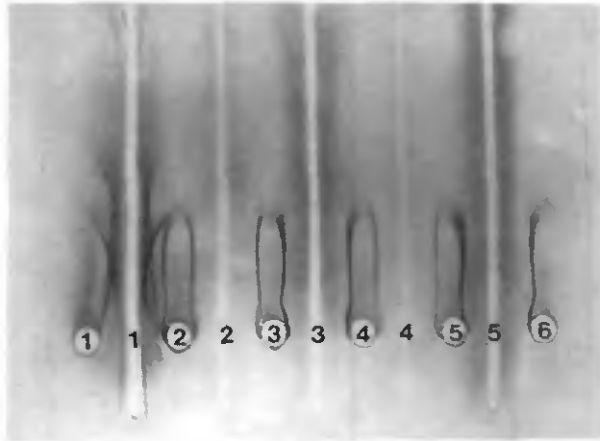


Fig.8. Immunoélectrodifusion d'après Scheidegger à pH 8,8. Trou 1: NHP (plasma humain normal), trous 2-6: NHP+facteur VIII  
Bande I: antisérum anti-VIII après adsorption sur  $Al(OH)_3$ ,  
2: après adsorption sur NHP-Sephadex, 3: précipité avec  $(NH_4)_2SO_4$ , 4: chromatographié sur DEAE-Sephadex A-50,  
5: concentré avec  $(NH_4)_2SO_4$ .

### 2.1.3. Détermination de la partie porteuse de

#### l'activité coagulante

#### 2.1.3.1. Méthode biologique ( activité VIII-C )

Deux méthodes sont utilisées pour la détermination de l'activité VIII-C: la première, appelée méthode en un temps, est basée sur le temps de thromboplastine partielle avec le kaolin comme activateur (104), la seconde, méthode en 2 temps selon Biggs et al (105) et modifiée par Denson (106), est basée sur le principe de la formation du facteur  $X_a$ . L'enregistrement du temps de coagulation est fait dans les 2 cas automatiquement à l'aide du coagulomètre Schnitger & Gross. La courbe d'étalonnage est représentée par le temps de coagulation en secondes en fonction de la dilution du plasma humain normal sur le papier à double échelle logarithmique (Fig. 9).

Dans la méthode en un temps, l'activité coagulante biologique est déterminée par sa capacité à corriger le temps de coagulation d'un plasma d'hémophile ayant une activité inférieure à 0,01 U/ml ( 1 U est l'activité équivalente à celle de 1 ml du plasma humain normal ). On incube 0,1 ml du plasma d'hémophile avec 0,1 ml du mélange de kaolin 6 mg/ml - phospholipide ( dilution 1:500 de la solution mère (107) ) à 37°C pendant 15 minutes. Ensuite 0,1 ml de  $CaCl_2$  25 mM sont ajoutés et le temps de coagulation du mélange est enregistré. Pour le dosage de l'activité VIII-C en présence de thrombine ou de chlorure de calcium 0,25 M, des modifications ont été apportées à la méthode de façon à la rendre adéquate (Tableau 5).

Tableau 5. Dosage de l'activité VIII-C du facteur VIII par la méthode en un temps. normale (n), échantillon en présence de thrombine (Th) ou en présence de  $\text{CaCl}_2$  0,25 M (Ca). L'incubation se fait dans les 3 cas à  $37^{\circ}\text{C}$  pendant 15 minutes. Les volumes sont exprimés en ml.

	n	Th	Ca
Plasma d'hémophile	0,1	0,1	0,1
KaoIn-phospholipide	0,1	0,1	0,1
		INC	INC
Echantillon	0,1	0,1	0,2
		INC	
$\text{CaCl}_2$ 25 mM	0,1	0,1	-

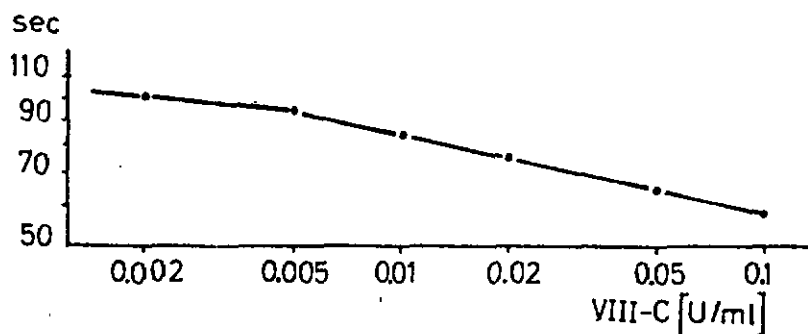


Fig.9. Courbe d'étalonnage de l'activité VIII-C déterminée par la méthode en un temps. Le temps de coagulation (sec) est représenté en fonction de l'activité VIII-C en solution.

Dans la méthode en 2 temps, le réactif est préparé par mélange à volumes égaux de sérum humain normal dilué 1:10 , de phospholipide dilué 1:50 et du facteur V bovin activé dilué 1:100 (~1 U/ml). Dans le premier temps, 0,1 ml du réactif est incubé avec 0,1 ml de la dilution de l'échantillon en présence de 0,1 ml de  $\text{CaCl}_2$  25 mM pendant 10 minutes à 37°C. Puis 0,1 ml du plasma normal est ajouté et le temps de coagulation est enregistré ( deuxième temps ). Dans cette méthode, l'échantillon à mesurer doit être privé des facteurs de coagulation dépendant de la vitamine K. Ces facteurs sont éliminés par l'adsorption à l'Alumina (  $\text{Al(OH)}_3$  ) .

Dans le texte, les termes d'activité coagulante biologique VIII-C et d'activité coagulante sont utilisés indifféremment.

#### 2.1.3.2. Méthode immunologique (activité VIII-C(Ag) )

On parle de l'activité coagulante immunologique VIII-C(Ag) lorsque l'anticorps neutralise l'activité coagulante biologique sans modifier l'activité antigénique du facteur VIII. La partie porteuse de l'activité VIII-C(Ag) est synonyme de CRM ( voir § 1.2.). Le complexe formé entre le fragment VIII-C et l'anticorps (anti-VIII-C) ne précipite pas et possède très peu d'activité coagulante. Cette activité VIII-C(Ag) est plus stable que l'activité coagulante pendant la conservation.

L'exemple typique de cette sorte d'anticorps est l'inhibiteur homologue ( voir § 1.2.).

#### 2.1.4. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide

en présence de SDS et d'agarose 0,5%

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS et d'agarose 0,5% (p/v) est faite à pH 7,2 dans le tampon phosphate de sodium 0,1 M (108,109). L'agarose est ajouté pour des raisons mécaniques. L'échantillon est mélangé à parts égales avec l'urée 8 M - SDS 2% (p/v). Pour la réduction totale du facteur VIII, le mélange est chauffé à 100°C pendant 2 minutes en présence de 2% (v/v) de mercapto-2-éthanol.

Préparation du gel de polyacrylamide à 3%:

1,2 g d'agarose Litex sont dissous dans 100 ml d'eau désionisée par chauffage. La solution d'agarose est maintenue liquide à 56°C dans un bain-marie. Pour préparer du gel de polyacrylamide à 3%, on mélange les solutions suivantes: 3 ml d'acrylamide (acrylamide 28 g et N,N'-diméthylacrylamide 0,75 g dans 100 ml d'eau), 5,8 ml H<sub>2</sub>O, 7 ml de phosphate de sodium et SDS (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 10,24 g, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 3,12 g, SDS 0,8 g dans 200 ml H<sub>2</sub>O pH 7,2), 25 µl N,N,N',N'-tétraméthyléthylènediamine (TEMED). Le mélange est porté à 56°C pendant 5 minutes. Puis on ajoute 11,6 ml d'agarose et 0,6 ml de peroxydisulfate d'ammonium ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) au mélange, avec lequel on remplit immédiatement une série de tubes de verre 0,5 x 8,7 cm placés verticalement sur un support en caoutchouc faisant bouchon (1,2 ml de mélange pour un gel de 6 cm).

En présence de SDS, les protéines sont dénaturées en se chargeant négativement et migrent vers l'anode du champ électrique. La position de migration de la protéine dans le gel ne dépend alors que de son poids moléculaire, ce qui permet une estimation de ce dernier: plus la migration est rapide, plus le poids moléculaire de la protéine est faible.



2 x 50 volumes du même tampon pendant 24 h à froid. Après la fixation des protéines, les sites du gel restant actifs sont neutralisés par l'éthanolamine 1 M dans le tampon bicarbonate. Le support est ensuite lavé alternativement par les tampons acétate de sodium 0,1 M pH 5 et bicarbonate de sodium 0,1 M pH 9 contenant 1 M de NaCl pour enlever les protéines seulement adsorbées à la surface du gel. Le gel est conservé à 4°C en présence de  $\text{NaN}_3$  0,02% (p/v).

### 2.1.6. Préparation des anticorps

#### 2.1.6.1. Mode opératoire

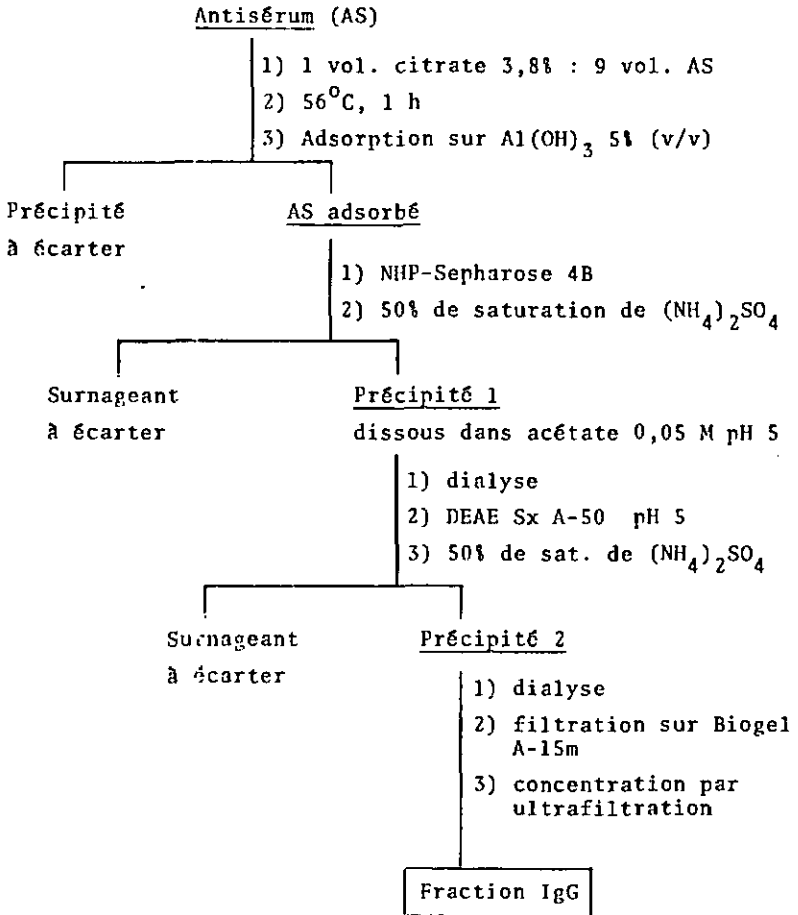
Les lapins sont sensibilisés par les antigènes isolés (facteur VIII, fragments VIII-AG et VIII-C). 0,5 ml de chaque solution émulsifiée avec une même quantité d'adjuvant incomplet de Freund sont injectés sur le dos par voie sous-cutanée.

Après quatre injections successives, à raison d'une injection par semaine, le sang est collecté et abandonné pendant une journée à température ambiante. Les prises de sang subséquentes sont faites une semaine après 2 injections de rappel à une semaine d'intervalle. L'antisérum est pipeté et clarifié par centrifugation. A 9 volumes d'antisérum on ajoute un volume de citrate de sodium 3,8% (p/v) puis on chauffe à 56°C pendant une heure et adsorbe l'antisérum sur  $\text{Al}(\text{OH})_3$  jusqu'à ce que le taux du facteur X soit inférieur à 1%. Un passage de l'antisérum sur une colonne de NHP-Sepharose 4B (3 ml du plasma humain normal (NHP) sont couplés à 30 ml de CNBr-Sepharose 4B) permet d'éliminer les impuretés d'immuno-précipitation mises en évidence par l'immunoélectrodifusion de Scheidegger (Fig.8). Ces impuretés proviennent de

l'immunisation par des traces de diverses protéines dans les préparations des antigènes. L'antisérum est ensuite précipité avec le sulfate d'ammonium à 50% de saturation, le précipité redissous dans le tampon d'acétate de sodium 0,05 M , pH 5 est dialysé contre le même tampon. Un précipité formé pendant la dialyse est éliminé par centrifugation, le surnageant est appliqué à une colonne de DEAE-Sephadex A-50 (2 volumes d'antisérum pour un volume de gel) prééquilibré avec le même tampon. Les protéines non retenues sont concentrées par précipitation à 50% de saturation de sulfate d'ammonium. Le précipité est redissous dans le tampon TRIS-NaCl pH 7,4 , dialysé contre 100 volumes du même tampon et filtré sur une colonne de Biogel A-15m. Les fractions correspondant aux IgG sont réunies, concentrées par ultrafiltration et conservées à  $-20^{\circ}\text{C}$ . La valeur d'absorption à 280 nm d'une solution IgG 1 g/100 ml est prise égale à 13,8 ( $A_{280}^{1\%} = 13,8$ ).

Désormais les fractions IgG correspondant à l'antisérum obtenu par l'injection des antigènes du facteur VIII, des fragments VIII-AG et VIII-C sont appelées respectivement anti-VIII , anti-VIII-AG et anti-VIII-C.

#### 2.1.6.2. Diagramme de préparation



### 2.1.7. Test de neutralisation par les anticorps

L'unité Bethesda a été originalement utilisée pour mesurer la capacité inhibitrice des anticorps humains (111) dans la neutralisation de l'activité VIII-C du facteur VIII. Un antisérum contenant 1 U Bethesda inhibe 50% de l'activité coagulante biologique du plasma humain normal dans les conditions expérimentales décrites ci-dessous.

0,1 ml du plasma humain normal est incubé avec 0,1 ml d'une série de dilutions croissantes de l'antisérum pendant 2 h à 37°C. L'activité coagulante résiduelle est mesurée par la méthode en un temps, en utilisant le plasma d'hémophile comme substrat. Le contrôle se fait avec le tampon de dilution au lieu de la dilution de l'antisérum. En représentant l'activité résiduelle VIII-C (en % par rapport au contrôle) en fonction de la dilution de l'antisérum, on obtient la courbe de neutralisation. La dilution de l'antisérum pour obtenir 50% de l'activité VIII-C résiduelle représente l'inverse du nombre d'unités Bethesda de l'antisérum (Fig.10).

En plus du plasma humain normal, le cryoprécipité ( voir sous § 2.2.6.1.), le facteur VIII obtenu par filtration sur gel ( voir sous § 2.2.7.) et le fragment VIII-C ( voir sous § 2.2.6.2.) sont aussi utilisés et spécifiquement mentionnés dans les expériences correspondantes.

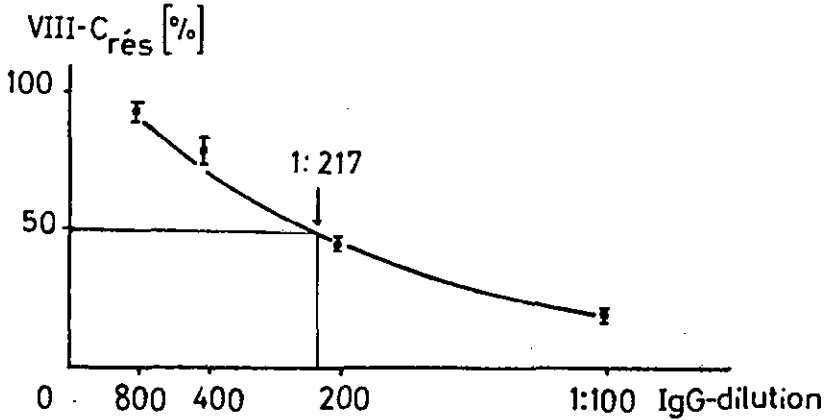


Fig.10. Exemple de détermination de la capacité inhibitrice d'un anti-VIII-C hétérologue. Cet anti-VIII-C, après avoir été adsorbé sur l'immunoabsorbant VIII-AG-Sepharose 2BCL, ne neutralise plus le fragment VIII-AG et contient 217 U Bethesda /ml d'anti-VIII-C.

#### 2.1.8. Tampons

Tampon d'immunoelectrophorèse (techniques de Laurell et Scheidegger):

TRIS-barbital-glycine pH 8,8 : Véronal 0,315 mole (65 g),  
acide barbiturique 0,056 mole (10,35 g), glycine 3,743 moles  
(281 g), TRIS 1,866 mole (226 g) dissous dans 10 L H<sub>2</sub>O

Tampon d'électrophorèse (gel de polyacrylamide):

128 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  , 39 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  , 10 g SDS , 2 g  $\text{NaN}_3$   
dissous dans 10 L  $\text{H}_2\text{O}$  pH 7,2

Tampon de dissociation du complexe antigène-anticorps:

Glycine-NaCl pH 2,5 : glycine 0,05 M - NaCl 0,1 M - BSA 1mg/ml  
3,745 g glycine , 5,84 g NaCl , 1 g BSA dissous dans environ  
1 L  $\text{H}_2\text{O}$ , ajuster le pH à 2,5 avec HCl 2 M (~15 ml)

Tampon TRIS-NaCl:

TRIS 0,02 M - NaCl 0,2 M -  $\text{NaN}_3$  0,02% : 2,42 g TRIS , 11,7 g  
NaCl dissous dans 1 L  $\text{H}_2\text{O}$ , ajuster le pH à 7,4 avec HCl 1 M

Tampon de dilution: pour diluer les échantillons lors de la  
détermination,  $\text{CH}_3\text{COONa}$  0,0264M - NaCl 0,108 M , BSA 1 mg/ml -  
 $\text{NaN}_3$  0,02% - véronal 0,0264 M pH 7,35:

3,598 g  $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  , 5,45 g véronal, 6,3 g NaCl , 1 g BSA  
dissous dans environ 1 L, ajuster le pH à 7,35 avec 160,7 ml  
HCl 0,1 M

Tampon 1:

TRIS 0,05 M - NaCl 0,2 M - BzHCl 1 mM - PMSF 1 mM - PEG 6000  
0,1% -  $\text{NaN}_3$  0,01% pH 7,5

Tampon 2:

TRIS 0,05 M -  $\text{CaCl}_2$  0,25 M - BzHCl 1 mM - PMSF 1 mM -  
PEG 6000 0,1% -  $\text{NaN}_3$  0,01% pH 7,5

Tampon 3:

TRIS 0,05 M - NaCl 1 M - BzHCl 1 mM - PMSF 1 mM - PEG 6000  
0,1% -  $\text{NaN}_3$  0,01% pH 7,5

## 2.2. RESULTATS

## 2.2.1. Isolement et dissociation du facteur VIII

Les principales étapes du procédé sont indiquées dans la figure 11.

