

50376
1985
101

50376
1985
101

UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

Année Universitaire 1984-1985

N° d'ordre : 1294

THÈSE

présenté à

L'UNIVERSITÉ DE LILLE I

pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE TROISIÈME CYCLE EN BIOCHIMIE

par

JAMAL EL YAMANI

**L' α_1 - ANTIPROTÉASE DES LAVAGES BRONCHO-ALVÉOLAIRES :
DÉTERMINATION IMMUNOLOGIQUE ET ACTIVITÉ FONCTIONNELLE
INTÉRÊT CLINIQUE**

Présenté le 12 juillet 1985, devant la Commission d'Examen

JURY

Président : J. MONTREUIL
Rapporteurs : S. BOUQUELET
J. MIZON
Examineur : J.J. LAFITTE



DOYENS HONORAIRES DE L'ANCIENNE FACULTE DES SCIENCES

MM. R. DEFRETIN, H. LEFEBVRE, M. PARREAU.

PROFESSEURS HONORAIRES DES ANCIENNES FACULTES DE DROIT
ET SCIENCES ECONOMIQUES, DES SCIENCES ET DES LETTRES

MM. ARNOULT, Mme BEAUJEU, BONTE, BROCHARD, CHAPPELON, CHAUDRON, CORDONNIER, CORSIN, DECUYPER, DEHEUVELS, DEHORS, DION, FAUVEL, FLEURY, P. GERMAIN, GLACET, GONTIER, HEIM DE BALSAC, HOCQUETTE, KAMPE DE FERJET, KOURGANOFF, LAMOTTE, LASSERRE, LELONG, Mme LELONG, LHOMME, LIEBAERT, MARTINOT-LAGARDE, MAZET, MICHEL, PEREZ, ROIG, ROSEAU, ROUELLE, SAVARD, SCHILTZ, WATERLOT, WIEMAN, ZAMANSKI.

PROFESSEUR EMERITE

M. A. LEBRUN.

ANCIENS PRESIDENTS DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET
TECHNIQUES DE LILLE

MM. R. DEFRETIN, M. PARREAU, J. LOMBARD, M. MIGEON.

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DE LILLE

M. J. CORTOIS.

PROFESSEURS - CLASSE EXCEPTIONNELLE

M. CONSTANT Eugène	Electronique
M. FOURET René	Physique du Solide
M. GABILLARD Robert	Electronique
M. MONTREUIL Jean	Biochimie
M. PARREAU Michel	Analyse
M. TRIDOT Gabriel	Chimie appliquée
M. VIVIER Emile	Biologie cellulaire
M. WERTHEIMER Raymond	Physique atomique et moléculaire

PROFESSEURS - 1ère CLASSE

M. BACCHUS Pierre	Astronomie
M. BEAUFILS Jean Pierre	Chimie physique
M. BIAYS Pierre	Géographie
M. BILLARD Jean	Physique du solide
M. BOILLY Bénoni	Biologie

M. BOUGHON Pierre	Algèbre
M. BOURIQUET Robert	Biologie végétale
M. BREZINSKI Claude	Analyse numérique
M. CELET Paul	Géologie générale
M. CHAMLEY Hervé	Géotechnique
M. COEURE Gérard	Analyse
M. CORDONNIER Vincent	Informatique
M. DEBOURSE Jean-Pierre	Gestion des entreprises
M. DYMENT Arthur	Mécanique
M. ESCAIG Bertrand	Physique du solide
M. FAURE Robert	Mécanique
M. FOCT Jacques	Métallurgie
M. GRANELLE Jean-Jacques	Sciences économiques
M. GRUSON Laurent	Algèbre
M. GUILLAUME Jean	Microbiologie
M. HECTOR Joseph	Géométrie
M. LABLACHE COMBIER Alain	Chimie organique
M. LACOSTE Louis	Biologie végétale
M. LAVEINE Jean-Pierre	Paléontologie
M. LEHMANN Daniel	Géométrie
Mme LENOBLE Jacqueline	Physique atomique et moléculaire
M. LHOMME Jean	Chimie organique biologique
M. LOMBARD Jacques	Sociologie
M. LOUCHEUX Claude	Chimie physique
M. LUCQUIN Michel	Chimie physique
M. MAILLET Pierre	Sciences économiques
M. PAQUET Jacques	Géologie générale
M. POUZET Pierre	Analyse numérique
M. PROUVOST Jean	Minéralogie
M. ROUSSEAU Jean-Paul	Physiologie animale
M. SALMER Georges	Electronique
M. SEGUIER Guy	Electrotechnique
M. STANKIEWICZ François	Sciences économiques
M. TILLIEU Jacques	Physique théorique
M. VIDAL Pierre	Automatique
M. ZEYTOUNIAN Radyadour	Mécanique

PROFESSEURS - 2ème classe

M. AL FAKIR Sabah	Algèbre
M. ALLAMANDO Etienne	Electronique et électrotechnique
M. ANCIAN Bernard	Spectrochimie
M. ANTOINE Philippe	Analyse
M. BART André	Biologie animale
Mme BATTIAU Yvonne	Géographie
M. BEGUIN Paul	Mécanique
M. BELLET Jean	Physique atomique et moléculaire
M. BERZIN Robert	Analyse
M. BKOUCHE Rudolphe	Algèbre
M. BODARD Marcel	Biologie végétale
M. BOIVIN Jean-Claude	Chimie minérale
M. BONNELLE Jean-Pierre	Catalyse
M. BOSCO Denis	Probabilités
M. BOUQUELET Stéphane	Biochimie structurale
M. BRASSELET Jean-Paul	Géométrie et topologie

M. BRIDOUX Michel	Chimie physique
M. BRUYELLE Pierre	Géographie
M. CAPURON Alfred	Biologie animale
M. CARREZ Christian	Informatique
M. CHAPOTON Alain	Electronique
M. COQUERY Jean-Marie	Psychophysiologie
Mme CORSIN Paule	Paléontologie
M. CORTOIS Jean	Physique nucléaire et corpusculaire
M. COUTURIER Daniel	Chimie organique
M. CRAMPON Norbert	Hydrogéologie et environnement
M. CROSNIER Yves	Electronique
Mlle DACHARRY Monique	Géographie
M. DAUCHET Max	Informatique
M. DEBRABANT Pierre	Géologie appliquée
M. DEGAUQUE Pierre	Electronique
M. DELORME Pierre	Physiologie animale
M. DE MASSON D'AUTUME Antoine	Sciences économiques
M. DEMUNTER Paul	Sociologie
M. DENEL JACQUES	Informatique
M. DE PARIS Jean-Claude	Analyse
M. DEPREZ Gilbert	Physique du solide et cristallographie
M. DERIEUX Jean-Claude	Microbiologie
Mlle DESSAUX Odile	Spectroscopie de la réactivité chimique
M. DEVRAINNE Pierre	Chimie minérale
M. DHAINAUT André	Biologie animale
Mme DHAINAUT Nicole	Biologie animale
M. DORMARD Serge	Sciences économiques
M. DOUKHAN Jean-Claude	Physique du solide
M. DUBOIS Henri	Spectroscopie hertzienne
M. DUBRULLE Alain	Spectroscopie hertzienne
M. DUBUS Jean-Paul	Spectrométrie des solides
M. DUPONT Christophe	Vie de la firme (I.P.A.)
Mme EVRARD Micheline	Chimie appliquée
M. FONTAINE Hubert	Dynamique des cristaux
M. FOUQUART Yves	Optique atmosphérique
M. FOURNET Bernard	Biochimie structurale
M. FRONTIER Serge	Ecologie numérique
M. GAMBLIN André	Géographie urbaine, industrielle et démographie
M. GLORIEUX Pierre	Physique moléculaire et rayonnements atmosphé- riques
M. GOBLOT Rémi	Algèbre
M. GOSSELIN Gabriel	Sociologie
M. GOUDMAND Pierre	Chimie Physique
M. GREMY Jean-Paul	Sociologie
M. GREVET Patrick	Sciences économiques
M. GUILBAULT Pierre	Physiologie animale
M. HENRY Jean-Pierre	Génie mécanique
M. HERMAN Maurice	Physique spatiale
M. HOUDART René	Physique atomique et moléculaire
M. JACOB Gérard	Informatique
M. JACOB Pierre	Probabilités et statistiques
M. JACQUILLAT Bertrand	Gestion
M. JEAN Raymond	Biologie des populations végétales
M. JOFFRE Patrick	Vie de la firme (I.P.A.)
M. JOURNEL Gérard	Spectroscopie hertzienne
M. KREMBEL Jean	Biochimie
M. LANGRAND Claude	Probabilités et statistiques