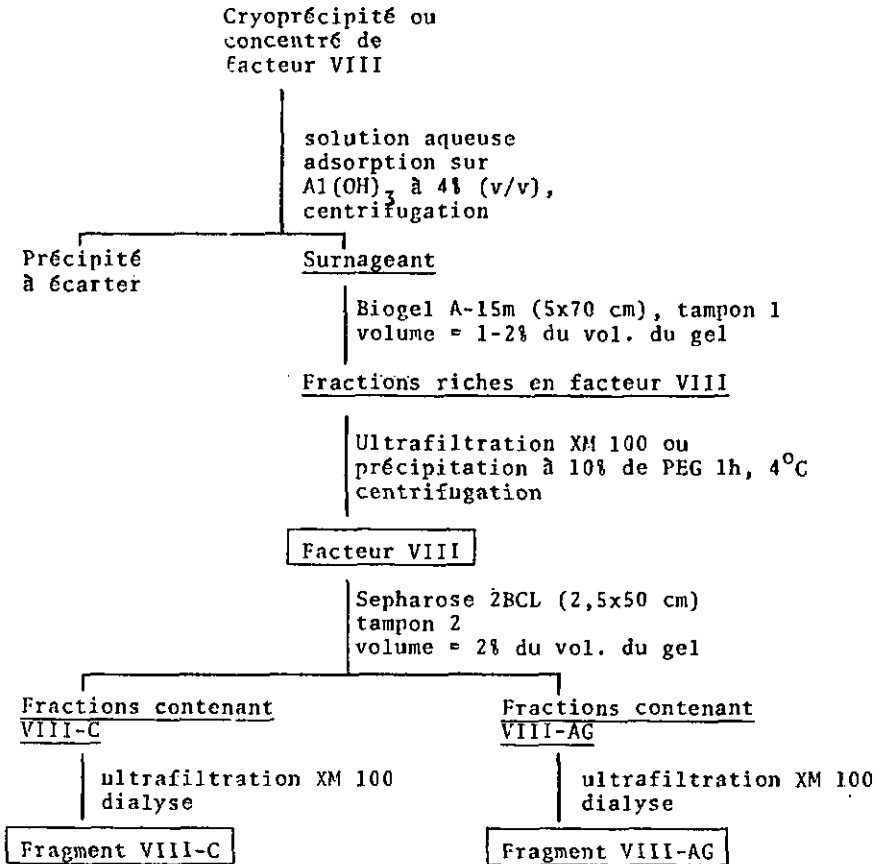


Fig.11. Procédé d'isolement et de dissociation du facteur VIII. Les produits encadrés ont servi à l'immunisation des lapins.

Des inhibiteurs de protéases tels que PMSF 1 mM , DFP 1 mM et BzHCl 1 mM sont présents à toutes les étapes. Le rendement pour les activités VIII-C et VIII-AG est mentionné pour chaque étape dans le tableau 6.

Tableau 6. Activité et rendement en VIII-C et VIII-AG au cours de l'isolement. Les nombres entre parenthèses montrent les valeurs extrêmes. Colonne 2: nombre d'expériences , colonne 3: rapport des activités VIII-C sur VIII-AG , colonne 4:activité spécifique VIII-C par unité d'absorption à 280 nm, colonne 5: rendement des activités VIII-C et VIII-AG en %.

Etape	Nb.exp.	Rapport VIII-C sur VIII-AG	Activité spécifique VIII-C	Rendement (%)	
				VIII-C	VIII-AG
Produit de départ	16	0,3 (0,12-0,73)	0,5	100	100
Adsorbé sur Al(OH) <sub>3</sub>	15	0,26 (0,11-0,50)	-	86 (60-100)	96 (80-100)
Filtration sur Biogel A-15m	16	0,37 (0,16-0,72)	12,5	49 (23-87)	44 (25-69)
Facteur VIII purifié	13	0,29 (0,11-0,75)	16,2	33 ( 7-68)	35 (25-41)
Filtration sur gel Sepharose 2BCL en présence de CaCl <sub>2</sub> 0,25 M	8	-	-	26 ( 5-44)	33 (22-40)

La filtration sur Biogel A-15m ou sur Sepharose 2BCL du concentré ou du facteur VIII en présence du tampon 1 montre que les fragments VIII-C et VIII-AG sont élués dans

le volume interstitiel de la colonne (Fig.12). Les pics des activités VIII-C et VIII-AG sont légèrement déplacés vers la droite par rapport à l'absorption à 280 nm.

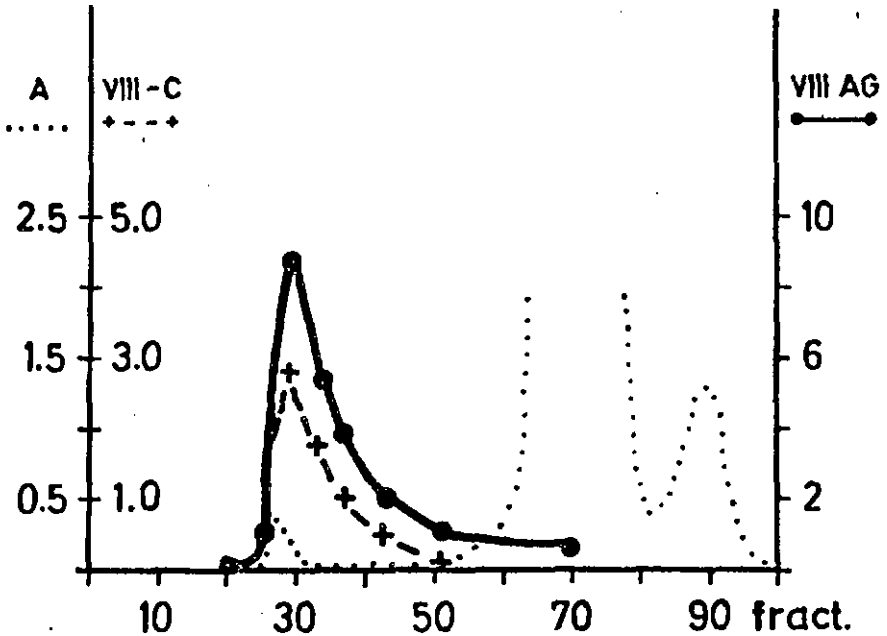


Fig.12. Isolement du facteur VIII. Filtration sur Biogel A-15m (5x70 cm) avec le tampon 1, 60 ml/h, 10 ml/fraction. Le volume interstitiel correspond à 420 ml d'effluent. Absorption à 280 nm (A), activités antigénique (VIII-AG) et coagulante (VIII-C) en U/ml dans les différentes fractions.

Par filtration sur gel en présence de  $\text{CaCl}_2$  0,25 M, le fragment VIII-C, de faible poids moléculaire, est nettement élué dans le volume interne de la colonne et séparé du fragment VIII-AG qui, de poids moléculaire plus élevé, est

toujours élué dans le volume interstitiel (Fig.13). Cependant une faible activité VIII-C se retrouve encore dans les fractions contenant le fragment VIII-AG ( $< 0,1$  U/ml), et inversement. La détermination de l'activité VIII-AG par la technique de Laurell est peu précise pour des concentrations inférieures à  $0,1$  U/ml. Cette contamination peut être mise en évidence par concentration du fragment VIII-C ou par dosage d'après la technique d'IRMA. Cette dernière méthode révèle une contamination de  $0,06$  U/ml VIII-AG dans la préparation du fragment VIII-C. Le rapport des activités VIII-C/VIII-AG dans les préparations des fragments VIII-C et VIII-AG est respectivement de 30 et  $0,01$ . Le second pic sur la figure 2 à  $280$  nm représente la position de BSA.

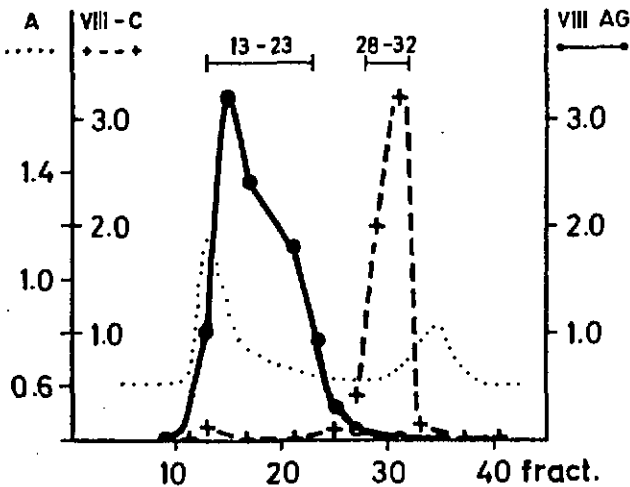


Fig.13. Dissociation du facteur VIII en présence de  $0,25$  M de  $\text{CaCl}_2$ . Filtration sur Sepharose 2BCL ( $1,6 \times 29$  cm) avec le tampon 2 contenant  $1$  mg/ml BSA,  $5$  ml/h,  $1,6$  ml/fraction. Absorption à  $280$  nm (A), activités antigénique (VIII-AG) et coagulante (VIII-C) en U/ml dans les différentes fractions.

A titre d'exemple, la dissociation du facteur VIII est moins nette en présence de NaCl 1 M. En effet le fragment VIII-C est présent dans un plus large volume d'effluent (Fig.14).

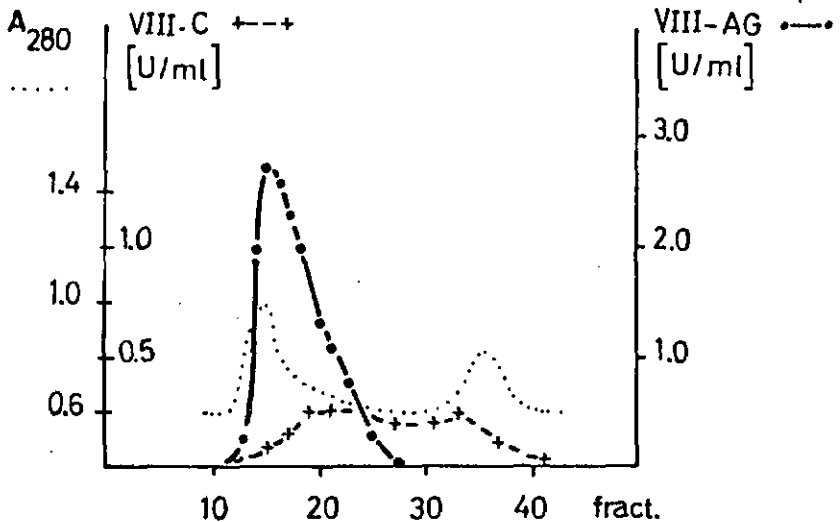


Fig.14. Dissociation du facteur VIII en présence de NaCl 1 M.

### 2.2.2. Recombinaison des fragments VIII-AG et VIII-C

Les fractions contenant le fragment VIII-C d'une part et celles contenant le fragment VIII-AG d'autre part (marquées par un trait horizontal sur la Fig.13) sont dialysées pendant une nuit contre 50 volumes du tampon 1. Les solutions sont ensuite réunies et concentrées par ultrafiltration sur XM 100. Le concentré obtenu est appliqué sur une colonne de Sepharose 2BCL et élué avec le tampon 1. Les activités VIII-C et VIII-AG se retrouvent alors dans les mêmes fractions (Fig.15). Par cette technique de "recombinaison", le fragment VIII-C se lie de nouveau au fragment VIII-AG. Le second pic indique la position de BSA.

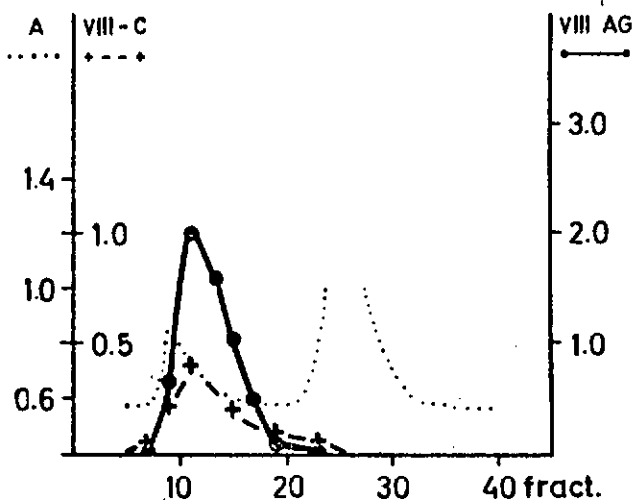


Fig.15. "Recombinaison" du facteur VIII. Les fractions 13-23 et 28-32 obtenues par dissociation (Fig.13) sont mélangées et dialysées pour éliminer le  $\text{CaCl}_2$ . Filtration du mélange sur Sepharose 2BCL (1,5x29 cm) avec le tampon 1 contenant 1 mg/ml BSA, 5 ml/h, 1,6 ml/fraction. Absorption à 280 nm (A), activités VIII-AG et VIII-C en U/ml dans les différentes fractions.

### 2.2.3. Combinaison du fragment VIII-C et du facteur VIII

Nous avons donc observé la combinaison des fragments VIII-C et VIII-AG par la technique de filtration sur gel. Cette combinaison nous incite à voir si le facteur VIII lui-même possède aussi une affinité envers le fragment VIII-C.

Dans cette expérience, le facteur VIII et le fragment VIII-C proviennent d'une même expérience d'isolement. Des quantités connues de facteur VIII et de fragment VIII-C sont mélangées et appliquées à une colonne de Sepharose 2BCL. Dans les contrôles, le facteur VIII et le fragment VIII-C sont filtrés séparément sur la même colonne (Fig.16).

Quoique le rendement du fragment VIII-C après filtration sur gel soit très faible, le maximum d'activité d'environ 0,04 U/ml est observé à la fraction 21 (Fig.16a), correspondant à un poids moléculaire faible. Le maximum de l'activité coagulante du facteur VIII (Fig.16b) et du mélange (Fig.16c) s'élève respectivement à 0,2 et 0,4 U/ml à la fraction 11 où l'activité antigénique est maximale (1,2 U/ml).

En comparant les activités retrouvées dans l'effluent, on observe que l'activité VIII-C du mélange est presque doublée sous le pic de l'activité VIII-AG, qui est restée constante dans les 2 cas. Donc le facteur VIII peut fixer le fragment VIII-C ajouté. En plus, la présence du fragment VIII-AG (provenant du facteur VIII) augmente la stabilité de l'activité du fragment VIII-C lors de la filtration sur gel.

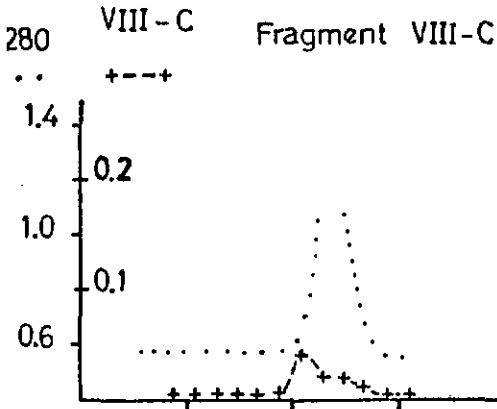
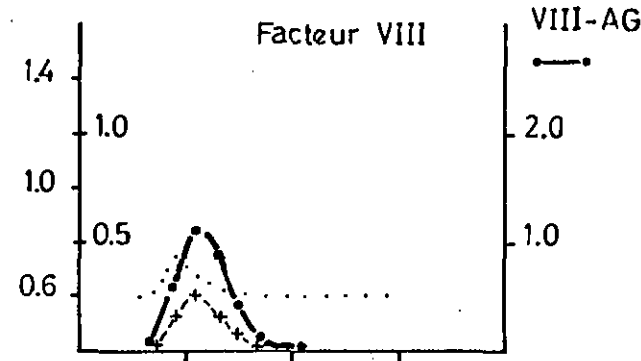
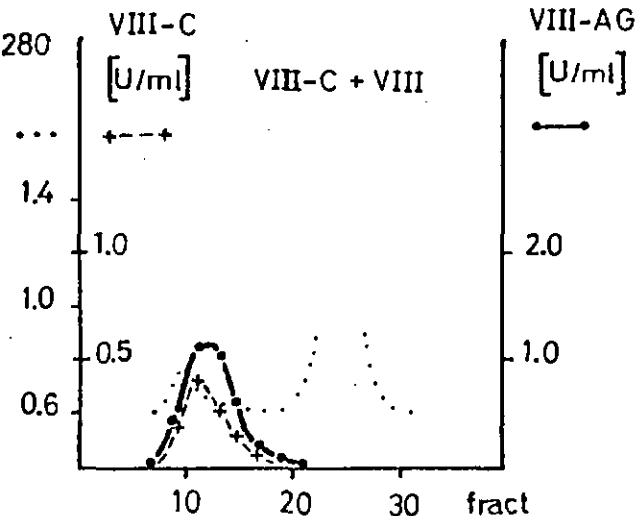


Fig.16. Combinaison du facteur VIII et du fragment VIII-C.

a) Filtration du fragment VIII-C (1ml, 1,2U) sur Sepharose 2BCL (1,5x29cm). 1,5 ml/fraction, 5 ml/h  
 Rendement VIII-C 18%



b) Filtration du facteur VIII sur la même colonne (2ml, 2,6U VIII-C, 11,8U VIII-AG)  
 Rendement VIII-C 78%  
 VIII-AG 88%



c) Filtration du mélange (2ml) de facteur VIII (0,5ml, 2,6U VIII-C, 11,8U VIII-AG) et de fragment VIII-C (2ml, 2,3U VIII-C). L'activité VIII-AG est sensiblement la même que sous b), tandis que l'activité VIII-C est presque doublée.  
 Rendement VIII-C 73%  
 VIII-AG 78%

### 2.2.4. Activation du facteur VIII et du fragment VIII-C

#### par la thrombine

Lorsque le facteur VIII est préincubé avec la thrombine, le temps de coagulation est raccourci dans la méthode en un temps. Ce phénomène correspond à une activation du facteur VIII. On a prouvé que la présence de la thrombine, dans la dilution finale, n'exerce aucun effet sur le système de mesure.

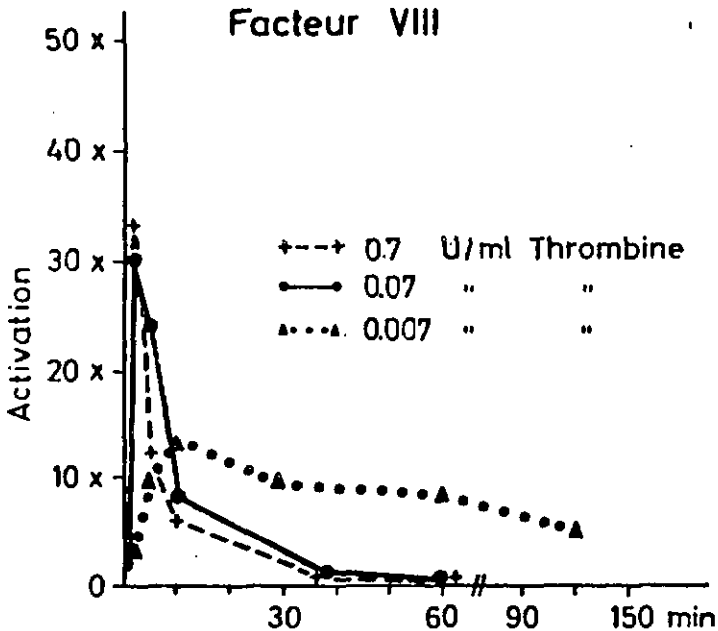


Fig.17. Activation du facteur VIII par la thrombine en fonction du temps. 200  $\mu$ l de facteur VIII (1 U/ml VIII-C) en présence de 10  $\mu$ l d'une solution de thrombine. Les concentrations finales de thrombine sont indiquées sur la figure.

La figure 17 montre l'activation du facteur VIII en présence de 3 différentes concentrations de thrombine en fonction du temps. Quand le facteur VIII est incubé avec 0,07 U/ml de thrombine, l'activité coagulante augmente de 30 fois après 1 minute d'incubation et diminue rapidement avec le temps. Après une heure d'incubation à 4°C, l'activité coagulante ne représente plus que 10% de la valeur de contrôle (sans thrombine). A une concentration plus élevée de thrombine (0,7 U/ml) l'activation est plus rapide, de même que l'inactivation. A une faible concentration de thrombine (0,007 U/ml), l'activation atteint moins rapidement le maximum (10 min.) qui est plus faible, et décroît lentement avec le temps.

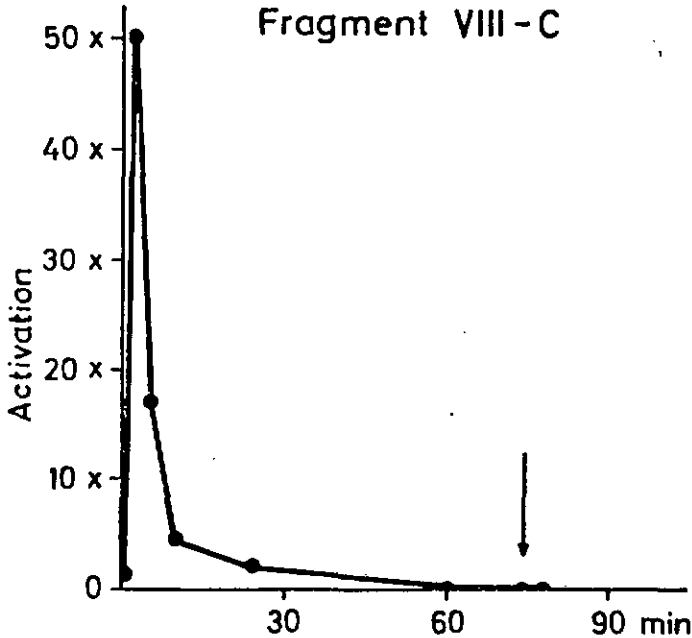


Fig.18. Activation du fragment VIII-C par la thrombine en fonction du temps. 200  $\mu$ l de VIII-C (1,2 U/ml) en présence de 10  $\mu$ l d'une solution de thrombine (concentration finale 0,7 U/ml). Après 73 minutes d'incubation, une seconde addition de thrombine ne provoque pas de nouvelle activation.