Mme LECLERCQ Ginette	Catalyse
M. LEFEVRE Christian	Pétrologie
Mlle LEGRAND Denise	Algèbre
Mlle LEGRAND Solange	Algèbre
Mme LEHMANN Josiane	Analyse
M. LEMAIRE Jean	Spectroscopie hertzienne
M. LE MAROIS Henri	Vie de la firme (I.P.A.)
M. LEROY Jean Marie	Chimie appliquée
M. LEROY Yves	Electronique, électrotechnique, automatique
M. LESENNE Jacques	Electrotechnique
M. LHENAFF René	Géographie
M. LOCQUENEUX Robert	Physique théorique
M. LOSFELD Joseph	Informatique
M. LOUAGE Francis	Electronique
M. MACKE Bruno	Physique moléculaire et rayonnements atmosphériques
M. MAHIEU Jean-Marie	Physique atomique et moléculaire
M. MAIZIERES Christian	Automatique
M. MESMACQUE Gérard	Génie mécanique
M. MESSELYN Jean	Physique atomique et moléculaire
M. MESSERLIN Patrick	Sciences économiques
M. MIGNOT Fulbert	Analyse numérique
M. MONTEL Marc	Physique du solide
M. MONTUELLE Bernard	Biologie et biochimie appliquées
Mme MOUNIER Yvonne	Physiologie des structures contractiles
Mme N'GUYEN VAN CHI Régine	Géographie
M. NICOLE Jacques	Chimie analytique
M. NOTELET Francis	Electronique, électrotechnique, automatique
M. PARSY Fernand	Mécanique
M. PASZKOWSKI Stéphan	Analyse numérique
Mlle PAUPARDIN Colette	Biologie physiologie végétales
M. PECQUE Marcel	Chimie organique
M. PERROT Pierre	Chimie appliquée
M. PERTUZON Emile	Physiologie animale
M. PETIT Francis	Chimie organique, minérale et analytique
M. PONSOLLE Louis	Chimie physique
M. PORCHET Maurice	Biologie animale
M. POVY Lucien	Automatique
M. RACZY Ladislas	Electronique
M. RAOULT Jean-François	Géologie structurale
M. RICHARD Alain	Biologie animale
M. RIETSCH François	Physique des polymères
M. ROGALSKI Marc	Analyse
M. ROY Jean-Claude	Psychophysiologie
M. SCHAMPS Joël	Spectroscopie moléculaire
Mme SCHWARZBACH Yvette	Géométrie
M. SIMON Michel	Sociologie
M. SLIWA Henri	Chimie organique
M. SOMME Jean	Géographie
Mlle SPIK Geneviève	Biochimie
M. STERBOUL François	Informatique
M. TAILLIEZ Roger	Génie alimentaire
M. THERY Pierre	Electronique, électrotechnique, automatique
M. TOULOTTE Jean-Marc	Automatique
M. TURREL Georges	Spectrochimie infrarouge et Raman
M. VANDORPE Bernard	Chimie minérale
M. VAST Pierre	Chimie inorganique
M. VERBERT André	Biochimie
M. VERNET Philippe	Génétique
M. VILETTE Michel	Résistance des matériaux

M. WALLART Francis
M. WARTEL Michel
M. WATERLOT Michel
M. WERNER Georges
M. WOSNIAK Michel
Mme ZINN Justin Nicole

Spectrochimie Infrarouge et Raman
Chimie Inorganique
Géologie générale
Informatique fondamentale appliquée
Hydrométallurgie
Algèbre

Ce travail a été effectué dans le laboratoire de Biochimie à la Faculté de Pharmacie de Lille II, sous la direction de Monsieur le Professeur J. MIZON.

Les lavages broncho-alvéolaires ont été effectués dans le département de Pneumologie (Service du Professeur LAFITTE) Hôpital Calmette de Lille. La composition cellulaire y a été déterminée.

A mes parents, et à mon oncle,

Grâce à vos sacrifices et à vos encouragements constants, me voici au terme de ce travail.

Je suis heureux aujourd'hui de vous le dédier en gage de mon affection.

A Anny, à mes frères et soeurs,

dont l'affection est pour moi un ardent soutien.

A mon président de jury,
Monsieur le Professeur J. Montreuil,
Professeur titulaire de la chaire de Chimie Biologique
à l'Université des Sciences et Techniques de Lille I,

Vous m'avez fait le très grand honneur d'accepter de présider le jury de cette thèse.

Au cours de mes études, vous m'avez fait bénéficier de votre grande culture scientifique et de la haute qualité de votre enseignement.

Veillez trouver dans cet ouvrage l'expression de mon profond respect et de mes sincères remerciements.

A mon directeur de thèse,
Monsieur le Professeur J. Mizon,
Professeur de Biochimie à la Faculté de Pharmacie de Lille II,
Directeur au Laboratoire du Comité pour le Développement de la
Médecine du Travail,

Tout au long de ces trois années passées dans votre laboratoire, vous m'avez guidé en suivant et en corrigeant ce mémoire.

Grâce à votre soutien, votre rigueur méthodologique et aux discussions journalières pour lesquelles vous étiez toujours disponible, ce travail de recherche a pu être mené à bien.

Soyez assuré de ma profonde gratitude.

A Monsieur S. Bouquelet, Professeur de Biochimie
à l'Université des Sciences et Techniques de Lille I,

C'est dans votre laboratoire que j'ai tout d'abord été initié à la
recherche, dans le cadre du D.E.A.

Vous m'avez fait maintenant l'honneur de bien vouloir juger le travail
accompli.

Veuillez y trouver une expression de ma profonde reconnaissance.

A Monsieur J.J. LAFITTE, Professeur de Pneumologie à la Faculté de
Médecine de Lille II,

Vous avez bien voulu spontanément siéger dans ce jury. La participation d'un clinicien donne à ce travail une nouvelle dimension, je vous remercie de l'accueil que vous nous avez réservé dans le Département de Pneumologie, Hôpital Calmette.

A Madame A. Hayem, Chargée de recherche au C.N.R.S.,
Unité 16 de l'I.N.S.E.R.M. Lille,

Vous avez eu la gentillesse de m'aider de vos connaissances approfondies et de votre haute compétence. Votre aide et vos conseils ont été précieux tout au long de la réalisation de ce travail.

Je suis heureux de pouvoir vous exprimer ici ma profonde gratitude.

Remerciements

Ce travail n'a pu se faire que grâce à la collaboration active et efficace des uns, aux conseils et encouragements des autres.

Je tiens à remercier particulièrement **Madame C. Mizon**,

Vous n'avez jamais hésité à me consacrer de votre temps. Vous m'avez aussi aidé à réaliser la mise en forme des figures et du mémoire. Conscient du travail que cela représente, je ne vous en suis que davantage redevable.

Madame B. Boniface, Maître assistant à la Faculté de Pharmacie de Lille II,

Vous avez participé à l'élaboration de toutes les études statistiques de ce travail. Vous m'avez aussi permis l'accès à l'ordinateur et vous avez eu la patience de m'initier à son utilisation. Votre aide m'a été précieuse. Pour vos conseils comme pour votre gentillesse, soyez assurée de ma profonde reconnaissance.

Mademoiselle M. DAVRIL, Chargée de recherche au C.N.R.S.,
Unité 16 de l'I.N.S.E.R.M. Lille,

Je vous remercie de votre aide et de vos conseils si utiles en enzymologie

Je remercie vivement **Madame D. Marko-Vercagne**, qui m'a donné l' α_1 -antiprotéase pure, utilisée comme témoin dans ce travail.

Je remercie aussi Mademoiselle S. Moulin, pour son aide efficace dans le domaine de la néphélométrie-laser.

Je tiens à remercier Monsieur D. COCHELARD, qui n'a pas hésité à me consacrer de son temps pour le traitement de texte. Sa gentillesse, sa bonne humeur et ses encouragements ont été une aide précieuse.

Je remercie enfin tous les membres du laboratoire de biochimie du Professeur Mizon, qui m'ont apporté aide, conseils, soutien et amitié.

Ce travail a fait l'objet :

* D'une communication orale et poster :

Immunologic measurements of α_1 PI in broncho-alveolar lavages.

HAYEM A., EL YAMANI J., GRESSIER B., MARKO-VERCAIGNE D. and MIZON J.

Symposium sur les liquides de lavage broncho-alvéolaires. Washington

(U.S.A), 22-25 Mai 1984.

* D'une publication :

Alpha₁-protease inhibitor in broncho-alveolar lavage fluids:

immunological determination and fonctionnal activity.

EL YAMANI J., HAYEM A., LAFITTE J. J., GRESSIER B. and MIZON J.

Soumise au comité de lecture de la revue: Bull. europ. physiopath. resp.