Le fragment VIII-C peut aussi être activé par la thrombine, de la même manière que le facteur VIII (Fig.18). Après que le taux d'activité coagulante est retombé à environ 10% de la valeur de contrôle (sans thrombine), une nouvelle addition de thrombine indiquée par la flèche ne peut plus activer le fragment VIII-C.

#### 2.2.4.1. En présence de chlorure de calcium

La figure 19 représente l'activation du fragment VIII-C en présence de  $\text{CaCl}_2$ . On a utilisé des concentrations variant entre 0 et 250 mM. Avec l'élévation de la concentration de  $\text{CaCl}_2$ , le coefficient d'activation diminue, l'activation est retardée et l'inactivation est également ralentie.

Le facteur VIII présente le même phénomène de retardement (résultats non représentés).

#### 2.2.4.2. En présence d'hirudine

L'activation du facteur VIII par la thrombine est étudiée en présence de l'hirudine ajoutée (Fig.20):

- 1) avant que l'activation atteigne le maximum: le coefficient d'activation reste à peu près constant pendant 2h et décline lentement, l'activation du facteur VIII est de nouveau visible après une nouvelle addition de thrombine (0,7 U/ml) 4h plus tard
- 2) après dépassement du maximum: le mélange se comporte à peu près comme dans le contrôle (sans addition d'hirudine)
- 3) dans le troisième cas, le facteur VIII est traité par un mélange de thrombine-hirudine fraîchement préparé. L'activité coagulante n'est nullement affectée jusqu'à une nouvelle addition de thrombine (0,7 U/ml).

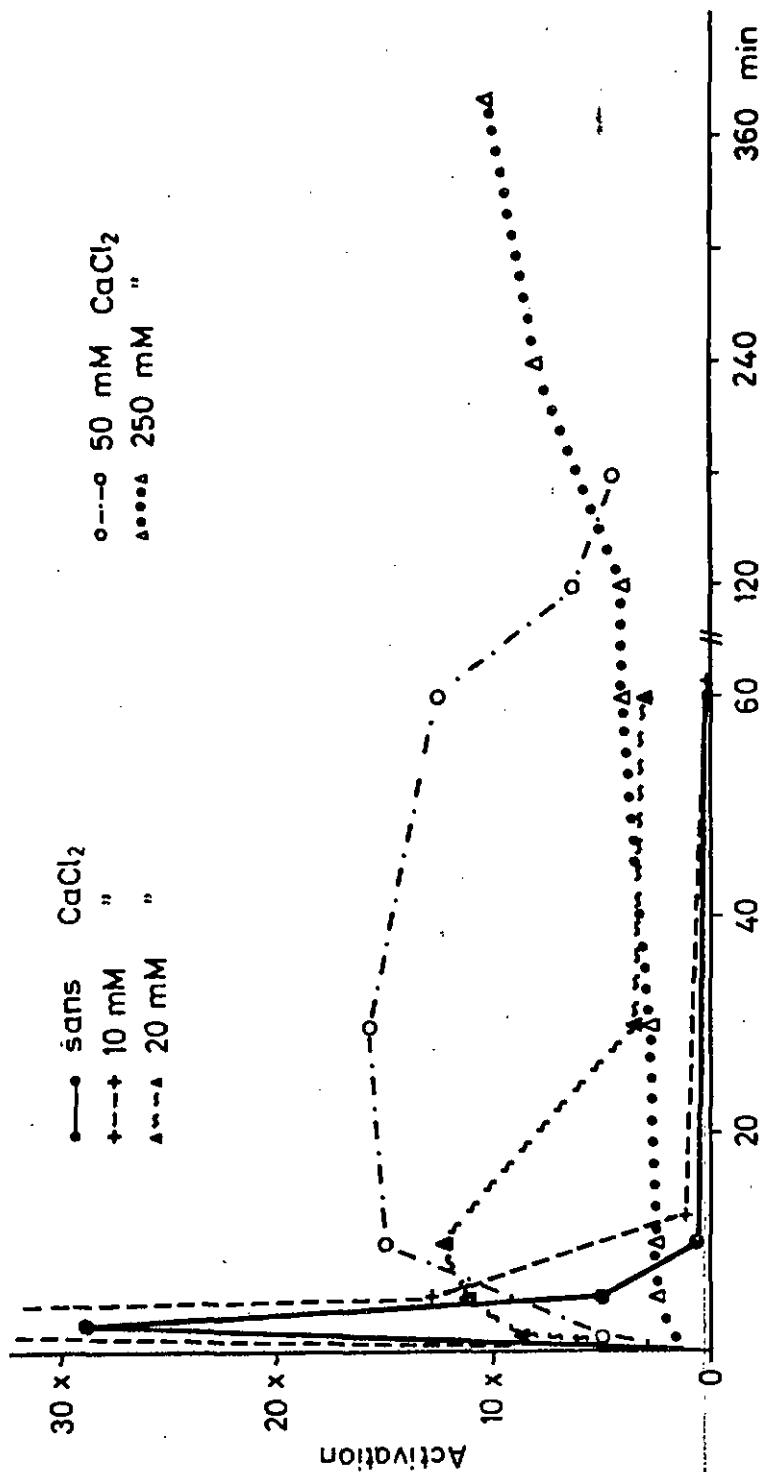


Fig. 19. Activation du fragment VIII-C (0,8 U/ml) par la thrombine (0,7 U/ml) en présence de différentes concentrations de CaCl<sub>2</sub> en fonction du temps.

Fig. 20. Activation du facteur VIII par la thrombine en présence d'hirudine.

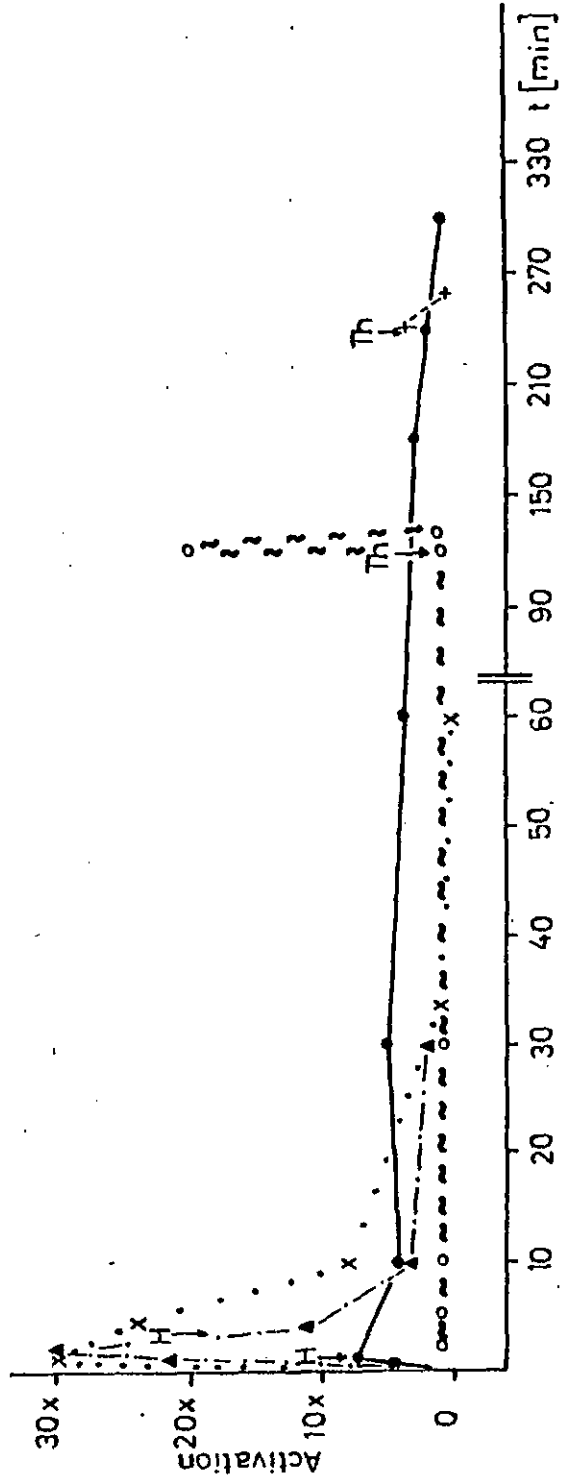
● ——— 200 µl de facteur VIII en présence de 10 µl d'une solution de thrombine (concentration finale 0,07 U/ml). L'activation est stoppée avec 0,14 U/ml d'hirudine avant que le maximum soit atteint (60 sec.)

+ - - - + le mélange ci-dessus est activé par une nouvelle addition de thrombine (240 min.)

▲ - · - · - le mélange est stoppé avec 0,14 U/ml d'hirudine après le maximum

○ ~ ~ ~ Facteur VIII en présence du mélange de thrombine-hirudine fraîchement préparé (2 min.), activé après 120 min. par une nouvelle addition de thrombine (0,7 U/ml)

x · · · · x Activation du facteur VIII par la thrombine (0,07 U/ml) en absence d'hirudine (Contrôle)



### 2.2.4.3. Détermination par la méthode en 2 temps

Dans la méthode en 2 temps, le temps de formation du facteur  $X_a$  (1er temps) est choisi de manière que le temps de coagulation après l'addition du plasma normal (2ème temps) atteigne son minimum, c'est-à-dire lorsque l'activité maximale du facteur  $X_a$  est atteinte. Si le 1er temps d'incubation est maintenu constant, on n'observe que l'inactivation du fragment VIII-C en présence de thrombine. L'activation du fragment VIII-C par la thrombine ne devient évidente que lorsque le 1er temps d'incubation est raccourci (Tableau 7).

Tableau 7. Activation du fragment VIII-C par la thrombine observée par la méthode en 2 temps. La valeur moyenne de 3 dilutions du fragment VIII-C 1 U/ml en présence de thrombine 0,07 U/ml représentée en fonction du 1er temps d'incubation est calculée sur une courbe de référence (sans thrombine). Le 1er temps d'incubation dure 10 minutes pour atteindre le palier dans la méthode normale sans thrombine.

1er temps d'incubation (min.)	2	4	6	10
Valeur moyenne de 3 dilutions	0,63	0,93	0,95	0,79
(U/ml)	$\pm 0,07$	$\pm 0,07$	$\pm 0,05$	$\pm 0,11$

En présence de thrombine, le temps de coagulation atteint plus rapidement le palier ( 1er temps d'incubation de 4 min.). Le même phénomène est aussi observé avec le facteur VIII partiellement purifié, ou dans le plasma.

### 2.2.5. Réduction du facteur VIII par le mercapto-2-éthanol

---

Dans cette expérience, la réduction du facteur VIII par le mercapto-2-éthanol est suivie en fonction du temps.

On fait réagir à 25°C 1 ml du facteur VIII (1,35 U VIII-C, 2,9 U VIII-AG) obtenu par filtration sur Biogel A-15m avec 10 µl d'une solution de mercapto-2-éthanol 5 M fraîchement préparée (concentration finale 50 mM). A différents intervalles, 0,075 ml du mélange sont prélevés et la réduction est stoppée par une quantité équimolaire d'iodoacétamide. Les activités VIII-C et VIII-AG y sont ensuite déterminées, en même temps l'échantillon (25 µl) est analysé sur gel de polyacrylamide 3% en présence de SDS et d'agarose.

Le facteur VIII montre une bande principale élargie et plusieurs bandes secondaires sur gel de polyacrylamide à 3% en présence de SDS et d'agarose. Après sa réduction totale, une seule bande est visible. Pendant la réduction progressive du facteur VIII, plusieurs bandes intermédiaires apparaissent et finalement se résolvent en une seule bande principale (Fig.21a). Tandis que l'activité coagulante reste inchangée ou légèrement diminuée pendant 2 h, l'activité antigénique augmente avec le temps (Fig.21b).

Par réduction douce, des sous-unités du facteur VIII de différents poids moléculaires peuvent être mises en évidence en fonction du temps. La réduction totale montre cependant une seule sous-unité principale (ou des sous-unités de poids moléculaires semblables).

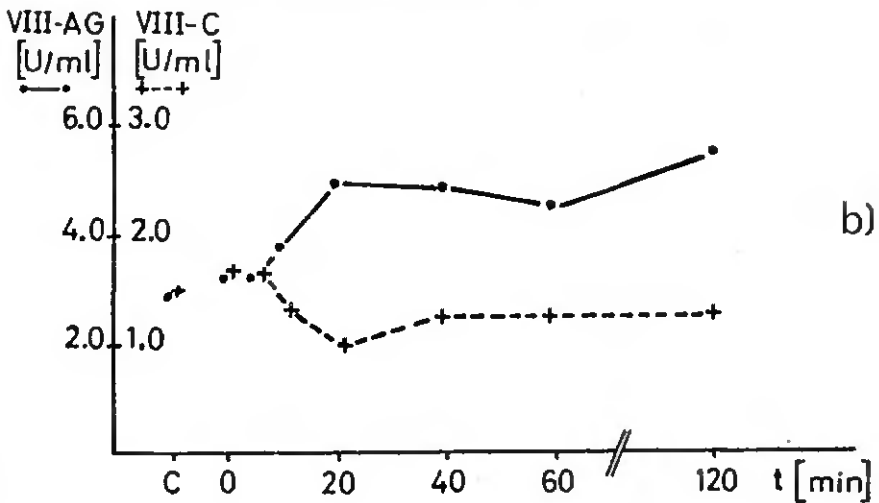
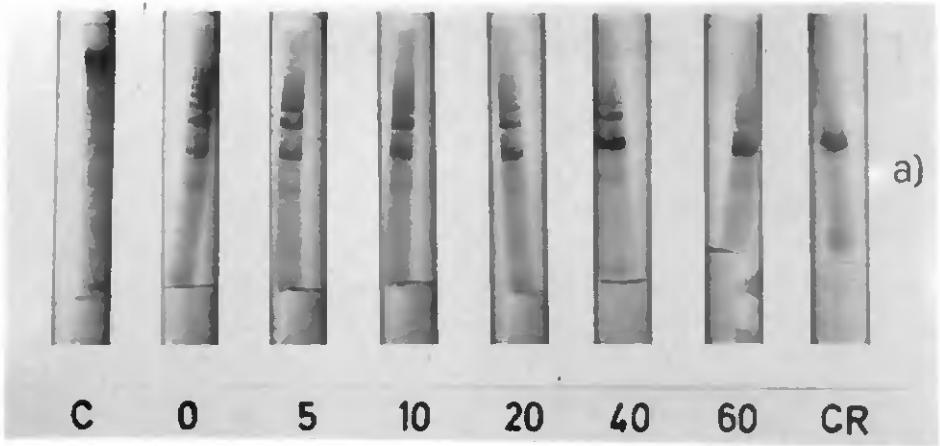


Fig.21. Réduction du facteur VIII par 50 mM de mercapto-2-éthanol. a) Electrophorèse sur gel de polyacrylamide 3% en présence de SDS et d'agarose. Le temps d'incubation est exprimé en minutes sous chaque gel. C = contrôle , CR = contrôle après réduction totale. b) Activités VIII-C et VIII-AG au cours de la réduction (en U/ml). L'activité VIII-C a été mesurée par la méthode en 2 temps.

## 2.2.6. Neutralisation du facteur VIII et du fragment VIII-C

### par différents anticorps

Les antigènes (facteur VIII, fragments VIII-AG et VIII-C) obtenus par la méthode décrite au § 2.2.1 ont servi à immuniser les lapins. L'immunisation plus lente avec le fragment VIII-C et la purification des immunoglobulines IgG sont décrites auparavant (§ 2.1.6.). Les mêmes anticorps sont employés pour les expériences ci-dessous.

#### 2.2.6.1. Neutralisation du facteur VIII

Dans cette expérience, le cryoprécipité est choisi comme source du facteur VIII pour 2 raisons principales:

- a) les activités VIII-C et VIII-AG y sont très stables, la perte de l'activité VIII-C dans le contrôle après 4 h d'incubation à 37°C est négligeable,
- b) l'activité VIII-C peut être aussi bien déterminée par la méthode en un temps que la méthode en 2 temps (absence partielle des facteurs dépendant de la vitamine K).

0,04 ml du cryoprécipité (2,8 U/ml VIII-C, 10 U/ml VIII-AG) sont ajoutés à une série de dilutions des anticorps (0,160 ml). Le mélange est incubé pendant 4 h à 37°C. Il est ensuite centrifugé pendant 10 minutes. L'activité VIII-C résiduelle est déterminée dans le surnageant par les 2 méthodes de mesure, et l'activité VIII-AG résiduelle par la méthode de Laurell. Elles sont représentées en % par rapport au contrôle (contenant le tampon de dilution au lieu de la dilution d'IgG) en fonction de la concentration des anticorps (Tableau 8). La figure 22 représente seulement les valeurs obtenues par la méthode en 2 temps.

- avec l'anti-VIII: les activités VIII-C et VIII-AG décroissent parallèlement à l'augmentation de la concentration d'anti-VIII (Tableau 8a et Fig.22a). Le taux de neutralisation de 50% est atteint à la dilution de 1:35 pour l'activité VIII-AG et de 1:15 pour l'activité VIII-C (Fig.22a). La neutralisation de VIII-AG est totale à la dilution de 1:10. La méthode en un temps donne des résultats similaires (Tableau 8a).
- avec l'anti-VIII-AG: la neutralisation à 50% de VIII-AG est obtenue à la dilution de 1:50 (Fig.22b). A la dilution de 1:20, la neutralisation de l'activité antigénique est pratiquement totale (97%) alors que la neutralisation de l'activité coagulante est très faible (0-10%). Après que toute l'activité VIII-AG a été neutralisée, il y a une abrupte diminution de l'activité VIII-C. Le phénomène est typique pour plusieurs anti-VIII-AG testés. Un précipité est aussi observé à la dilution de 1:10. Les résultats obtenus avec la méthode en un temps sont similaires (Tableau 8b).
- avec l'anti-VIII-C: les anticorps anti-VIII-C neutralisent 50% de l'activité coagulante à la dilution de 1:30 (Fig.22c). L'antisérum réagit faiblement avec le fragment VIII-AG (précipitation visible dans la technique de Laurell). Une absorption préalable de l'antisérum par ce dernier n'affecte pas sa capacité de neutralisation de l'activité coagulante.

#### 2.2.6.2. Neutralisation du fragment VIII-C

Le fragment VIII-C, obtenu après dissociation du facteur VIII en présence de  $\text{CaCl}_2$  0,25 M (§ 2.2.1.), contient 2,5 U/ml.

Pour éviter une perte importante de l'activité coagulante et afin que la réaction antigène-anticorps procède rapidement, l'incubation se fait pendant 30 minutes à 37°C. Ce changement mis à part, les conditions expérimentales sont décrites auparavant (§2.2.6.1.). L'activité coagulante résiduelle, déterminée par la méthode en un temps, est représentée en % par rapport au contrôle en fonction des anticorps (Fig.23).

- avec l'anti-VIII: l'activité VIII-C décroît en fonction de la concentration croissante de l'anti-VIII (Fig.23a). La neutralisation à 50% correspond à une dilution de 1:80 de l'anti-VIII.
- avec l'anti-VIII-AG: l'activité VIII-C n'est nullement affectée (Fig.23b). Cela suggère que le fragment VIII-C a des déterminants antigéniques non reconnus par l'anti-VIII-AG.
- avec l'anti-VIII-C: comme dans le cas de l'anti-VIII, l'activité VIII-C résiduelle diminue en fonction de la concentration croissante de l'anti-VIII-C (Fig.23c). La neutralisation à 50% correspond à la dilution de 1:160 de l'anti-VIII-C.