ABREVIATIONS UTILISEES

LBA	liquide de lavage broncho-alvéolaire.
α_1 AP	α_1 -antiprotéase (α_1 -antitrypsine) ou α_1 -protease-inhibitor.
PM	poids moléculaire.
INL	immunonéphélémétrie-laser
EID	électroimmunodiffusion
PMSF	phénylméthylsulfonyl fluorure
Suc-(Ala) ₃ -pNA	N-succinyl-L-(alanyl) ₃ -paranitroanilide
NMP	N-méthylpyrrolidone
Tris	Tris (hydroxyméthyl) aminométhane

INTRODUCTION	1
PREMIERE PARTIE: GENERALITES	3
1 LE LAVAGE BRONCHOALVEOLAIRE	4
1.1 OBTENTION	5
1.2 COMPOSITION	6
1.2.1 Constituants cellulaires	6
1.2.2 Constituants solubles	8
1.2.3 Expression des résultats	9
1.3 INTERET CLINIQUE	10
1.3.1 Maladies interstitielles	11
1.3.2 Maladies infectieuses	13
1.3.3 Maladies destructives	13
2 LES ANTIPROTEASES DU LAVAGE BRONCHOALVEOLAIRE	16
2.1 L' α_1 -ANTIPROTEASE	16
2.1.1 Purification	16
2.1.2 Structure	16
2.1.3 Polymorphisme	17
2.1.4 Biosynthèse et sécrétion	18
2.1.5 Fonction	21
2.1.6 Mécanisme	22
2.1.7 Effet des oxydants	25
2.1.8 Présence dans les alvéoles	25
2.2 LES AUTRES ANTIELASTASES DU POUMON	30
2.2.1 Les inhibiteurs de faible poids moléculaire	30
2.2.2 Leur rôle physiologique	34
2.2.3 L' α_2 -macroglobuline	35

DEUXIEME PARTIE: DOSAGE DE L' α_1 -ANTIPROTEASE (TRAVAUX PERSONNELS)	38
1 DOSAGES IMMUNOLOGIQUES DE L' α_1 -ANTIPROTEASE	39
1.1 INTRODUCTION	39
1.2 DIFFERENTES TECHNIQUES UTILISEES	39
1.2.1 Les méthodes en milieu gélifié	40
1.2.2 Les méthodes avec marqueurs	40
1.2.3 Les méthodes en milieu liquide	41
1.3 DOSAGE DE L' α_1 -ANTIPROTEASE DANS LES LAVAGES BRONCHO- ALVEOLAIRES	43
1.3.1 Problèmes posés par ces dosages	43
1.3.2 Immunonéphélométrie-laser	46
1.3.3 Electroimmunodiffusion	52
1.4 DOSAGE DES FORMES MODIFIEES PAR INL ET EID	60
1.5 APPLICATION DES DEUX TECHNIQUES AU DOSAGE DE L' α_1 AP DANS LE LBA	66
1.6 CONCLUSION	68
2 DOSAGE DE LA FRACTION FONCTIONNELLE DE L' α_1 -ANTIPROTEASE	71
2.1 GENERALITES	71
2.1.1 Principe général du dosage de l' α_1 AP fonctionnelle	71
2.1.2 Dosage de l' α_1 AP fonctionnelle dans le sérum	71
2.1.3 Dosage de l'activité inhibitrice de l' α_1 AP dans le LBA	72

2.2 METHODE AUTOMATIQUE SUR ABA 100	75
2.2.1 Description de l'appareil	75
2.2.2 Conditions opératoires	75
2.2.3 Les différents stades de la mise au point de la méthode	76
2.2.4 Application aux LBA	83
2.2.5 Critères de qualité de la méthode de dosage de l' α_1 AP fonctionnelle	89
3 ETUDE GENERALE DES DIFFERENTS LBA	92
3.1 L' α_1 AP IMMUNOREACTIVE	92
3.2 POURCENTAGE D' α_1 AP FONCTIONNELLE PAR RAPPORT A L' α_1 AP IMMUNOREACTIVE	96
3.3 DISCUSSION	108
4 ETUDE PARTICULIERE DES LBA	113
4.1 SARCOIDOSE	113
4.2 PNEUMOPATHIES D'HYPERSENSIBILITE	113
4.3 FIBROSE	114
4.4 PNEUMOCONIOSE	114
4.5 CONNECTIVITES	115
4.6 POU MON IRRADIE	116
4.7 PNEUMOPATHIES INFECTIEUSES	116
4.8 DETRESSE RESPIRATOIRE DE L'ADULTE	117
CONCLUSION	120

INTRODUCTION

Dans de nombreuses affections , le rôle pathogène des protéases est évident. Au niveau pulmonaire, les élastases et en particulier l'élastase leucocytaire jouent un rôle essentiel dans l'agression tissulaire conduisant à la destruction des parois alvéolaires.

L' α_1 -antiprotéase (α_1 AP, appelée autrefois α_1 -antitrypsine) est l'antiélastase la plus anciennement connue. Son rôle physiologique in situ peut être évalué par l'étude des liquides de lavage bronchoalvéolaire (LBA).

Après avoir rappelé l'intérêt clinique de cette méthode d'exploration, nous avons fait le point des connaissances acquises concernant l' α_1 AP et son rôle au niveau de l'appareil respiratoire.

Nous décrirons ensuite les problèmes que nous avons rencontrés pour la mise au point de méthodes de dosage immunologique et enzymatique de l' α_1 AP présente dans les LBA. Les résultats obtenus par l'analyse d'échantillons prélevés dans une population de patients atteints d'affections respiratoires ont été interprétés en fonction des connaissances acquises dans le mécanisme de survenue des diverses pneumopathies.

GENERALITES

1 LE LAVAGE BRONCHOALVEOLAIRE

Il y a 50 ans, le lavage bronchoalvéolaire (LBA) a été proposé comme moyen thérapeutique destiné à libérer les voies aériennes distales d'une accumulation anormale de matériel.

Des travaux expérimentaux, puis des essais chez l'homme ont montré que le LBA permet aussi le recueil de matériel alvéolaire et l'étude des populations cellulaires, normalement, essentiellement constituées de macrophages.

Celui-ci était au départ obtenu à l'aide d'un bronchoscope rigide, introduit dans une branche primaire ou secondaire de l'arbre bronchial. L'apparition, depuis 10 ans, de la fibroscopie a facilité l'obtention de LBA. Cette méthode s'est largement développée dans un but diagnostique et comme moyen d'investigation biologique; elle a permis une énorme avancée dans la compréhension du rôle des systèmes inflammatoire et immunologique du poumon humain sain et malade avec un minimum de risques et peu de gêne pour les sujets. La sûreté de cette méthode a été testée chez des volontaires en bonne santé et chez des patients ayant une maladie interstitielle; aucune complication majeure n'a été signalée.

Bien que le lavage ne recouvre que les cellules et les constituants solubles présents sur la surface épithéliale du tractus respiratoire inférieur, la comparaison des résultats obtenus avec ceux tirés de l'étude des biopsies pulmonaires chirurgicales à thorax ouvert a généralement montré que ses constituants sont représentatifs des systèmes inflammatoires et immunologiques des structures alvéolaires.

L'utilisation de ces techniques permet d'obtenir des matériels suffisants chez des individus normaux, pour caractériser non seulement les types de cellules et les constituants présents mais aussi leur fonction.

De telles observations ont été utiles pour définir les capacités inflammatoires et immunologiques du poumon normal et donner une base d'étude pour le poumon malade. Ces méthodes de lavage ont été utilisées pour caractériser les pneumopathies destructives, infectieuses, néoplasiques et interstitielles, pour mieux comprendre leur mécanisme et leur évolution et ainsi permettre un meilleur choix thérapeutique pour ces différentes affections.

1.1 OBTENTION DU LBA

Après anesthésie locale des voies respiratoires supérieures et de la trachée, le fibroscope est introduit par le nez ou par la bouche dans l'arbre trachéobronchique, et son extrémité est bloquée dans une branche segmentaire ou sous-segmentaire. On utilise le plus souvent, pour des raisons de plus grande facilité technique, la lingua (partie basse du lobe supérieur du poumon gauche), mais la plupart des segments peuvent être explorés.

Dans les conditions décrites par HUNNINGHAKE et COLL (39), on instille doucement à travers le fibroscope bouché, 20 ml de sérum physiologique stérile, tiédi à 37° C et non tamponné. Le liquide est aussitôt réaspiré sous une dépression de 50 à 100 mm de Hg dans un flacon en plastique ou en verre siliconé de façon à minimiser la perte de macrophages par adhérence aux parois; celui-ci est maintenu dans de la glace. Ce procédé est répété 5 fois, un volume total de 100 ml étant habituellement utilisé (mais occasionnellement, on peut utiliser jusqu'à 300 ml de liquide si cela est nécessaire pour obtenir un plus grand nombre de cellules chez un patient particulier).