Tableau 8. Neutralisation du facteur VIII par différents anticorps. Les activités VIII-C et VIII-AG résiduelles en % en fonction de la dilution des anticorps.

Dilution	VIII-C résiduelle (%)		VIII-AG résiduelle (%)
	1 temps	2 temps	Laurell
a) anti-VIII			
1:10	33	38	0
1:15	58	57	13
1:20	72	59	21
1:30	-	70	45
1:40	85	76	60
1:80	-	84	81
1:160	93	94	86
b) anti-VIII-AG			
1:10	16	20	0
1:15	19	41	0
1:20	60	90	3
1:30	87	85	29
1:40	90	95	44
1:80	97	95	63
1:160	97	100	75
c) anti-VIII-C			
1:10	19	36	88
1:20	21	41	93
1:40	48	60	90
1:80	63	70	-
1:160	84	80	-

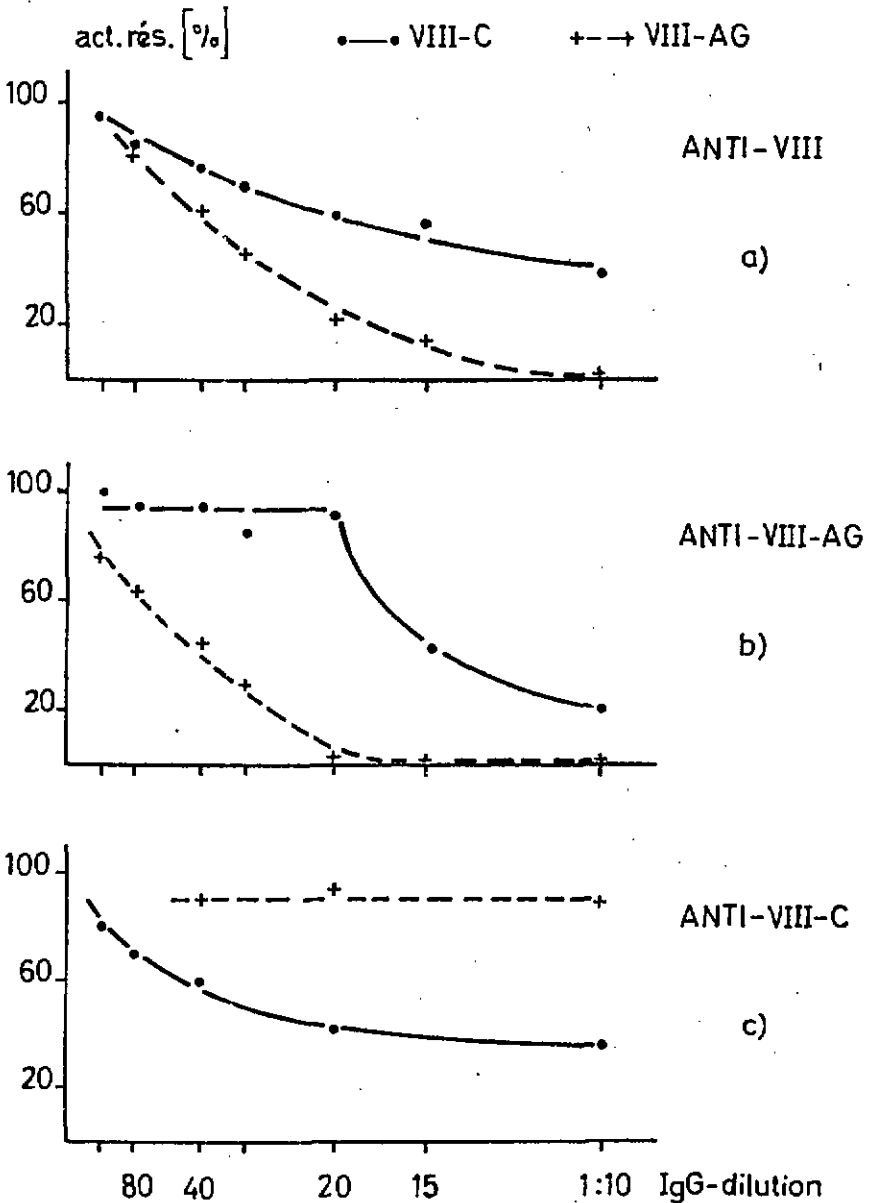


Fig.22. Neutralisation du facteur VIII (cryoprécipité) par différents anticorps. a) anti-VIII, b) anti-VIII-AG, c) anti-VIII-C. Activités VIII-C et VIII-AG résiduelles (en % des activités de contrôle) en fonction de la dilution de l'anticorps. L'activité VIII-C est déterminée par la méthode en 2 temps.

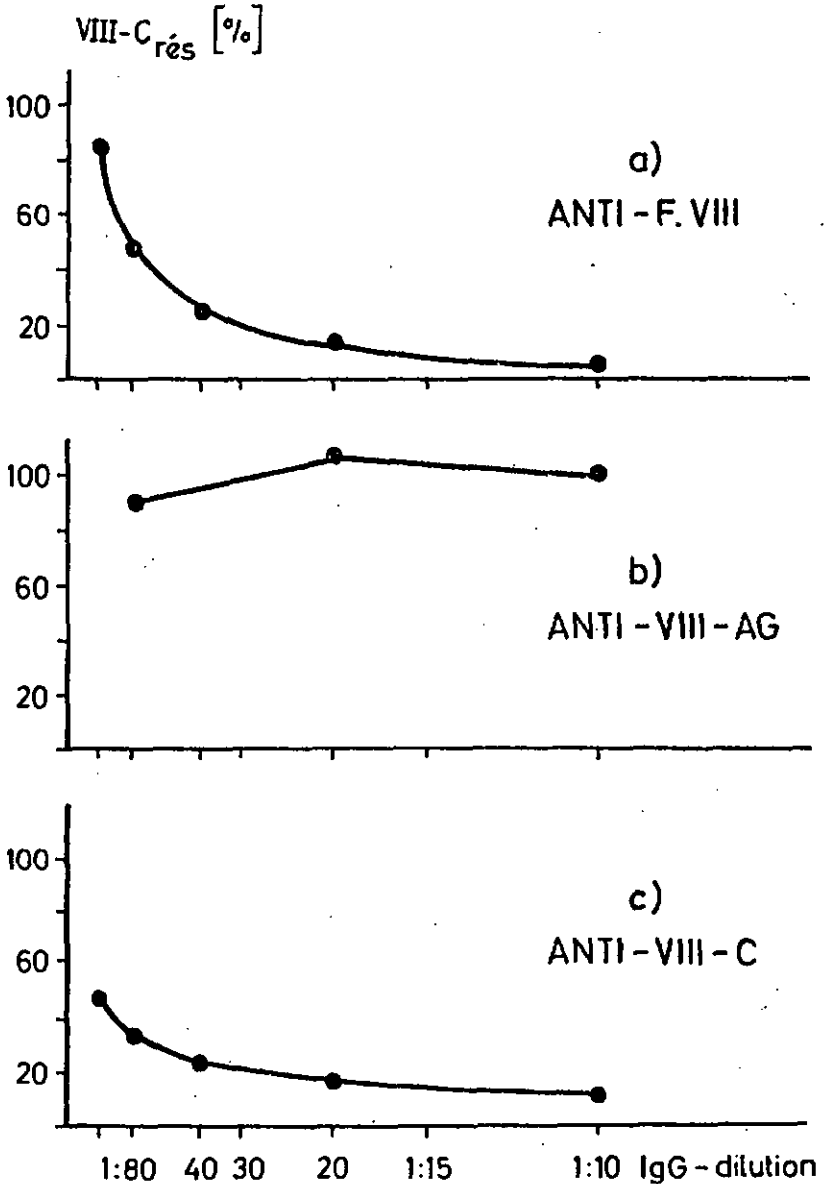


Fig.23. Neutralisation du fragment VIII-C par différents anticorps. a) anti-VIII, b) anti-VIII-AG, c) anti-VIII-C. Activité VIII-C résiduelle (en % de l'activité VIII-C du contrôle) en fonction de la dilution de l'anticorps. L'activité VIII-C est déterminée par la méthode en un temps.

### 2.2.7. Stabilité de l'activité VIII-C(Ag), de l'anti-VIII-C

et du complexe VIII-C(Ag)-anti-VIII-C en fonction

du pH et de la température

#### 2.2.7.1. Neutralisation de l'activité VIII-C(Ag) par l'anti-VIII-C

Pour éviter une précipitation non spécifique des protéines (par exemple du fibrinogène) lors du traitement, le facteur VIII utilisé dans cette expérience provient du pic du volume interstitiel obtenu par filtration sur gel comme sous § 2.2.1. et conservé pendant une semaine à 4°C. L'anti-VIII-C provenant d'un seul antisérum est préalablement adsorbé sur l'immuno-adsorbant VIII-AG-Sepharose 2BCL (2 fois) jusqu'à ce que la neutralisation de l'activité VIII-AG du plasma humain normal incubé avec une même quantité d'anti-VIII-C ne soit plus détectable par la technique de Laurell.

Le facteur VIII fraîchement préparé est d'abord incubé avec différentes concentrations de l'anti-VIII-C (217 U Bethesda/ml, ~10 U/mg) pour déterminer les conditions optimales de neutralisation. Le tableau 9 et la figure 24 représentent la neutralisation par l'anti-VIII-C de l'activité coagulante du facteur VIII fraîchement préparé par filtration sur gel du cryoprécipité.

Après conservation à 4°C pendant une semaine, l'activité coagulante biologique du facteur VIII a haissé de 6,9 U/ml à 0,9 U/ml, tandis que l'activité VIII-C(Ag) semble entièrement conservée c'est-à-dire que le facteur VIII dépourvu en grande partie de son activité VIII-C neutralise encore l'anti-VIII-C. L'avantage de cette conservation est que l'activité VIII-C provenant du facteur VIII âgé contribue peu à l'activité coagulante résiduelle provenant de l'étape indicatrice.

Tableau 9. Neutralisation de l'activité VIII-C(Ag) par l'anti-VIII-C. 0,1 ml de facteur VIII (6,9 U/ml VIII-C, 12,6 U/ml VIII-AG) est incubé avec 0,01 ml d'une série de dilutions de l'anti-VIII-C pendant 1 h, 37°C. L'activité VIII-C résiduelle est déterminée par la méthode en un temps.

Dilution d'IgG	VIII-C résiduelle	
	(U/ml)	(%)
Contrôle sans dilution	6,25	100
1:2	0,05	0,8
1:4	0,48	7,5
1:6	1,75	28
1:10	3,0	48
1:100	4,6	74
	6,25	100

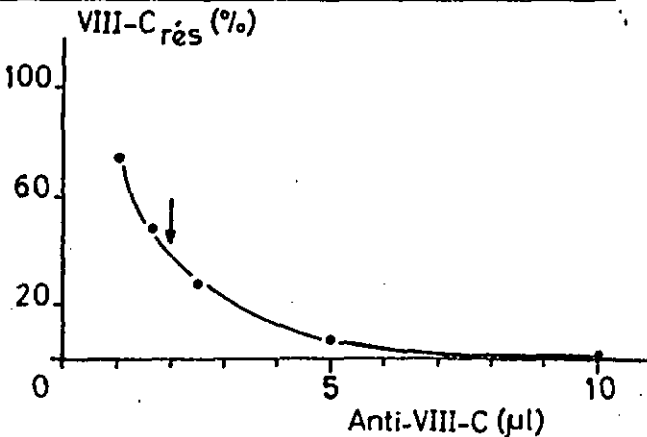


Fig.24. Neutralisation de l'activité VIII-C(Ag) par l'anti-VIII-C. L'activité VIII-C résiduelle en % par rapport au contrôle en fonction de la quantité d'anti-VIII-C ajoutée. La flèche indique la dilution de l'anti-VIII-C choisie pour les expériences de stabilité (1:50, 2 µl d'anti-VIII-C pour 100 µl de facteur VIII âgé).

### 2.2.7.2. Principe de l'étude de stabilité

On a besoin de 2 sources de facteur VIII. La première source (pratiquement dépourvue d'activité coagulante), provenant de la filtration sur gel et décrite au § 2.2.7.1., est destinée à bloquer l'anti-VIII-C. La seconde source est le cryoprécipité dans lequel l'activité coagulante du facteur VIII est très stable; il est utilisé comme indicateur dans la détermination biologique.

- 1) Stabilité de l'anti-VIII-C: l'anti-VIII-C possède la capacité d'inhiber l'activité VIII-C(Ag) du facteur VIII. Le but de l'expérience est d'observer si cette capacité est diminuée après un traitement physique de l'anti-VIII-C, tel que chauffage ou changement de pH. L'expérience nécessite donc 2 étapes.

Etape de traitement: dans la première étape, l'anti-VIII-C est soumis au changement de température ou de pH pendant 30 minutes.

Etape indicatrice (neutralisation de l'activité coagulante): après avoir été ramené aux conditions initiales (respectivement 20°C et pH 7,5), l'échantillon est incubé avec le cryoprécipité (source du facteur VIII) pendant 2 h à 37°C (2ème étape). L'activité VIII-C résiduelle du mélange est ensuite déterminée. Elle est inversement proportionnelle à la concentration de l'anti-VIII-C actif en solution. Le rapport des activités VIII-C dans le mélange et le contrôle (contenant le tampon de dilution) exprime quantitativement la stabilité de l'anti-VIII-C.

- 2) Stabilité de l'activité VIII-C(Ag) du facteur VIII: par définition, l'activité VIII-C(Ag) est l'activité qui neutralise l'anticorps dirigé contre l'activité coagulante sans que l'activité VIII-AG du facteur VIII soit modifiée (exemple de l'anticorps décrit au § 2.2.7.1.). Pour étudier la stabilité de l'activité VIII-C(Ag) on utilise 3 étapes.

Etape de traitement: dans cette étape l'échantillon contenant l'activité VIII-C(Ag) (ici le facteur VIII âgé § 2.2.7.1.) est soumis à des variations des conditions physiques (température ou pH).

Etape de blocage: l'échantillon est ensuite ramené aux conditions initiales. On y ajoute une quantité de l'anti-VIII-C en léger défaut, donc si l'activité VIII-C(Ag) n'était pas détruite pendant l'étape de traitement, elle bloquerait complètement l'anti-VIII-C ajouté. On incube le mélange pendant 2 h à 37°C.

Etape indicatrice (neutralisation de l'activité coagulante): à la fin de cette période, le cryoprécipité est ajouté et le mélange est incubé pendant 2 h à 37°C. L'activité VIII-C résiduelle du mélange est ensuite déterminée. Elle est proportionnelle à l'activité VIII-C(Ag) restant active en solution. Le rapport des activités dans le mélange et le contrôle (contenant le tampon de dilution) exprime la stabilité de l'activité VIII-C(Ag). Si l'activité VIII-C résiduelle du mélange est plus faible que celle du contrôle on peut dire que l'anti-VIII-C restant libre après l'étape de blocage neutralise l'activité VIII-C provenant du cryoprécipité et donc qu'il y a une destruction de l'activité VIII-C(Ag) pendant le traitement physique.

- 3) Stabilité du complexe VIII-C(Ag)-anti-VIII-C: dans le paragraphe précédent, on a vu que l'activité coagulante du facteur VIII est neutralisée par l'anticorps du lapin. L'activité antigénique du facteur VIII n'est pas altérée, un complexe formé entre la partie porteuse de l'activité VIII-C(Ag) et l'anti-VIII-C est inactif dans le système de détermination biologique. L'étude de la stabilité du complexe se fait en 3 étapes.

Formation de complexe: dans cette étape, on laisse réagir la partie porteuse de l'activité VIII-C(Ag) (ici le facteur VIII âgé) et l'anti-VIII-C en léger défaut pendant 2h à 37°C

(dans une expérience, cette étape a été prolongée pendant 20 h à 4°C sans affecter les résultats finaux). Le complexe n'est pas séparé du facteur VIII, la partie porteuse de l'activité VIII-C(Ag) reste en léger excès en solution. En plus, aucune précipitation n'est observée.

Etape de traitement: le complexe est soumis à des variations de température ou de pH pendant 30 minutes.

Etape indicatrice (neutralisation de l'activité coagulante): le complexe est ramené aux conditions initiales (20°C, pH 7,5). Le cryoprécipité est ajouté et on incube le mélange pendant 2 h à 37°C. L'activité VIII-C résiduelle est ensuite déterminée. Elle est proportionnelle à la concentration du complexe non dissocié. Le rapport des activités VIII-C dans le mélange et le contrôle exprime la stabilité du complexe. S'il y avait une neutralisation de l'activité coagulante dans le mélange, on dirait que le complexe a été dissocié par le traitement physique, que l'activité VIII-C(Ag) est détruite et que l'anti-VIII-C libéré inhibe ensuite l'activité coagulante indicatrice, ajoutée dans cette étape.

Le principe de l'étude de stabilité est indiqué schématiquement dans le tableau 10.

Tableau 10. Principe de l'étude de stabilité.

Anti-VIII-C	VIII-C(Ag)	Anti-VIII-C + VIII-C(Ag)
-----	-----	Complexe VIII-C(Ag)-anti-VIII-C
Traitement physique (température ou pH)		
-----	Anti-VIII-C (blocage)	-----
Facteur VIII du cryoprécipité (neutralisation de l'activité VIII-C indicatrice)		

### 2.2.7.3. Stabilité en fonction de la température

Les conditions expérimentales de l'étude de stabilité de ces composés en fonction de la température sont décrites dans le tableau 11.

Tableau 11. Stabilité de VIII-C(Ag), d'anti-VIII-C et du complexe en fonction de la température. TD = tampon de dilution, dans le contrôle de l'étape indicatrice l'échantillon est remplacé par une quantité équivalente de TD.

Anti-VIII-C	VIII-C(Ag)	VIII-C(Ag)-anti-VIII-C
2 µl anti-VIII-C + 200 µl TD -----	100 µl VIII + 100 µl TD -----	2 µl anti-VIII-C + 100 µl VIII Incuber 2 h , 37°C .
-----	+ 2 µl anti-VIII-C Incuber 2 h , 37°C	+ 100 µl TD
Etape indicatrice: 160 µl de l'échantillon traité 40 µl du cryoprécipité 2,8 U/ml VIII-C, 10 U/ml VIII-AG Incuber 2h , 37°C Mesurer l'activité coagulante résiduelle		

Les conditions sont choisies de telle manière que:

- l'activité VIII-C résiduelle soit de l'ordre de 30-40% du contrôle dans l'étape indicatrice en présence de l'anti-VIII-C
- l'activité VIII-C varie entre 30-100% en présence de l'anti-VIII-C et du facteur VIII âgé (source de l'activité VIII-C(Ag) )

c) les échantillons soient directement analysés sans manipulation supplémentaire (par exemple concentration).

L'activité VIII-C résiduelle déterminée par les deux méthodes de mesure (en % par rapport au contrôle) en fonction de la température est représentée dans le tableau 12.

Tableau 12. Stabilité de VIII-C(Ag), d'anti-VIII-C et du complexe en fonction de la température avec comparaison entre les 2 méthodes de mesure. L'expérience est répétée 2 fois et la valeur moyenne enregistrée. L'activité VIII-C résiduelle en % est calculée par rapport au contrôle (contenant seulement le tampon de dilution au lieu de l'échantillon). a) méthode en un temps, b) méthode en 2 temps.

a) Méthode en un temps

Température (°C)	VIII-C résiduelle (%)		
	Anti-VIII-C	VIII-C(Ag)	Complexe
20	33 <sub>-1</sub>	98 <sub>+2</sub>	105 <sub>+5</sub>
37	32 <sub>-2</sub>	93 <sub>+7</sub>	95 <sub>+5</sub>
45	29 <sub>-3</sub>	84 <sub>+6</sub>	83 <sub>-7</sub>
56	28 <sub>+1</sub>	29 <sub>+2</sub>	49 <sub>+5</sub>
66	22 <sub>-1</sub>	21 <sub>+5</sub>	31 <sub>+7</sub>

b) Méthode en 2 temps

Température (°C)	VIII-C résiduelle (%)		
	Anti-VIII-C	VIII-C(Ag)	Complexe
20	43 <sub>-7</sub>	94 <sub>+1</sub>	89 <sub>+9</sub>
37	45 <sub>+2</sub>	97 <sub>+3</sub>	95 <sub>+5</sub>
45	42	81 <sub>+4</sub>	93 <sub>-7</sub>
56	43 <sub>+1</sub>	41 <sub>+3</sub>	65 <sub>+3</sub>
66	43 <sub>+5</sub>	37 <sub>+1</sub>	58 <sub>+3</sub>

La méthode en 2 temps est moins sensible que la méthode en un temps pour de petites différences, malgré cela les résultats sont semblables. Ces résultats démontrent que le même effet est mesuré par les 2 méthodes. La figure 25 donne seulement les résultats obtenus par la méthode en 2 temps.

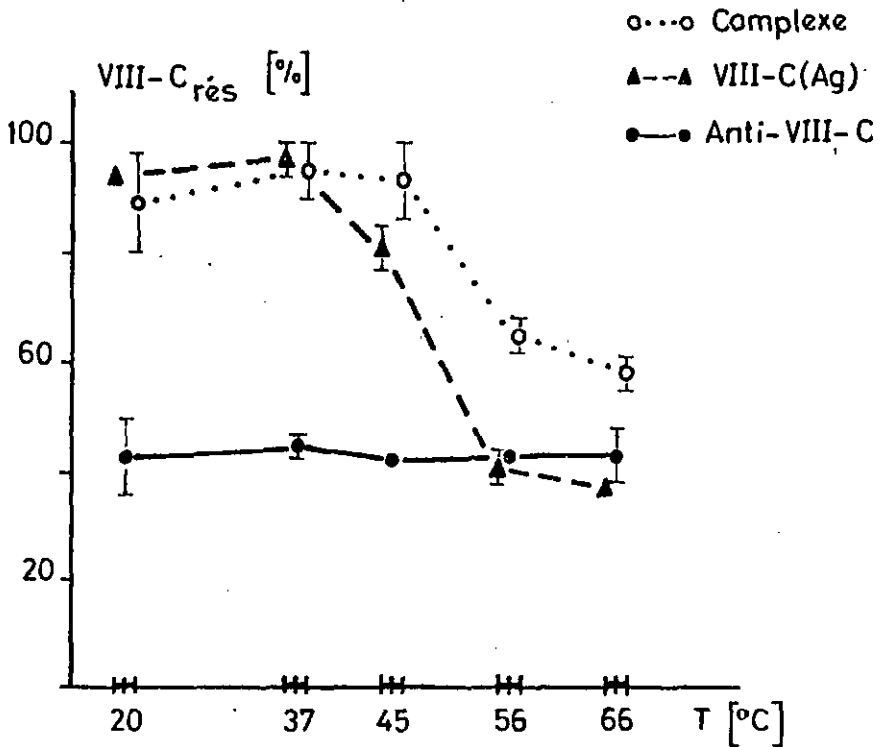


Fig.25. Stabilité de l'anti-VIII-C, VIII-C(Ag) et du complexe en fonction de la température. Les barres verticales représentent les valeurs extrêmes obtenues de 2 expériences. L'activité VIII-C est déterminée par la méthode en 2 temps.

Anti-VIII-C: La stabilité de l'anti-VIII-C est étudiée à différentes températures (20,37,45,56,66°C). La neutralisation de l'activité coagulante de l'étape indicatrice par l'anti-VIII-C traité à différentes températures reste à peu près constante (activités VIII-C résiduelles 22-33% et 43-45% mesurées respectivement par les 2 méthodes en 1 et 2 temps). Cela montre que l'anti-VIII-C est très stable jusqu'à 66°C pendant 30 minutes. La différence des résultats obtenus dans les 2 méthodes provient peut-être du principe des méthodes. Dans la méthode en un temps, l'anti-VIII-C devient plus actif lorsque la température augmente. Le chauffage provoque une légère évaporation inévitable de l'échantillon. Donc la concentration de l'anti-VIII-C augmente légèrement lorsque l'échantillon est traité à des températures croissantes, ce qui explique une augmentation de la capacité inhibitrice de l'anti-VIII-C. Par contre, cet effet n'est pas détectable par la méthode en 2 temps, qui se révèle alors moins sensible.

VIII-C(Ag): Au fur et à mesure que la température augmente, l'activité VIII-C(Ag) devient moins stable. Tandis qu'elle est légèrement diminuée à 45°C (activités VIII-C résiduelles d'environ 80% mesurées dans les 2 méthodes), elle est complètement détruite à 56°C pendant 30 minutes (activités VIII-C résiduelles 29% et 41% mesurées respectivement par les méthodes en 1 et 2 temps). A 56°C, elle perd complètement sa capacité de blocage envers l'anti-VIII-C, qui est libre et neutralise l'activité VIII-C ajoutée dans l'étape indicatrice. On retrouve dans l'échantillon tout l'anti-VIII-C libre ajouté dans l'étape de blocage.

Complexe VIII-C(Ag)-anti-VIII-C: Le complexe est stable à 45°C. Par contre il est instable aux températures plus élevées. A 56°C, il est partiellement détruit (activités VIII-C résiduelles 49% et 65% mesurées respectivement par les méthodes en 1 et 2 temps). Comme l'anti-VIII-C est très stable à cette

température et que l'activité VIII-C(Ag) est complètement détruite (voir plus haut), la destruction partielle du complexe est expliquée par la destruction de l'activité VIII-C(Ag) avec libération de l'anti-VIII-C et neutralisation de l'activité VIII-C ajoutée dans l'étape indicatrice. A 66°C, la dissociation du complexe par destruction de l'activité VIII-C(Ag) est encore plus prononcée. Toutefois le complexe montre une plus grande stabilité que la partie porteuse de l'activité VIII-C(Ag) seule. Cette activité VIII-C(Ag) est probablement mieux protégée de la chaleur par formation de complexe avec l'anti-VIII-C.

#### 2.2.7.4. Stabilité en fonction du pH

La stabilité de VIII-C(Ag), d'anti-VIII-C et du complexe en fonction du pH est étudiée de la même manière que sous § 2.2.7.3 en maintenant la température constante à 20°C. Les conditions expérimentales sont décrites dans le tableau 13.

L'activité VIII-C résiduelle (en % par rapport au contrôle) en fonction du pH, déterminée par les 2 méthodes, est représentée dans le tableau 14. Les résultats obtenus par la méthode en 2 temps sont représentés dans la figure 26.

En raison des petites quantités utilisées, la mesure du pH de la solution est presque impossible. Pour surmonter cette difficulté, l'ajustement du pH de l'échantillon est simulé par une courbe de titration de la solution contenant l'échantillon (pH au départ 7,5). Pour augmenter la capacité de tampon de cette solution, un tampon de glycine 0,12 M - acétate de sodium 0,12 M est ajouté et la solution est titrée avec HCl 0,1 M ou NaOH 0,1 M dans le domaine de pH 2-10. En se basant sur cette courbe de titration une quantité de HCl ou NaOH calculée est ajoutée à l'échantillon pour obtenir le pH désiré.

Cette technique a des avantages tels que: absence de contamination de la solution et de perte de solution, obtention facile et rapide du pH désiré et travail possible avec des petites quantités.

Tableau 13. Stabilité de VIII-C(Ag), d'anti-VIII-C et du complexe en fonction du pH. T1 = tampon dans lequel le facteur VIII est conservé, TGA = glycine 0,12 M - CH<sub>3</sub>COONa 0,12 M contenant 6 mg/ml BSA pour augmenter la capacité de tampon de l'échantillon dans le domaine de pH 2-10 , TD = tampon de dilution.

Anti-VIII-C	VIII-C(Ag)	VIII-C(Ag)-anti-VIII-C
2 µl anti-VIII-C + 100 µl T1 + 20 µl TGA -----	100 µl VIII + 20 µl TGA -----	2 µl anti-VIII-C + 100 µl VIII + 20 µl TGA Incuber 2 h , 37°C
<p>Traiter les échantillons pendant 30 minutes aux différents pH par l'adjonction de HCl 0,1 M ou NaOH 0,1 M à l'aide d'une courbe de titration. Ramener au pH initial (7,5) par l'addition d'une quantité équivalente de NaOH 0,1 M ou HCl 0,1 M et ajuster le volume à 200 µl avec TD.</p>		
-----	+ 2 µl anti-VIII-C Incuber 2 h , 37°C	-----
<p>Etape indicatrice: 160 µl de l'échantillon traité 40 µl du cryoprécipité 2,8 U/ml VIII-C , 10 U/ml VIII-AG Incuber 2 h , 37°C Mesurer l'activité coagulante résiduelle</p>		

Tableau 14. Stabilité de VIII-C(Ag), d'anti-VIII-C et du complexe en fonction du pH. L'activité VIII-C est déterminée avec les 2 méthodes de mesure, nd = non déterminé. L'activité VIII-C résiduelle en % est calculée par rapport au contrôle (contenant le tampon de dilution au lieu de l'échantillon).  
a) méthode en un temps , b) méthode en 2 temps.

a) Méthode en un temps

pH	VIII-C résiduelle (%)		
	Anti-VIII-C	VIII-C(Ag)	Complexe
2,5	nd	33	45
3,5	nd	51	52
5,0	nd	77	90
7,5	nd	97	96
9,0	nd	97	99
10,0	nd	82	106

b) Méthode en 2 temps

pH	VIII-C résiduelle (%)		
	Anti-VIII-C	VIII-C(Ag)	Complexe
2,5	49 $\pm$ 4	46 $\pm$ 3	53 $\pm$ 3
3,5	46 $\pm$ 2	66 $\pm$ 6	76 $\pm$ 1
5,0	39	85	93 $\pm$ 3
7,5	43 $\pm$ 2	89 $\pm$ 6	93 $\pm$ 3
9,0	44	87 $\pm$ 3	78 $\pm$ 2
10,0	43 $\pm$ 2	84	78 $\pm$ 2

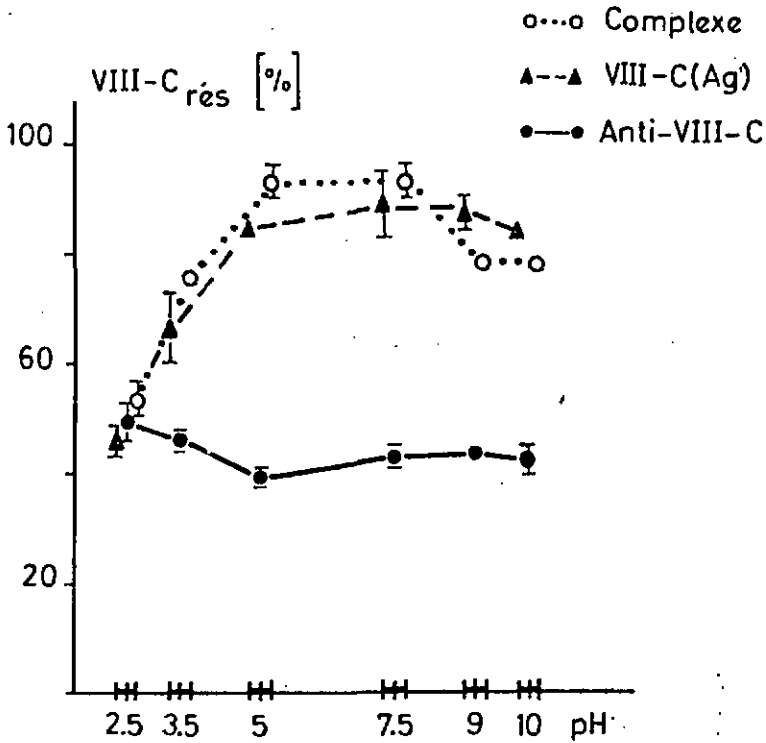


Fig.26. Stabilité de VIII-C(Ag), d'anti-VIII-C et du complexe en fonction du pH. Les barres verticales représentent les valeurs extrêmes obtenues de 2 expériences. L'activité VIII-C est déterminée par la méthode en 2 temps.

Anti-VIII-C: La stabilité de l'anti-VIII-C est étudiée aux différentes valeurs de pH (2,5 , 3,5 , 5 , 7,5 , 9 , 10). La neutralisation de l'activité VIII-C ajoutée dans l'étape indicatrice est à peu près constante (activités VIII-C résiduelles 39-49% mesurées par la méthode en 2 temps (Tableau 14b) ).

Ces résultats montrent que l'anti-VIII-C est très stable dans le domaine de pH étudié (2,5 - 10). Dans une expérience non rapportée, l'anti-VIII-C est resté stable au pH 2,5 pendant au moins 24 h.

VIII-C(Ag): La courbe de stabilité montre que l'activité VIII-C(Ag) est stable dans le domaine de pH 5-10. Au pH 3,5, cette activité est fortement diminuée. Seule une partie de l'anti-VIII-C ajouté est bloquée et la partie libre peut neutraliser l'activité VIII-C ajoutée dans l'étape indicatrice (activités VIII-C résiduelles 51% et 66% mesurées respectivement par les méthodes en 1 et 2 temps). Au pH 2,5 pendant 30 minutes, l'activité VIII-C(Ag) est complètement détruite. L'anti-VIII-C ajouté lors de la 2ème étape afin de bloquer l'activité VIII-C(Ag) reste entièrement libre. Il neutralise l'activité VIII-C ajoutée lors de l'étape indicatrice dans les mêmes proportions que lors de l'étude de stabilité de l'anti-VIII-C (activités VIII-C résiduelles 49% dans le cas d'anti-VIII-C et 46% lorsque la partie porteuse de l'activité VIII-C(Ag) est traitée à pH 2,5).

Complexe VIII-C(Ag)-anti-VIII-C: Les résultats de stabilité montrent que le complexe est stable dans le domaine de pH 5-10. Au pH 3,5 il est partiellement détruit (activités VIII-C résiduelles 52% et 76% déterminées respectivement par les méthodes en 1 et 2 temps). Au pH 2,5 il est presque totalement détruit (activités VIII-C résiduelles 45% et 53% déterminées respectivement par les méthodes en 1 et 2 temps). Comme l'anti-VIII-C est stable à ce pH, et que l'activité VIII-C(Ag) est entièrement détruite, la dissociation du complexe est certainement causée par la destruction de l'activité VIII-C(Ag), et par la libération de l'anti-VIII-C qui neutralise l'activité VIII-C ajoutée dans l'étape indicatrice. Comme dans le cas de l'étude de stabilité du complexe en fonction de la température, la protection de l'activité VIII-C(Ag) par formation de complexe avec l'anti-VIII-C est aussi observée.

## 2.2.8. Adsorption du facteur VIII en système solide-liquide

En système liquide-liquide (§ 2.2.6.1.) on a montré que les anticorps anti-VIII-AG et anti-VIII-C peuvent créer une diminution de l'activité coagulante du facteur VIII et que l'anti-VIII-C peut neutraliser l'activité coagulante du fragment VIII-C (§2.2.6.2.). Fixés sur un support solide tel que l'agarose peuvent-ils réagir de la même manière qu'en solution?

### 2.2.8.1. Préparation de l'anti-VIII-C-Sepharose 2BCL

L'antisérum provient du lapin immunisé avec le fragment VIII-C. L'isolement des IgG est fait d'après § 2.1.6. Les immunoglobulines neutralisant encore l'activité VIII-AG du facteur VIII sont adsorbées sur l'immunoabsorbant VIII-AG-Sepharose 2BCL. A la fin de l'opération, l'activité VIII-AG du plasma humain ne devrait plus être neutralisée du tout (Tableau 15). Cette adsorption s'effectue en faisant circuler l'anti-VIII-C dans une colonne de VIII-AG-Sepharose 2BCL en circuit fermé à l'aide d'une pompe péristaltique pendant 24 h à 4°C.

La capacité inhibitrice de l'anti-VIII-C environ de 29 U Bethesda/mg n'est nullement affectée par cette adsorption, dont le but est d'éliminer les traces de l'anti-VIII-AG.

Les fractions anti-VIII-C partiellement et hautement purifiées sont couplées au CNBr-Sepharose 2BCL à raison de 5 mg/ml de gel (~ 140 U Bethesda par ml de gel) d'après la méthode décrite au § 2.1.5. Les IgG provenant du sérum normal du lapin sont couplées de la même manière pour les essais à blanc.

Tableau 15. Adsorption de l'anti-VIII-C sur l'immunoabsorbant VIII-AG-Sepharose 2BCL. Après l'adsorption, 1 volume de plasma humain normal est incubé avec 1 volume d'anti-VIII-C à 37°C pendant 2 h ensuite à 4°C pendant 24 h. L'activité VIII-AG résiduelle déterminée par les techniques de Laurell et d'IRMA est exprimée en % par rapport au contrôle (contenant le tampon de dilution au lieu de l'anti-VIII-C).

Anti-VIII-C adsorbé	C <sub>p</sub> protéine (mg/ml)	VIII-AG résiduelle			
		IRMA (U/ml) (%)		Laurell (U/ml) (%)	
a) partiellement purifié	5,8	0,87	81	0,25	50
b) hautement purifié	16,9	0,95	95	0,54	93

2.2.8.2. Adsorption du plasma humain normal  
sur l'anti-VIII-C-Sepharose 2BCL

On a montré que l'anti-VIII-C en solution neutralise aussi bien l'activité coagulante du facteur VIII (§ 2.2.6.1.) que le fragment VIII-C (§ 2.2.6.2.). En outre, l'étude de stabilité montre qu'il est très stable en fonction de la température (jusqu'à 66°C pendant 30 minutes) et du pH (2,5 - 10) (§ 2.2.7.). La capacité inhibitrice de l'anti-VIII-C est maintenant examinée lorsqu'il est immobilisé sur un support solide.

L'anti-VIII-C-Sepharose 2BCL en quantité variable est lavé avec 4 x 2 ml de tampon TRIS-NaCl pH 7,5 par centrifugation et re-suspension avant l'usage. Puis 0,5 ml d'un pool de plasma humain normal sont ajoutés et le mélange est maintenu sous agitation magnétique pendant 3 h à 20°C. Il est ensuite centrifugé et les activités VIII-C et VIII-AG résiduelles sont déterminées dans le surnageant. Elles sont représentées en fonction de la quantité d'immunoabsorbant dans le tableau 16 et la Fig.27.

Tableau 16. Adsorption du facteur VIII du plasma humain sur l'immunoabsorbant anti-VIII-C-Sepharose 2BCL. Les activités VIII-C et VIII-AG en % par rapport au contrôle (contenant les IgG immobilisées provenant du sérum normal) sont représentées en fonction de la quantité d'immunoabsorbant en  $\mu\text{l}$ . a) sur l'anti-VIII-C partiellement purifié, b) sur l'anti-VIII-C hautement purifié.

Anti-VIII-C immobilisé ( $\mu\text{l}$ )		VIII-C résiduelle (U/ml) (%)		VIII-AG résiduelle IRMA (%) Laurell	
a)	50	0,6	69 $\pm$ 6	69 $\pm$ 3	71 $\pm$ 1
	100	0,3	39 $\pm$ 6	49 $\pm$ 9	50 $\pm$ 6
	200	0,2	31 $\pm$ 4	36 $\pm$ 3	28 $\pm$ 3
	300	0,15	28 $\pm$ 1	30 $\pm$ 2	24 $\pm$ 4
b)	50	0,51	74	100	89
	100	0,48	75	84	93
	200	0,39	60	79	94
	300	0,42	54	81	89

L'activité VIII-C résiduelle diminue légèrement en fonction de la quantité d'anti-VIII-C immobilisé ajoutée (Fig.27b). A 50  $\mu\text{l}$  d'anti-VIII-C elle est de 74% et à 300  $\mu\text{l}$  d'anti-VIII-C de 54%. Tandis que l'activité VIII-AG résiduelle déterminée par la méthode de Laurell (Tableau 16b) ne dépend pas de la quantité d'anti-VIII-C immobilisé (89-94%), elle est légèrement diminuée à partir de 100  $\mu\text{l}$  d'anti-VIII-C (84%) lorsqu'elle est déterminée par la méthode d'IRMA.