En général, le liquide recueilli représente 40 à 60 % du volume instillé, mais cette proportion est moindre en cas de syndrome obstructif.

Les volumes de liquides utilisés varient largement d'un auteur à l'autre et ceci pourrait modifier les résultats du lavage, comme le montre l'étude des cellules et des composants biochimiques des LBA, récupérés séparément après injection successive de 4 échantillons de 60 ml d'eau physiologique dans une branche sous-segmentaire du lobe médian droit. Des sujets normaux ont été volontaires pour le lavage. La numération des cellules chez les sujets non fumeurs et fumeurs suggère une élution des macrophages adhérents à la surface alvéolaire non expliquée par la simple dilution des échantillons. Les concentrations des protéines, des carbohydrates, des lipides et du potassium diminuent dans les échantillons successifs, mais selon un modèle cinétique propre à chaque constituant. Les valeurs mesurées pour ces composants peuvent donc être significativement différentes pour une petite (120 ml) ou une grande (240 ml) quantité de liquide de lavage (19).

1.2 COMPOSITION DES LBA

Le LBA recueilli chez le sujet normal (non fumeur) selon (39) contient de 5 à $10 \cdot 10^6$ cellules (macrophages $93 \pm 5\%$, lymphocytes $7 \pm 1\%$, polynucléaires neutrophiles, éosinophiles et cellules basophiles $< 1\%$) et 1 à 10 mg de protéines, représentées essentiellement par l'albumine.

1.2.1 Constituants cellulaires

a-Les macrophages alvéolaires

Les macrophages alvéolaires font partie du système des phagocytes mononuclés.

Chez l'animal, les macrophages prolifèrent dans l'interstitium alvéolaire et migrent ensuite vers la surface épithéliale. On présume que, chez l'homme, ces cellules migrent à travers les jonctions épithéliales, mais cette migration ne semble pas avoir été définie de façon précise.

Les macrophages alvéolaires interviennent dans la phagocytose particulaire, au niveau de l'arbre aérien. Celle-ci s'exerce dans des délais rapides et fait face constamment à une agression particulaire, infectieuse ou non.

Les macrophages alvéolaires jouent à l'égard des polynucléaires neutrophiles le rôle d'activateur pour amplifier et prolonger la défense phagocytaire. A cet effet, ils peuvent libérer un facteur chimiotactique pour les neutrophiles. Dans d'autres circonstances, les macrophages jouent un rôle dans l'activation des lymphocytes T et par conséquent contribuent à la formation des granulomes .

Bien que les macrophages alvéolaires soient capables de libérer des médiateurs qui peuvent déranger les structures alvéolaires, ils ne le font que s'ils sont activés par des stimuli exogènes, c'est-à-dire que le nombre de cellules paraît un facteur moins important que leur état d'activation.

b- Les lymphocytes alvéolaires

Des observations morphologiques du poumon humain normal (39) suggèrent que, dans les structures alvéolaires, les lymphocytes se trouvent dans l'interstitium et sur la surface épithéliale. Il doit y avoir un mouvement des lymphocytes du sang périphérique et des formations lymphoïdes vers les structures alvéolaires. On tend actuellement à estimer que 80 à 90 % des lymphocytes, même chez le sujet normal sont des cellules T, les proportions respectives des B et nuls étant encore discutées.

Normalement, environ 0,1 à 0,3 % des lymphocytes B sécrètent des immunoglobulines incluant l'IgG, l'IgM, l'IgA et l'IgE. La proportion de B-lymphocytes, au niveau pulmonaire, sécrétant des IgA plutôt que des IgG ou des IgM est plus importante que dans le sang circulant.

c- Les polynucléaires

Chez les personnes en bonne santé, les neutrophiles représentent une petite fraction (< 1%) de la population des cellules alvéolaires du LBA. Les éosinophiles sont en général absents chez ces sujets.

Mais, dans les poumons de certains malades, parmi lesquels des patients atteints de fibrose pulmonaire idiopathique, les neutrophiles peuvent s'accumuler et induire des lésions au niveau du parenchyme alvéolaire. Les éosinophiles participent à la réaction inflammatoire: lors des pneumopathies interstitielles, ils peuvent libérer des médiateurs capables de léser aussi les cellules du parenchyme pulmonaire et la matrice interstitielle.