L'activité VIII-C du plasma diminue plus que l'activité VIII-AG en fonction de la quantité d'anti-VIII-C immobilisé. A 300  $\mu\text{l}$  les activités VIII-C et VIII-AG résiduelles sont respectivement de 54% et 81%. L'anti-VIII-C immobilisé peut donc encore réagir

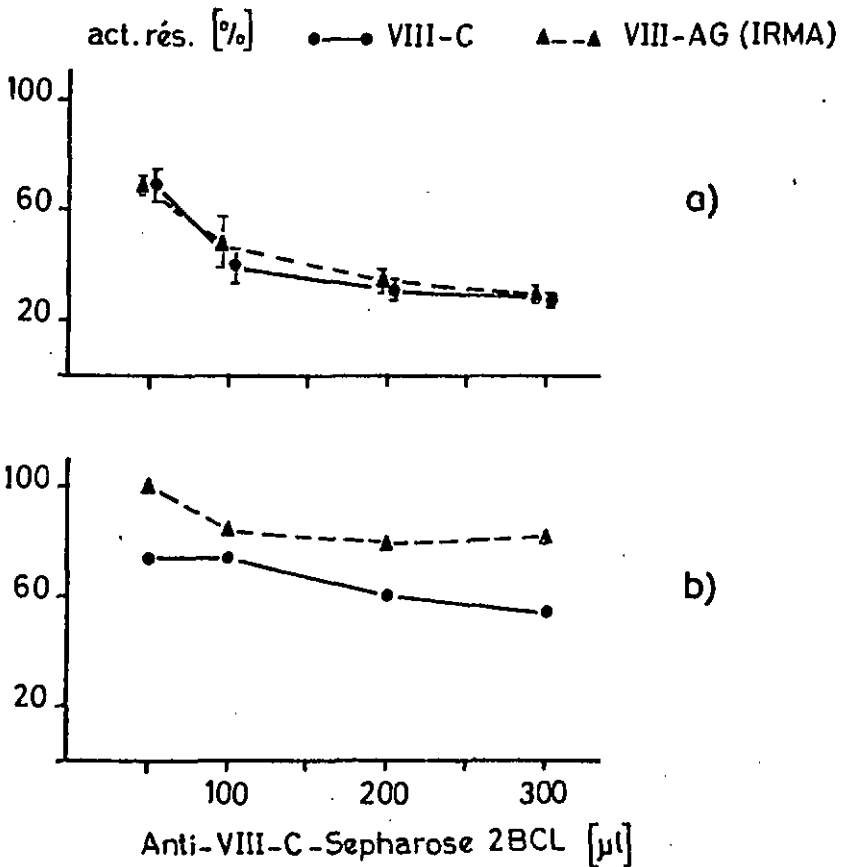


Fig.27. Adsorption du facteur VIII (plasma humain normal) sur l'anti-VIII-C immobilisé. Les activités VIII-C et VIII-AG résiduelles en % par rapport au contrôle (IgG normal-Sepharose 2BCL) sont représentées en fonction de la quantité d'anti-VIII-C immobilisé.

a) anti-VIII-C immobilisé partiellement purifié

b) anti-VIII-C immobilisé hautement purifié

avec le fragment VIII-C en solution. Comme la disparition de ces 2 activités n'est pas égale, le fragment VIII-C devrait être spontanément séparé du fragment VIII-AG et ces 2 fragments possèdent des déterminants antigéniques différents (voir aussi § 2.2.6.2.). La séparation du fragment VIII-C du fragment VIII-AG pourrait se faire soit avant la neutralisation soit après la fixation du fragment VIII-C à l'anti-VIII-C immobilisé.

Cependant la capacité inhibitrice de l'anti-VIII-C immobilisé est fortement diminuée si l'on compare la quantité de fragment VIII-C extraite à celle de l'anti-VIII-C immobilisé (après immobilisation, elle est de l'ordre de 3-6 U Bethesda/ml de gel, tandis qu'un calcul théorique prévoit environ 140 U/ml de gel).

L'anti-VIII-C partiellement purifié contient encore une quantité très faible d'anti-VIII-AG (Tableau 15). Les activités VIII-C et VIII-AG résiduelles varient parallèlement en fonction de la quantité d'anti-VIII-C immobilisé (Fig.27a et tableau 16a). Le rapport des activités VIII-C/VIII-AG en solution reste égal à 1, ce qui montre que les fragments VIII-C et VIII-AG sont adsorbés à activités égales. Cette adsorption ne provient pas d'une fixation du facteur VIII au gel par l'intermédiaire du fragment VIII-C, car l'activité VIII-AG adsorbée n'est éluable qu'avec le tampon de dissociation du complexe antigène-anticorps glycine-NaCl pH 2,5, mais pas avec le tampon contenant  $\text{CaCl}_2$  0,25 M. Cela prouve plutôt que le complexe VIII-AG - anti-VIII-AG-Sepharose était formé.

### 2.2.8.3. Adsorption du plasma humain normal sur l'anti-VIII-AG-Sepharose 2BCL

On a observé que l'anti-VIII-C immobilisé neutralise peu l'activité coagulante du facteur VIII dans le plasma (§ 2.2.8.2.).

L'anti-VIII-AG en solution crée une diminution de l'activité coagulante du facteur VIII lorsqu'il se trouve en excès en solution (après neutralisation totale de l'activité VIII-AG) (§ 2.2.6.1.) mais il ne peut pas neutraliser le fragment VIII-C (§ 2.2.6.2.). L'adsorption du facteur VIII sur l'anti-VIII-AG immobilisé permettrait une comparaison de sa réactivité à celle de l'anti-VIII-C immobilisé.

L'anti-VIII-AG est fixé de la même manière sur le CNBr-Sepharose 2BCL (§ 2.2.8.1.) à raison de 2,8 mg/ml de gel. Les conditions expérimentales sont exactement les mêmes que celles décrites sous § 2.2.8.2. Le plasma est traité pendant 3 h à 20°C avec différentes quantités d'anti-VIII-AG immobilisé. Le mélange est ensuite centrifugé et les activités VIII-AG et VIII-C résiduelles sont déterminées dans le surnageant en fonction de la quantité d'anti-VIII-AG immobilisé (Tableau 17).

Tableau 17. Adsorption du facteur VIII du plasma humain sur l'immunoadsorbant anti-VIII-AG-Sepharose 2BCL. Les activités VIII-C et VIII-AG résiduelles en % par rapport au contrôle sont représentées en fonction de la quantité d'immunoadsorbant en µl. a) avec 0,5 ml de plasma humain, b) avec 1,5 ml de plasma humain.

	Anti-VIII-AG immobilisé (µl)	VIII-C résiduelle		VIII-AG résiduelle	
		(U/ml)	(%)	IRMA (%)	Laurell
a)	50	0,22	26	21	17
	100	0,03	4	2	-
	200	< 0,01	0	0	-
	300	< 0,01	0	0	-
b)	50	0,43	47	59	51
	100	0,31	36	37	32
	200	0,10	11	7,3	-
	300	0,09	10	6,7	-

Lorsque 0,5 ml de plasma sont utilisés (Tableau 17a), presque toute l'activité de VIII-C et VIII-AG est extraite de la solution par 100  $\mu$ l d'anti-VIII-AG immobilisé (respectivement 96% et 98%). Les activités VIII-C et VIII-AG résiduelles sont inversement proportionnelles à la quantité de l'anti-VIII-AG immobilisé (Tableau 17b), le rapport de ces activités est égal à environ 1, ce qui montre que l'anti-VIII-AG-Sepharose les extrait parallèlement. La séparation du fragment VIII-C du fragment VIII-AG n'est pas évidente.

## 2.2.9. Recherche du CRM dans les plasmas d'hémophiles

### 2.2.9.1. Description du test de blocage

L'anti-VIII-C contient 217 U Bethesda/ml et ne neutralise plus l'activité VIII-AG. Le principe du test de blocage est similaire à celui décrit au § 2.2.7.2.

Etape de blocage (1ère étape): 0,1 ml d'échantillon (plasma normal ou d'hémophile ou tampon) est incubé avec 0,05 ml d'anti-VIII-C dilué 1:100 pendant 30 minutes à 37°C. Dans le contrôle le plasma humain normal est incubé exactement de la même manière avec le tampon de dilution au lieu de l'anti-VIII-C dilué. L'anti-VIII-C est dilué de telle manière qu'il neutralise 85-90% de l'activité VIII-C ajoutée dans la 2ème étape avec le tampon seul (Tableau 18).

Etape indicatrice (inactivation de l'activité VIII-C):

L'activité VIII-C est fournie par un pool de 11 plasmas humains normaux conservés à -170°C. Après la première période d'incubation, 0,05 ml du plasma humain normal sont ajoutés au mélange et le tout est incubé pour une durée additionnelle de 1 h à 37°C. Les échantillons sont dilués 1:5 pour la détermination de l'activité VIII-C avec la méthode en un temps. L'activité VIII-C résiduelle dans le contrôle représente par définition 100%.

Tableau 18. Choix de la dilution de l'anti-VIII-C. NHP=plasma humain normal, VIII-C<sub>C</sub> = activité VIII-C dans le contrôle (0,1 ml NHP + 0,05 ml tampon de dilution; 37°C, 30 min; + 0,05 ml du pool; 1 h , 37°C).

Dilution de l'anti-VIII-C	échantillon	VIII-C rés. (U/ml)	Rapport VIII-C rés. sur VIII-C <sub>C</sub> (%)
1:25	NHP non dilué	0,015	3,3
1:25	NHP 1:2	0,015	3,3
1:25	tampon	0,00	0
1:50	NHP non dilué	0,11	24
1:50	NHP 1:2	0,066	14,5
1:50	tampon	0,02	4,4
1:100	NHP non dilué	0,17	38
1:100	tampon	0,066	14,7
Contrôle	NHP non dilué	0,45	100

#### 2.2.9.2. Blocage de l'anti-VIII-C par les plasmas d'hémophiles

Dans le contrôle l'anticorps est remplacé par le tampon de dilution. Le rapport de l'activité VIII-C résiduelle sur celle du contrôle exprime le degré de blocage de l'échantillon (Tableau 19).

4 plasmas d'hémophiles possédant  $\leq 0,01$  U/ml d'activité VIII-C sont examinés avec le test de blocage. Le test est répété 2 fois et donne des résultats semblables.

Dans le plasma M.H. nous avons trouvé un degré de blocage (20,2%) assez élevé par rapport à celui du tampon (11,5%). Dans les 3 autres plasmas par contre, il est de l'ordre de celui du tampon. Le plasma M.H. pourrait contenir une certaine quantité VIII-C(Ag) (ou CRM) qui bloquerait partiellement l'anti-VIII-C.

Tableau 19. Test de blocage de quelques plasmas d'hémophiles.

Echantillon	VIII-C rés / VIII-C <sub>C</sub> (%)
NHP	47,6 ± 3,6
M.H.	20,2 ± 1,2
I.D.	14,3 ± 2,4
S.C.	13,1 ± 0,6
R.F.	9,2 ± 0,8
tampon	11,5 ± 0,4

### 3. DISCUSSION

Par filtration sur gel, le facteur VIII est élué dans le volume interstitiel de la colonne (§ 2.2.1.). Le pic de l'activité VIII-AG correspond parfaitement à celui de l'activité VIII-C (Fig.12). Le rapport des activités VIII-C/VIII-AG reste plus ou moins constant dans les fractions situées autour du pic des activités, alors qu'il diminue dans la traînée. L'activité VIII-AG est aussi présente dans les fractions tardives contenant le fibrinogène. Ce phénomène est plus accentué lorsque le concentré du facteur VIII est utilisé. Le cryoprécipité présente un pic des activités plus symétrique, tandis que dans le concentré une longue traînée du pic est observée. Dans le cryoprécipité le facteur VIII est plus homogène. L'apparition de plusieurs formes moléculaires de l'antigène du facteur VIII a été observée durant le procédé de purification (32).

Afin d'éliminer l'antigène du facteur VIII de faible poids moléculaire on réunit seulement les fractions contenant les activités VIII-C et VIII-AG dans un rapport VIII-C/VIII-AG similaire, c'est-à-dire les fractions situées autour du pic des activités. Lors de la filtration sur gel en présence de  $\text{CaCl}_2$  0,25 M, la dissociation du facteur VIII est mise en évidence par la séparation du fragment VIII-C du fragment VIII-AG, ce dernier est élué avec le volume interstitiel de la colonne, tandis que le fragment VIII-C est élué plus tardivement (Fig.13). Cependant cette technique de séparation n'est pas parfaite. La préparation du fragment VIII-AG est contaminée par le fragment VIII-C, et inversement. La dissociation du facteur VIII est moins bonne en présence de NaCl 1M (Fig.14). Elle dépend d'une part de la concentration du facteur VIII en solution (plus la solution est diluée en facteur VIII, meilleure est la séparation (80)), et d'autre part de la concentration de NaCl (la dissociation est meilleure aux concentrations élevées de NaCl).

En présence de  $\text{CaCl}_2$  0,25 M , le facteur VIII ne présente aucune perte d'activité VIII-C avec le temps. Pourtant l'activité coagulante du fragment VIII-C, fraîchement obtenu par filtration sur gel, décroît sensiblement en présence de  $\text{CaCl}_2$  0,25 M . Cette perte d'activité ne peut être évitée ni par l'élimination du  $\text{CaCl}_2$  par dialyse, ni par des inhibiteurs de protéases tels que PMSF 1 mM et DFP 1 mM.

Récemment, Tuddenham et al (91) ont décrit la séparation de deux sortes de fragments VIII-C par chromatographie d'affinité: le fragment labile est élué avant le fragment stable par un gradient de concentration de  $\text{CaCl}_2$ . Ainsi la dissociation du facteur VIII en présence de  $\text{CaCl}_2$  0,25 M suivie de la séparation des fragments VIII-C et VIII-AG par filtration sur gel en milieu dissociant pourraient aboutir à un mélange de deux fragments VIII-C labile et stable. La labilité du fragment VIII-C pourrait aussi provenir de la génération de trace de thrombine pendant la filtration sur gel.

En absence de  $\text{CaCl}_2$  les fragments VIII-C et VIII-AG séparés précédemment peuvent se recombinaer en une molécule de facteur VIII ayant les deux activités (§ 2.2.2.). Ceci confirme les résultats de Cooper et al (113). Non seulement le fragment VIII-C se lie au fragment VIII-AG en milieu non dissociant mais il peut aussi se lier au facteur VIII. Par la technique de filtration sur gel, on a montré que le fragment VIII-C possède une affinité envers le facteur VIII (§ 2.2.3.).

En effet, le facteur VIII présente un excès de fragment VIII-AG qui peut fixer une quantité additionnelle du fragment VIII-C. Lors de la préparation du cryoprécipité ou du procédé de purification le fragment VIII-C pourrait être séparé du fragment VIII-AG, laissant ainsi des sites vacants qui peuvent fixer le fragment VIII-C additionnel. En plus, l'association des fragments VIII-C et VIII-AG se fait dans un rapport non connu, mais cette combinaison semble limitée. Dans une autre

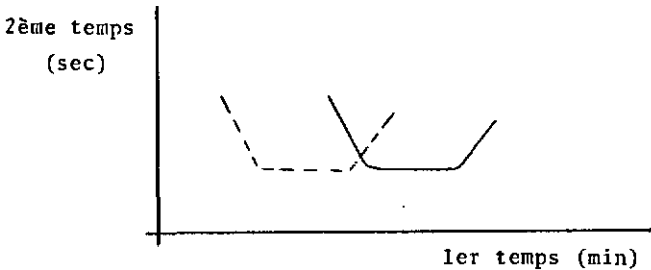
expérience, en utilisant une autre source de facteur VIII et du fragment VIII-C, on a observé que seule une petite quantité de fragment VIII-C peut se combiner au facteur VIII. Cela montre qu'il existe peu de sites vacants.

In vitro, la thrombine active le facteur VIII avant que celui-ci participe à la cascade de coagulation (§ 2.2.4.). L'activation du facteur VIII dépend de la concentration de la thrombine (Fig.17). Plus la concentration de thrombine est élevée, plus l'activation est rapide (114), de même que l'inactivation. Le fragment VIII-C peut être activé de la même manière par la thrombine (Fig.18). Switzer et McKee (93) ont montré que le facteur VIII est lentement activé par la thrombine en présence de  $\text{CaCl}_2$  0,25 M. En plus, on a montré que l'activation du fragment VIII-C par la thrombine dépend de la concentration de  $\text{CaCl}_2$  (Fig.19). A concentrations élevées, le chlorure de calcium retarde l'activation et l'inactivation. Il en est de même pour l'activation du facteur VIII par la thrombine en présence de  $\text{CaCl}_2$ . Ce retard est très marqué à la concentration de 0,25 M de  $\text{CaCl}_2$ , à laquelle le facteur VIII est aussi dissocié en VIII-AG et VIII-C. A cette concentration de  $\text{CaCl}_2$ , la force ionique pourrait aussi ralentir l'activation. La concentration physiologique de  $\text{Ca}^{2+}$  (2,5 mM) ne semble pas jouer un rôle important dans ce phénomène d'activation et inactivation.

La purification du facteur VIII est souvent difficile à cause de sa sensibilité aux protéases, et surtout à la thrombine. L'hirudine inhibe la thrombine en formant avec elle un complexe équimolaire (116). Tandis que le mélange de thrombine-hirudine (rapport d'activité 1:2) n'a aucun effet sur le facteur VIII, la même concentration de thrombine libre l'active rapidement (Fig.20). Si l'activation est stoppée avec l'hirudine avant d'atteindre le maximum, le coefficient d'activation est moindre, mais le produit d'activation est plus stable, l'activation est incomplète, une nouvelle phase d'activation est observée après une seconde addition de thrombine. Il serait donc recommandé

d'incorporer l'hirudine comme inhibiteur durant le procédé de purification du facteur VIII (117). Cependant une protéolyse de l'antigène du facteur VIII par la thrombine ne modifie en rien le poids moléculaire des sous-unités lorsque celles-ci sont réduites et analysées sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (12,22). Ces résultats suggèrent que le fragment VIII-C représente une partie infime de la molécule du facteur VIII et qu'une protéolyse limitée du fragment VIII-C par la thrombine est nécessaire pour sa participation dans la génération du facteur  $X_a$ , tandis qu'une protéolyse avancée l'inactive.

Le phénomène d'activation du facteur VIII (respectivement du fragment VIII-C) est aussi observé avec la méthode en 2 temps. Dans cette méthode, seul le temps de génération du facteur  $X_a$  (1er temps) est raccourci. Cet effet peut être illustré schématiquement de la manière suivante:



La courbe en pointillé représente le facteur VIII (respectivement le fragment VIII-C) préincubé avec la thrombine, tandis que la courbe pleine représente le système normal sans thrombine. Ce phénomène est aussi observé avec le plasma humain préalablement adsorbé sur l'Alumina ( $Al(OH)_3$ ).

On a aussi essayé d'activer le facteur VIII (respectivement le fragment VIII-C) avec le facteur  $X_a$ . Le facteur VIII incubé avec le facteur  $X_a$  ne présente aucun changement d'activité coagulante. Après 1h d'incubation avec le facteur  $X_a$  il peut être activé par la thrombine de la même manière qu'en absence

de facteur  $X_a$ . Donc le facteur  $X_n$  n'a aucun effet sur l'activité coagulante du facteur VIII.

Le facteur VIII est une molécule non homogène. Il se présente sous forme d'une bande élargie sur le gel de polyacrylamide à 3% (Fig.21). Par réduction en présence de mercapto-2-éthanol, on a observé que l'activité coagulante diminue légèrement alors que l'activité antigénique augmente sensiblement en fonction de la durée d'incubation. Parallèlement, l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 3% met en évidence plusieurs bandes et finalement une bande principale. Il est probable que l'augmentation de la concentration antigénique, mesurée par la technique de Laurell, n'est qu'un artifice dû à la modification de la mobilité électrophorétique de la molécule (89). En effet, la réduction de la molécule et l'apparition de plusieurs chaînes polypeptidiques peuvent expliquer l'augmentation apparente de l'activité antigénique. Il est possible que la réduction du facteur VIII permette l'accès de l'anticorps à un plus grand nombre de déterminants antigéniques. En outre, Counts et al (118) ont décrit que l'activité von Willebrand est complètement détruite au début de la réduction. Cela montre que seuls les agrégats de poids moléculaire élevé du facteur VIII sont responsables de l'activité von Willebrand.

Les techniques immunochimiques sont très importantes dans l'étude de la structure du facteur VIII. L'obtention des anticorps hétérologues permet de mieux la caractériser. Ils sont spécifiquement dirigés contre les antigènes injectés au lapin.

Anti-VIII: L'anti-VIII utilisé pour la neutralisation du facteur VIII et du fragment VIII-C (§ 2.2.6.) est collecté et purifié après 6 injections. Il neutralise parallèlement les activités coagulante et antigénique du facteur VIII et aussi le fragment VIII-C (Fig.22 et 23). Ces résultats montrent

qu'il est un mélange d'anticorps qui reconnaissent les déterminants antigéniques du fragment VIII-AG et du fragment VIII-C. L'augmentation du titre de l'anti-VIII avec le temps et le nombre d'injections correspond à une augmentation du titre des anticorps dirigés contre le fragment VIII-AG, et dans une proportion plus faible à l'augmentation du titre des anticorps dirigés contre le fragment VIII-C.

Anti-VIII-AG: L'anti-VIII-AG utilisé pour la neutralisation (§ 2.2.6.) est collecté et purifié après 5 injections. Il neutralise spécifiquement l'activité antigénique du facteur VIII. Lorsque l'antigène du facteur VIII est encore détectable dans le surnageant ( $\sim 5\%$ ), l'activité coagulante n'est nullement affectée (Fig.22). En léger excès d'anticorps, l'antigène du facteur VIII commence à précipiter et entraîne donc une diminution de l'activité coagulante. En plus, l'anti-VIII-AG ne neutralise pas le fragment VIII-C (Fig.23), ce qui montre que les déterminants antigéniques du fragment VIII-C ne sont pas reconnus par l'anti-VIII-AG. L'augmentation du titre de l'anti-VIII-AG avec le temps et le nombre d'injections n'influence pas la forme de la courbe de neutralisation. Donc l'anti-VIII-AG produit reste spécifique contre le fragment VIII-AG. Kernoff (119) a observé que, lorsque le facteur VIII du plasma est incubé avec l'antisérum contre le facteur VIII, l'activité coagulante n'est fortement diminuée qu'après ultracentrifugation. Cela suggère que la faible action inhibitrice envers l'activité coagulante est due soit à une faible neutralisation de l'antisérum envers l'activité coagulante soit à l'entraînement du fragment VIII-C dans le précipité au cours de l'ultracentrifugation. En plus nous sommes capables de montrer que l'activité VIII-C diminue de 50% lorsque le mélange des fragments VIII-AG et VIII-C est précipité avec l'anti-VIII-AG (résultats non représentés). Cette diminution provient certainement de l'entraînement du fragment VIII-C dans le précipité.

Anti-VIII-C: 5 lapins de 3-4 kg ont été immunisés avec le fragment VIII-C. Chez tous les lapins, les antisérums sont capables de neutraliser l'activité coagulante du facteur VIII et réagissent faiblement avec l'activité VIII-AG (détectée par les méthodes de Laurell et Scheidegger). 2 lapins produisent un antisérum avec un titre d'environ 400 U Bethesda/ml, le troisième avec un titre d'environ 200 U Bethesda/ml, et les 2 derniers avec un titre relativement faible. L'anti-VIII-C utilisé dans la neutralisation (§ 2.2.6.) est collecté et purifié après 8 injections. Tandis que l'activité antigénique n'est nullement affectée, l'anti-VIII-C neutralise encore l'activité VIII-C du facteur VIII (Fig.22). Cependant en solution concentrée, il réagit tout de même avec l'antigène du facteur VIII. Ce phénomène peut être expliqué par le procédé de préparation du fragment VIII-C. La préparation du fragment VIII-C par dissociation et filtration sur gel du facteur VIII en présence de  $\text{CaCl}_2$  0,25 M contient malheureusement encore des traces de fragment VIII-AG. Cette contamination détectable par la méthode d'IRMA est suffisante pour créer l'anticorps dirigé contre le fragment VIII-AG chez le lapin immunisé. C'est pourquoi une adsorption préalable de cet anticorps contaminant sur l'immunoabsorbant VIII-AG-Sepharose 2BCL (faute de mieux avec VIII-Sepharose 2BCL prélavé avec le tampon à pH 2,5 pour détruire les déterminants antigéniques du fragment VIII-C) est nécessaire pour rendre l'anti-VIII-C totalement spécifique envers l'activité coagulante du facteur VIII. Cette adsorption se révèle indispensable avant l'utilisation de l'anti-VIII-C dans les expériences subséquentes, en plus elle ne diminue pas le titre de l'anti-VIII-C.

Plusieurs auteurs ont décrit que les antisérums hétérologues contre le fragment VIII-C peuvent précipiter l'antigène du facteur VIII (83,89,120,121). Ceci pourrait suggérer que le fragment VIII-C et le fragment VIII-AG ont des déterminants

antigéniques communs mais la détection des traces du fragment VIII-AG par la méthode d'IRMA dans notre préparation du fragment VIII-C et l'adsorption subséquente en système solide-liquide de l'anticorps contaminant sans diminuer le titre de l'anti-VIII-C montrent que ces 2 fragments ont apparemment des déterminants antigéniques tout à fait différents. L'incapacité de l'anti-VIII-AG de neutraliser le fragment VIII-C renforce cette dernière hypothèse (Fig.23).

Par conséquent, la détermination des activités VIII-AG et VIII-C résiduelles du facteur VIII en fonction de la dilution de l'antisérum est une bonne méthode pour déterminer s'il y a un mélange d'anticorps (anti-VIII-AG et anti-VIII-C). Les caractéristiques des courbes de neutralisation permettent de juger de la qualité de l'antisérum (§ 2.2.6.).

L'inhibiteur homologue neutralise l'activité coagulante du facteur VIII sans modifier la concentration de l'antigène. Cet inhibiteur ne doit reconnaître que les déterminants antigéniques du fragment VIII-C sur la molécule du facteur VIII. Lazarchick et Hoyer (123) ont analysé par filtration sur gel la distribution du complexe dont le poids moléculaire est supérieur à 340.000 . Lavergne et al (124) ont réussi à l'isoler par chromatographie d'affinité. Le déplacement de l'équilibre du complexe vers la dissociation en antigène et anticorps peut être obtenu par augmentation de température ou force ionique, ou par diminution de pH (122). Ces changements physiques affectent les liaisons intermoléculaires de nature électrostatique et/ou hydrophobe et de Van der Waals, et les ponts d'hydrogène entre l'antigène et l'anticorps. Les déterminants antigéniques du fragment VIII-C sont sensibles aux températures élevées et au pH acide (125,126).

On a étudié la stabilité de l'anti-VIII-C, de l'activité VIII-C(Ag) et du complexe VIII-C(Ag)-anti-VIII-C en fonction de la température et du pH (§ 2.2.7.). L'anti-VIII-C reste

stable jusqu'à 66°C (pH 7,5) (Fig.25) et dans le domaine de pH 2,5 - 10 (Fig.26). L'activité VIII-C(Ag) est fortement diminuée au pH 3,5 et complètement détruite au pH 2,5, de même qu'à 56°C pendant 30 minutes. La dissociation du complexe se fait par destruction de l'activité VIII-C(Ag) et libération de l'anti-VIII-C actif: la partie porteuse de l'activité VIII-C(Ag) ne peut plus se combiner à l'anti-VIII-C. Le complexe est dissocié aux valeurs de pH ou à la température où l'activité VIII-C(Ag) est détruite, cependant il montre une plus grande stabilité envers les changements physiques que la partie porteuse de l'activité VIII-C(Ag). Cette étude de stabilité met en évidence certaines ressemblances entre l'inhibiteur homologue et l'anti-VIII-C hétérologue:

- a) Neutralisation de l'activité coagulante du facteur VIII sans affecter l'activité VIII-AG
- b) Neutralisation du fragment VIII-C
- c) Le complexe antigène-anticorps est dissociable en milieu acide (pH 2,5 - 3,5) ou à 56°C par destruction des déterminants antigéniques du fragment VIII-C
- d) Le facteur VIII prétraité à 56°C ou à pH 2,5 - 3,5 ne peut bloquer ni l'inhibiteur humain ni l'anti-VIII-C hétérologue.

En plus, l'anti-VIII-C semble plus stable que l'inhibiteur homologue à pH 2,5 .

En solution, l'anti-VIII-C neutralise spécifiquement l'activité coagulante du facteur VIII sans former de précipité. Il est stable en fonction de la température et du pH. Par contre, l'anti-VIII-AG ne peut provoquer une diminution de l'activité VIII-C que lorsque l'antigène du facteur VIII n'est plus détectable en solution. Zimmerman et Edgington (68) ont décrit qu'en

système solide-liquide, l'antisérum hétérologue contre le facteur VIII, immobilisé sur un support solide, extrait plus d'activité VIII-AG que d'activité VIII-C du facteur VIII dans le plasma. Par contre, avec le même système, l'inhibiteur homologue immobilisé extrait sélectivement l'activité VIII-C du facteur VIII dans le plasma tandis que l'antigène est peu affecté. Koutts et al (69) ont confirmé plus tard ce dernier résultat en suggérant que par interaction avec l'inhibiteur humain immobilisé le facteur VIII est spontanément dissocié en 2 entités distinctes, dont l'une, le fragment VIII-C, se fixe sur l'immunoabsorbant.

En utilisant le système de Zimmerman et Edgington, on a montré que l'anti-VIII-AG immobilisé extrait stoichiométriquement les activités VIII-C et VIII-AG du facteur VIII dans le plasma humain (§ 2.2.8.3.). Les activités VIII-C et VIII-AG résiduelles correspondent parfaitement dans les limites d'erreur expérimentale. Ces résultats montrent qu'il existe un lien étroit entre le fragment VIII-C et le fragment VIII-AG dont l'adsorption sur l'anti-VIII-AG entraîne aussi une diminution correspondante du fragment VIII-C. Ils confirment en plus ceux de Bouma et al (112) et de Peake et Bloom (89).

Par contre, l'anti-VIII-C hautement purifié, immobilisé sur un support solide neutralise plus sélectivement l'activité coagulante du facteur VIII dans le plasma (§ 2.2.8.2.). Tandis que l'antigène du facteur VIII déterminé par les 2 méthodes d'IRMA et de Laurell reste sensiblement inchangé (80-100% du contrôle), l'activité coagulante est diminuée de 46% (Fig.27). Ces résultats montrent que le fragment VIII-C peut être séparé du fragment VIII-AG. Cependant la capacité inhibitrice de l'anti-VIII-C immobilisé est largement inférieure à celle de l'anti-VIII-C en solution. Elle représente environ 1-2% de la capacité inhibitrice de l'anti-VIII-C en solution. Ceci peut être expliqué par l'encombrement stérique qui est créé

d'une part par le support solide servant à immobiliser l'anti-VIII-C et d'autre part par l'antigène du facteur VIII qui empêche la fixation du fragment VIII-C sur l'anti-VIII-C immobilisé. On a observé que l'anti-VIII-C partiellement purifié (contenant encore des traces d'anti-VIII-AG) peut influencer fortement les résultats expérimentaux (§ 2.2.8.2.). Dans ce cas, les activités VIII-C et VIII-AG du facteur VIII sont extraites stoichiométriquement (Fig.27). L'anti-VIII-AG présente aussi la même courbe de neutralisation, et l'activité VIII-AG extraite n'est alors éluee de l'immunoabsorbant que par le tampon de dissociation du complexe antigène-anticorps à pH 2,5 mais pas par le tampon contenant 0,25 M de  $\text{CaCl}_2$ . Ceci montre que l'activité VIII-AG extraite provient des traces de l'anti-VIII-AG se trouvant encore dans la préparation de l'anti-VIII-C.

En conclusion, l'anticorps contre le fragment VIII-C peut être obtenu par injection de ce fragment chez le lapin. L'anti-VIII-C spécifique est immunochimiquement purifié. Ses caractéristiques immunophysiques présentent des ressemblances avec celles de l'inhibiteur homologue. Fixé sur un support solide, il perd en grande partie sa capacité inhibitrice envers l'activité VIII-C du facteur VIII dans le plasma. Il pourrait être utile dans la recherche du CRM chez les hémophiles comme le montre le paragraphe 2.2.9.

L'inhibiteur homologue a permis de distinguer le cas où le facteur VIII est défectueux au point de vue biologique ( $\text{CRM}^+$ ) de celui des hémophiles graves où il y a une vraie déficience du fragment VIII-C ( $\text{CRM}^-$ ). Cependant Zimmerman et al (127) ont récemment décrit que la plupart des plasmas d'hémophile contiennent du CRM, ce qui explique la faible proportion (10%) d'hémophiles qui produisent des inhibiteurs homologues. Très récemment ce CRM a pu être déterminé par la méthode immunoradiométrique en utilisant l'inhibiteur homologue (128,129). Malgré ses ressemblances avec l'inhibiteur homologue, l'anti-VIII-C hété-

rologue reconnaîtrait en premier lieu les déterminants antigéniques du fragment VIII-C autres que ceux reconnus par l'inhibiteur homologue, et constituerait alors un moyen complémentaire dans le diagnostic des hémophiles. Les ressemblances entre l'inhibiteur homologue et l'anti-VIII-C hétérologue laisseraient supposer que, chez les hémophiles graves produisant l'inhibiteur, il y a une absence complète de la partie porteuse de l'activité coagulante (biologique et immunologique).

#### 4. RESUME

Nous avons démontré que l'activation du fragment VIII-C par la thrombine en présence ou absence de  $\text{CaCl}_2$  est identique à celle du facteur VIII. Non seulement le fragment VIII-C peut se combiner de nouveau au fragment VIII-AG pour donner le facteur VIII, mais il peut aussi se lier au facteur VIII dans une plus faible proportion. La production et l'isolement de l'anticorps hétérologue spécifiquement dirigé contre le fragment VIII-C permettent alors d'étudier ses propriétés physico-immunologiques qui se révèlent similaires à celles de l'inhibiteur homologue. L'étude de la réactivité immuno-chimique du facteur VIII en fonction de différents anticorps hétérologues en solution et immobilisés indique qu'il existe un lien biologique étroit entre le fragment VIII-C et le fragment VIII-AG. Finalement ces résultats montrent que le facteur VIII est constitué de 2 entités distinctes qui ne peuvent pas être dissociées dans les conditions physiologiques.

## 5. BIBLIOGRAPHIE

1. FUJIKAWA K., LEGAZ M.E., KATO H. et DAVIE E.W. The mechanism of activation of bovine factor IX (Christmas factor) by bovine factor XI (activated plasma thromboplastin antecedent). *Biochem. a* 13, 4508 (1974)
2. OSTERUD B. et RAPAPORT S.I. Synthesis of intrinsic factor X activator. Inhibition of the function of formed activator by antibodies to factor VIII and to factor IX. *Biochem.* 9, 1854 (1970)
3. RAPAPORT S.I., HJORT P.F. et PATCH M.J. Further evidence that thrombin activation of factor VIII is an essential step in intrinsic clotting. *Scand.J.Clin.Lab.Invest.* 17 (suppl.84), 88 (1965)
4. DUCKERT F. et KOLLER F. The old Swiss haemophilia families of Tenna and Wnld, dans *Handbook of Haemophilia*, p.21, éds. BRINKHOUS K.M. et HEMKER H.C., American Elsevier Publishing Co (1975)
5. WRIGHT A.E. On the method of determining the condition of blood coagulability for clinical and experimental purposes, and on the effect of the administration of calcium salts in haemophilia and actual or threatened haemorrhage. *Brit.Med.J.* 2, 223 (1893)
6. BIGGS R., DOUGLAS A.S., McFARLANE R.G. et al. Christmas disease, a condition previously mistaken for hemophilia. *Brit.Med.J.* 2, 1378 (1952)
7. AGGELER P.M., WHITE S.G., GLENOENING M.B. Plasma thromboplastin component (PTC) deficiency: a new disease resembling hemophilia. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 79, 692 (1952)
8. PAVLOVSKY A. Factor VIII antihemophilic globulin. *Thromb.Diath. Haemorrhag.* 3, 658 (1959)
9. Von WILLEBRAND E.A. *Finska Läkarsällskapetets Handlingar* 67(2), 7 (1926)
10. POOL J.G., HERSHGOLD E.J. et PAPPENHAGEN A.R. High potency anti-hemophilic factor concentrate prepared from cryoglobulin precipitate. *Nature* 203, 312 (1964)
11. NEWMAN J., JOHNSON A.J., KARPATKIN M.H. et PUSZKIN S. Methods for the production of clinically effective intermediate and high purity factor VIII concentrates. *Brit.J.Haematol.* 21, 1 (1971)
12. BLOMBACK B. et BLOMBACK M. Purification of human and bovine fibrinogen. *Arkiv.Kemi.* 10, 415 (1956)

13. WEBSTER W.B., ROBERTS H.R., THELIN G.M. et al. Clinical use of a new glycine-precipitated antihemophilic fraction. *Am.J.Med.Sci.* 250, 643 (1965)
14. SOULIER J.P. Séparation du fibrinogène et du facteur antihémophilique A.II.A l'aide de la bentonite. *Pathol.Biol.* 7, 2451 (1959)
15. HERSGOLD E.J., DAVISON A.M. et JANSZEN M.E. Isolation and some chemical properties of human factor VIII. *J.Lab.Clin.Med.* 77, 185 (1971)
16. GREEN D. A simple method for the purification of factor VIII (Antihemophilic factor) employing snake venom. *J.Lab.Clin.Med.* 77, 153 (1971)
17. MARCHESI S.L., SHULMAN N.R. et GRALNICK H.R. Studies on the purification and characterization of human factor VIII. *J.Clin.Invest.* 51, 2151 (1972)
18. Van MOURIK J.A. et MOCHTAR I.A. Purification of human antihemophilic factor (factor VIII) by gel chromatography. *Biochem. Biophys.Acta* 221, 677 (1970)
19. SCHMER G., KIRBY E.P., TELLER D.C. et DAVIE E.W. The isolation and characterization of bovine factor VIII (Antihemophilic factor). *J.Biol.Chem.* 247, 2512 (1972)
20. RATNOFF O.D., KASS L. et LANG P.D. Studies on the purification of antihemophilic factor (factor VIII). II. Separation of partially purified antihemophilic factor by gel filtration of plasma. *J.Clin.Invest.* 48, 957 (1969)
21. KASS L., RATNOFF O.D. et LEON M.A. Studies on the purification of antihemophilic factor (factor VIII). I. Precipitation of antihemophilic factor by concanavalin A. *J.Clin.Invest.* 48, 351 (1969)
22. BENNETT B., FORMAN W.B. et RATNOFF O.D. Studies on the nature of antihemophilic factor (factor VIII). Further evidence relating the AHF-like antigens in normal and hemophilic plasmas. *J.Clin.Invest.* 52, 2191 (1973)
23. SHAPIRO G.A., ANDERSEN J.C., PIZZO S.V. et MCKEE P.A. The subunit structure of normal and hemophilic factor VIII. *J.Clin.Invest.* 52, 2198 (1973)
24. LEGAZ M.E., SCHMER G., COUNTS R.B. et DAVIE E.W. Isolation and characterization of human factor VIII (Antihemophilic plasma). *J.Biol.Chem.* 248, 3946 (1973)
25. SODETZ J.M., PIZZO S.V. et MCKEE P.A. Relationship of sialic acid to function and in vivo survival of human factor VIII/von Willebrand factor protein. *J.Biol.Chem.* 252, 5538 (1977)

26. SALZMAN E.W. Measurement of platelet adhesiveness: a simple in vitro technique demonstrating an abnormality in von Willebrand's disease. *J.Lab.Clin.Med.* 62, 724 (1963)
27. BOUMA B.N., WIEGERINCK Y., SIXMA J.J. et al. Immunological characterization of purified antihaemophilic factor (factor VIII) which corrects abnormal platelet retention in von Willebrand's disease. *Nature New Biology* 236, 104 (1972)
28. GANGAROSA E.J., JOHNSON T.R. et RAMOS H.S. Ristocetin-induced thrombocytopenia: site and mechanism of action. *Arch.Intern.Med.* 105, B3 (1960)
29. HOWARD M.A. et FIRKIN B.G. Ristocetin, a new tool in the investigation of platelet aggregation. *Thromb.Diath.Haemorrh.* 26, 362 (1971)
30. WEISS H.J., ROGERS J. et BRAND H. Defective ristocetin-induced platelet aggregation in von Willebrand's disease and its correction by factor VIII. *J.Clin.Invest.* 52, 2697 (1973)
31. HOUGIE C., SARGEANT R.B., BROWN J.E. et BAUGH R.F. Evidence that factor VIII and the ristocetin aggregating factor (VIII<sup>Rist</sup>) are separate molecular entities. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 147, 58 (1974)
32. ZIMMERMAN T.S., ROBERTS J. et EDGINGTON T.S. Factor VIII-related antigen: Multiple molecular forms in human plasma. *Proc.Nat.Acad.Sci.USA* 72, 5121 (1975)
33. PEAKE I.R., BLOOM A.L. et GIDDINGS J.C. Inherited variants of factor VIII-related protein in von Willebrand's disease. *N.Engl.J.Med.* 291, 113 (1974)
34. KERNOFF P.B.A., GRUSON R. et RIZZA C.R. A variant of factor VIII-related antigen. *Brit.J.Haematol.* 26, 435 (1974)
35. SULTAN Y., SIMEON J. et CAEN J.P. Electrophoretic heterogeneity of normal factor VIII/von Willebrand protein, and abnormal electrophoretic mobility in patients with von Willebrand's disease. *J.Lab.Clin.Med.* B7, 185 (1976)
36. OVER J., BOUMA B.N., Van MOURIK J.A. et al. Heterogeneity of human factor VIII. Characterization of factor VIII present in the supernatant of cryoprecipitate. *J.Lab.Clin.Med.* 91, 32 (1978)
37. GIRMA J.P., ARDAILLOU N. et al. Fluid phase immunoradiometric assay for the detection of qualitative abnormalities of factor VIII/von Willebrand in variants of von Willebrand's disease. *J.Lab.Clin.Med.* 93, 926 (1979)
38. PEAKE I.R. et BLOOM A.L. The use of an immunoradiometric assay for factor VIII-related antigen in the study of atypical von Willebrand's disease. *Thromb.Res.* 10, 27 (1977)

39. GREEN D. Spontaneous inhibitors to factor VIII. *Brit.J.Haematol.* 15, 57 (1968)
40. LAWRENCE J.S. et JOHNSON J.B. The presence of a circulating anticoagulant in a male member of a hemophiliac family. *Trans.Am.Clin.Climato.Assoc.* 57, 223 (1942)
41. BIDWELL E.,DENSON K.W.E.,DIKE G.W.R. et al. Antibody nature of the inhibitor to antihemophilic globulin (factor VIII). *Nature* 210, 746 (1966)
42. LUSHER J.M.,SHUSTER J.,EVANS R.K. et POULIK M.D. Antibody nature of an AHG (factor VIII) inhibitor. *J.Pediat.* 72,325 (1968)
43. ANDERSON B.R. et TERRY W.D. Gamma G<sub>4</sub>-globulin antibody causing inhibition of clotting factor VIII. *Nature* 217, 174 (1968)
44. SHAPIRO S.S. The immunologic character of acquired inhibitors of antihemophilic globulin (factor VIII) and the kinetics of their interaction with factor VIII. *J.Clin.Invest.* 46, 147 (1967)
45. CASTALDI P.A. et PENNY R. A macroglobulin with inhibitory activity against coagulation factor VIII. *Blood* 35, 370 (1970)
46. FEINSTEIN D.,CHONG M.N.Y., RAPAPORT S.I. Immunologic characterization of 12 factor VIII inhibitors. *Blood* 34, 85 (1969)
47. DENSON K.W.E.,BIGGS R. et al. Two types of hemophilia (A<sup>+</sup> and A<sup>-</sup>): a study of 48 cases. *Brit.J.Haematol.* 17, 163 (1969)
48. HOYER L.W. et BRECKENRIDGE R.T. Immunologic studies of anti-hemophilic factor (AHF, factor VIII): cross-reacting material in a genetic variant of hemophilia A. *Blood* 32, 962 (1968)
49. LECHNER K. Inactive factor VIII in hemophilia A and von Willebrand's disease. *Acta Haematol.* 48, 257 (1972)
50. MEYER D. et LARRIEU M.J. Factor VIII and factor IX variants. Relationship between haemophilia B<sub>m</sub> and haemophilia B<sup>-</sup>. *Eur.J.Clin.Invest.* 1, 425 (1971)
51. FEINSTEIN D.,CHONG M.N.Y.,KASPER C.K. et RAPAPORT S.I. Haemophilia A: polymorphism detectable by a factor VIII antibody. *Science* 163, 1071 (1969)
52. MANNUCCI P.M.,MEYER D.,RUGGERI Z.M. et al. Precipitating antibodies in von Willebrand's disease. *Nature* 262, 141 (1976)
53. STRATTON R.D.,WAGNER R.H.,WEBSTER W.P. et BRINKHOUS K.M. Antibody nature of circulating inhibitor of plasma von Willebrand factor. *Proc.Nat.Acad.Sci.USA* 72, 4167 (1975)

54. MARGOLIUS A., JACKSON D.P. et RATNOFF O.D. Circulating anticoagulants: a study of 40 cases and review of the literature. *Medicine (Balt.)* 40, 145 (1961)
55. POON M.C., SAITO H., RATNOFF O.D. et al. Techniques for demonstration of the specificity of circulating anticoagulants against antihemophilic factor (factor VIII) with studies of two cases possibly related to diphenylhydantoin therapy. *Blood* 49, 477 (1977)
56. CORNU P., LARRIEU M.J., CAEN J. et BERNARD J. Maladie de Willebrand. Etude clinique, génétique et histologique (à propos de 22 observations). *Nouv.Rev.Franç.Hemat.* 1, 231 (1961)
57. NILSSON I.M., BLOMBACK M. et BLOMBACK B. Von Willebrand's disease in Sweden. Its pathogenesis and treatment. *Acta Med.Scand.* 164, 263 (1959)
58. Van CREVELD S. et MOCHTAR I.A. Von Willebrand's disease - a plasma deficiency cause of the prolonged bleeding time. *Ann.Pediatr.* 194, 37 (1960)
59. NILSSON I.M. et CRONBERG S. A severe haemorrhagic disorder with prolonged bleeding time due to a plasma defect but a normal factor VIII. *Acta Med.Scand.* 184, 181 (1968)
60. HOLMBERG L. et NILSSON I.M. Genetic variants of von Willebrand's disease. *Brit.Med.J.* 3, 317 (1972)
61. THOMSON C., FORBES C.D. et PRENTICE C.R.M. Evidence for a qualitative defect in factor VIII-related antigen in von Willebrand's disease. *Lancet* 1, 594 (1974)
62. BLOOM A.L., PEAKE I.R. et GIDDINGS J.C. The presence and reactions of high and lower-molecular-weight procoagulant factor VIII in the plasma of patients with von Willebrand's disease after treatment: significance for a structural hypothesis for factor VIII. *Thromb.Res.* 3, 389 (1973)
63. NILSSON I.M., BLOMBACK M. et v.FRANCKEN I. On a inherited autosomal hemorrhagic diathesis with antihemophilic globulin (AHG) deficiency and prolonged bleeding time. *Acta Med.Scand.* 159, 179 (1957)
64. SILWER J. Von Willebrand's disease in Sweden. *Acta Paediat.Scand. Suppl.* 238, 1 (1973)
65. BARROW E.M. et GRAHAM J.B. Von Willebrand's disease. *Prog.Hematol.* 4, 203 (1964)
66. LYON M.F. Chromosomal and subchromosomal inactivation. *Ann.Rev.Genet.* 2, 31 (1968)

67. MEYER D., LAVERGNE J.M., LARRIEU M.J. et JOSSO F. Cross-reacting material in congenital factor VIII deficiencies (Haemophilia A and von Willebrand's disease). *Thromb.Res.* 1, 183 (1972)
68. ZIMMERMAN T.S. et EDGINGTON T.S. Factor VIII coagulant activity and factor VIII-like antigen: independent molecular entities. *J.Exp.Med.* 138, 1015 (1973)
69. KOUTTS J., LAVERGNE J.M. et MEYER D. Immunological evidence that human factor VIII is composed of two linked moieties. *Brit.J.Haematol.* 37, 415 (1977)
70. ZIMMERMAN T.S., RATNOFF O.D. et LITTEL A.S. Detection of carriers of classic haemophilia using an immunologic assay for antihemophilic factor (factor VIII). *J.Clin.Invest.* 50, 255 (1971)
71. BOUMA B.N., Van der KLAUW M.M. et al. Evaluation of the detection ratio of hemophilia carriers. *Thromb.Res.* 7, 339 (1975)
72. EYSTER M.E., JONES M.B., MOORE T. et OELLI-BOVI L. Carrier detection in classic hemophilia by combined measurement of immunologic (VIII AGN) and procoagulant (VIII AHF) activities. *Am.J.Clin.Pathol.* 65, 957 (1976)
73. RIZZA C.R., RHYMES I.L., AUSTEN D.E.G. et al. Detection of carriers of hemophilia: a "blind" study. *Brit.J.Haematol.* 30, 447 (1975)
74. KLEIN H.G., ALEDORT L.M., BOUMA B.N. et al. A cooperative study for the detection of the carrier state of classic hemophilia. *N.Engl.J.Med.* 296, 959 (1977)
75. VELTKAMP J.J., DRION E.F. et LOELIGER E.A. Detection of the carrier state in hereditary coagulation disorders. *Thromb.Diath.Haemorrhag.* 19, 279 (1968), *ibid.* 19, 403 (1968)
76. RAPAPORT S.I., PATCH M.J. et MOORE F.J. Antihemophilic globulin levels in carriers of hemophilia A. *J.Clin.Invest.* 39, 1619 (1960)
77. WEISS H.J. et HOYER L.W. Von Willebrand factor: dissociation from antihemophilic factor procoagulant activity. *Science* 182, 1149 (1973)
78. WEISS H.J., PHILLIPS L.L. et ROSNER W. Separation of subunits of antihemophilic factor (AHF) by agarose gel chromatography. *Thromb.Diath.Haemorrhag.* 27, 21 (1972)
79. OWEN W.G. et WAGNER R.H. Antihemophilic factor: separation of an active fragment following dissociation by salts or detergents. *Thromb.Diath.Haemorrhag.* 27, 502 (1972)
80. SUSSMAN I., ROSNER W. et WEISS H.J. Concentration-dependent dissociation of factor VIII in 1 M NaCl. *Am.J.Physiol.* 230, 434 (1976)

81. POON M.C. et RATNOFF O.D. Evidence that functional subunits of antihemophilic factor (factor VIII) are linked by non covalent bonds. *Blood* 48, 87 (1976)
82. LAVERGNE J.M., MEYER D. et al. Influence of high ionic strength buffers on factor VIII/von Willebrand factor from different species. *Thromb.Res.* 13, 409 (1978)
83. RICK M.E. et HOYER L.W. Immunologic studies of antihemophilic factor (AHF, factor VIII). V. Immunologic properties of AHF subunits produced by salt dissociation. *Blood* 42, 737 (1973)
84. THELIN G.M. et WAGNER R.H. Sedimentation of plasma antihemophilic factor. *Arch.Biochem.* 95, 70 (1961)
85. WEISS H.J. et KOCHWA S. Molecular forms of antihemophilic globulin in plasma, cryoprecipitate and after thrombin activation. *Brit.J.Haematol.* 18, 89 (1970)
86. COOPER H.A., REISNER F.F., HALL M. et WAGNER R.H. Effects of thrombin treatment on preparations of factor VIII and the  $Ca^{2+}$ -dissociated active fragment. *J.Clin.Invest.* 56, 751 (1975)
87. KÄELIN A.C. Sodium periodate modification of factor VIII procoagulant activity. *Brit.J.Haematol.* 31, 349 (1975)
88. AUSTEN D.E.G. Factor VIII of small molecular weight and its aggregation. *Brit.J.Haematol.* 27, B9 (1974)
89. PEAKE I.R. et BLOOM A.L. The dissociation of factor VIII by reducing agents, high salt concentration and affinity chromatography. *Thromb.Haemost.* 35, 191 (1976)
90. HOLMBERG L. et LJUNG R.L. F VIII-C by antigen-antibody chromatography. *Thromb.Res.* 12, 667 (1978)
91. TUDDENHAM E.G.D., TRABOLD N.C., COLLINS J.A. et HOYER L.W. The properties of factor VIII coagulant activity prepared by immuno-adsorbent chromatography. *J.Lab.Clin.Med.* 93, 40 (1979)
92. HOROWICZ B., LIPPIN A. et WOODS K.R. Purification of low molecular weight factor VIII by affinity chromatography using factor VIII-Sepharose. *Thromb.Res.* 14, 463 (1979)
93. SWITZER M.E. et MCKEE P. Some effects of calcium on the activation of human factor VIII/von Willebrand factor by thrombin. *J.Clin.Invest.* 60, B19 (1977)
94. BECK E.A., BACHMANN P., BARBIER P. et FURLAN M. Importance of protease inhibition in studies on purified factor VIII (antihemophilic factor). *Thromb.Haemost.* 35, 187 (1976)

95. VEJAR G.A. et DAVIE E.W. Formation of a serine enzyme in the presence of bovine factor VIII (antihemophilic factor) and thrombin. *Science* 197, 374 (1977)
96. LAURELL C.B. Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies. *Anal.Biochem.* 15, 45 (1966)
97. HOYER L.W. Immunologic studies of antihemophilic factor (AHF, factor VIII).IV.Radioimmunoassay of AHF antigen. *J.Lab.Clin.Med.* B0, 822 (1972)
98. RUGGERI Z.M.,MANNUCCI P.M.,JEFFCOATE S.L. et INGRAM G.I.C. Immunoradiometric assay of factor VIII related antigen, with observations in 32 patients with von Willebrand's disease. *Brit.J.Haematol.* 33, 221 (1976)
99. COUNTS R.B. Solid phase immunoradiometric assay of factor VIII protein. *Brit.J.Haematol.* 31, 429 (1975)
100. CATT K.,TREGAR G.W. Solid-phase radioimmunoassay in antibody coated tubes. *Science* 158, 1570 (1967)
101. MILES L.E.M. et HALES C.N. Labelled antibodies and immunological assay systems. *Nature* 219, 1B6 (196B)
102. GREENWOOD F.C., HUNTER W.M. et GLOVER J.S. The preparation of <sup>131</sup>I-labelled human growth hormone of high specific radioactivity. *Biochem.J.* B9, 114 (1963)
103. SCHEIDEGGER J.J. Une micro-méthode de l'immunoélectrophorèse. *Int.Arch.Allerg.* 7, 103 (1955)
104. LANGDELL R.D.,WAGNER R.H. et BRINKHOUS K.M. Effect of antihemophilic factor on one-stage clotting tests: a presumptive test for hemophilia and a simple one-stage antihemophilic factor assay procedure. *J.Lab.Clin.Med.* 41, 637 (1953)
105. BIGGS R.,EVELING J. et RICHARDS G. The assay of antihemophilic globulin activity. *Brit.J.Haematol.* 1, 20 (1955)
106. DENSON K.W.E. The simplified two-stage assay for factor VIII. dans "Human blood coagulation hemostasis and thrombosis", éd. BIGGS R., p.6BB , 2ème édition, Blackwell Scientific Publications Oxford 1976
107. BELL W.N. et ALTON H.G. A brain extract as a substitute for platelet suspensions in the thromboplastin generation test. *Nature (London)* 174, B80 (1954)
108. WEBER K. et OSBORN M. The reliability of molecular weight determinations by dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *J.Biol.Chem.* 244, 4406 (1969)

109. PEACOCK A.C. et DINGMAN C.W. Molecular weight estimation and separation of ribonucleic acid by electrophoresis in agarose-acrylamide composite gels. *Biochem* 7, 668 (1968)
110. CUATRECASAS P. Protein purification by affinity chromatography. Derivatizations of agarose and polyacrylamide beads. *J.Biol.Chem.* 245, 3059 (1970)
111. KASPER C.K., ALEDORT L.M. et al. A more uniform measurement of factors VIII inhibitors. *Thromb.Diath.Haemorrhag.* 34, B69 (1975)
112. BOUMA B.N., de GRAAF S., HORDIJK-HOS J.M. et al. Investigations on the relationships of factor VIII related antigen, factor VIII procoagulant activity and von Willebrand factor activity using insolubilized rabbit antiserum. *Thromb.Res.* 7, 695 (1975)
113. COOPER H.A. et WAGNER R.H. The defect in hemophilic and von Willebrand's disease plasmas studied by a recombination technique. *J.Clin.Invest.* 54, 1093 (1974)
114. BIGGS R., McFARLANE R.G., DENSON K.W.E. et ASH B.J. Thrombin and the interaction of factors VIII and IX. *Brit.J.Haematol.* 11, 276 (1965)
115. RICK M.E. et HOYER L.W. Activation of low molecular weight fragment of antihaemophilic factor (factor VIII) by thrombin. *Nature (London)* 252, 404 (1974)
116. MARKWARDT F. Hirudin as an inhibitor of thrombin. *Methods in Enzymology* 19, 924 (1970)
117. RICK M.E. et HOYER L.W. Thrombin activation of factor VIII: the effects of inhibitors. *Brit.J.Haematol.* 36, 5B5 (1977)
118. COUNTS R.B., PASKELL S.L. et ELGEE S.K. Disulfide bonds and the quaternary structure of factor VIII/von Willebrand factor. *J.Clin.Invest.* 62, 702 (1979)
119. KERNOFF P.B.A. Affinity of factor VIII clotting activity for antigen detectable immunologically. *Nature New Biology* 244, 148 (1973)
120. RATNOFF O.D., SLOVER C.C. et POON M.C. Immunologic evidence that the properties of human antihemophilic factor (factor VIII) are attributes of a single molecular species, *Blood* 47, 657 (1976)
121. GREEN D. et POTTER E.V. Platelet-bound ristocetin aggregation factor in normal subjects and patients with von Willebrand's disease. *J.Lab.Clin.Med.* 87, 976 (1976)
122. BENETT J.C. et HABER E. Studies on antigen conformation during antibody purification. *J.Biol.Chem.* 238, 1362 (1963)

123. LAZARCHICK J. et HOYER L.W. The properties of immune complexes formed by human antibodies to factor VIII. *J.Clin.Invest.* 60, 1070 (1977)
124. LAVERGNE J.M., MEYER D. et al. Isolation of human antibodies to factor VIII. *Brit.J.Haematol.* 40, 631 (1978)
125. HOYER L.W. et BRECKENRIDGE R.T. Immunologic studies of antihemophilic factor. Properties of cross-reacting material. *Blood* 35, 809 (1970)
126. ALLAIN J.P. et FROMMEL D. Antibodies to factor VIII. I. Variations in stability of antigen-antibody complexes in hemophilia A. *Blood* 42, 437 (1973)
127. ZIMMERMAN T.S., de la POINTE L. et EDGINGTON T.S. Interaction of factor VIII antigen in hemophilic plasmas with human antibodies to factor VIII. *J.Clin.Invest.* 59, 984 (1977)
128. LAZARCHICK J. et HOYER L.W. Immunoradiometric measurement of the factor VIII procoagulant antigen. *J.Clin.Invest.* 62, 1048 (1978)
129. PEAKE I.R. et BLOOM A.L. Immunoradiometric assay of procoagulant factor VIII antigen in plasma and serum and its reduction in haemophilia. *Lancet* 1, 473 (1978)

## REMERCIEMENTS

Le présent travail a été effectué dans le laboratoire de coagulation et de fibrinolyse de l'hôpital cantonal de Bâle sous la direction du Professeur F.Duckert. Qu'il veuille accepter ici ma profonde gratitude pour son soutien moral et financier et ses précieux conseils durant tout le travail.

Mes chaleureux remerciements vont au Professeur D.Vonderschmitt d'avoir accepté de fonctionner comme directeur formel de thèse afin que le travail puisse être présenté à l'Université de Neuchâtel, aux Professeurs F.Bachmann et E.Stutz d'avoir accepté de fonctionner comme membres du jury,

Au personnel du laboratoire de coagulation et de fibrinolyse de m'accepter dans son ambiance de travail, en particulier à mademoiselle L.Hänni pour son aide technique,

Au Professeur C.M.Jackson pour sa gentillesse de m'avoir accordé un stage de 6 mois dans son laboratoire à St Louis, Missouri,

A Dr. C.Bounameaux pour son aide dans la correction du texte français,

A mon collègue E.Bissé pour de précieuses discussions,

Aux Drs. G.Marbet, R.Eichlisberger et H.Bounameaux pour une très bonne collaboration.