1.2.2 Constituants solubles

Les constituants solubles présents dans le LBA proviennent essentiellement d'un processus de diffusion passive à partir des liquides interstitiels ou du plasma. Cette diffusion dépend théoriquement du poids moléculaire du constituant étudié, de la qualité de la membrane à traverser et des gradients de pression et de concentration de chaque côté de cette membrane. Interviennent de plus, le transport actif de composants plasmatiques et une sécrétion locale.

L'analyse de ces constituants chez des sujets normaux a été faite par LOW et coll (50).

a- Lipides

Le composant lipidique principal est la phosphatidylcholine (84 % des phospholipides totaux), le phosphatidylglycérol représente 12,4 % de ces derniers; on note aussi la présence de diphosphatidylglycérol, de phosphatidylinositol, d'acide phosphatidique, de la phosphatidylsérine et de la phosphatidyléthanolamine.

b- Carbohydrates

Les 4/5 des carbohydrates trouvés dans les LBA ont un poids moléculaire inférieur à 10.000 daltons et 1/5 de cette fraction correspond au glucose libre.

c- Composants protéiniques

Selon LOW et coll (50), la concentration des protéines totales est de 31 à 136 mg/l chez des sujets sains. Celles-ci proviennent essentiellement

du plasma par diffusion.

Les structures alvéolaires sont plus perméables aux protéines de faible poids moléculaire, comme la sérum albumine (SA) qui représente environ 50% des protéines présentes dans le LBA.

Les immunoglobulines, IgG, IgA et IgE, sont présentes chez le sujet normal tandis que l'IgM n'est pas détectée. On trouve aussi des petites quantités de plusieurs composants du complément.

Les enzymes trouvés dans le LBA comprennent des glycosidases, des estérases, des phospholipases A et des protéases; selon HUNNINGHAKE et coll (39), des protéases neutres et acides sont présentes dans le LBA. De même, une activité chymotrypsique peut être mise en évidence (33). Par contre, le LBA des sujets normaux ne contient ni élastase ni collagénase (33).

L'antiprotéase sérique principale, l' α_1 AP, est largement présente dans le LBA. Au contraire, l' α_2 -macroglobuline (α_2 M) ne contribue que pour une faible part à la protection de l'alvéole contre l'élastase. Chez les sujets normaux, l' α_2 M est à peine détectable dans le LBA.

Plus récemment, un inhibiteur acido-stable de faible poids moléculaire (10.500) a été isolé du mucus bronchique. Il est produit directement par les cellules épithéliales du tractus respiratoire supérieur.

1.2.3 Expression des résultats

L'interprétation des résultats des examens pratiqués sur le LBA est conditionnée par leur mode d'expression. En effet, le liquide injecté n'est pas récupéré en totalité et le pourcentage de récupération varie d'un sujet à l'autre: celui-ci peut être diminué chez les fumeurs ou lors de diverses affections. Il est ainsi difficile d'exprimer les résultats par unité de volume de LBA; il en est de même si ceux-ci sont rapportés à la totalité du liquide récupéré. Pour résoudre ce problème, plusieurs solutions ont été proposées.

BAUGHMAN et coll (6) ont utilisé très récemment le bleu de méthylène, que l'on sait ne pas être absorbé lors du lavage pulmonaire et qui est ajouté à faible concentration au liquide introduit; celle-ci est déterminée dans le volume instillé puis dans le LBA aspiré; un facteur de dilution du liquide introduit peut ainsi être calculé.

Plus fréquemment, les résultats sont exprimés sous forme d'un rapport de concentration, en se référant à un standard supposé présent à concentration constante, au niveau alvéolaire.

Ainsi, le potassium a été proposé comme substance de référence. Cependant, le dosage du potassium dans 4 échantillons recueillis successivement lors du même lavage, réalisé chez des sujets sains, montre que la diminution de sa concentration est plus lente que celle des autres constituants du LBA. Ceci peut être expliqué par la libération de potassium à partir de cellules endommagées ou par sa diffusion à partir du plasma.

La sérum-albumine a été largement acceptée comme standard pour les autres protéines, sa présence dans le LBA étant expliquée essentiellement par un mécanisme de diffusion passive. Cependant FICK et coll (22) ont noté une diminution du taux d'albumine dans les LBA de patients atteints de mucoviscidose : celle-ci pourrait être en partie détruite. De même, BELL et coll (8) ont signalé une diminution de la concentration de l'albumine du LBA sans que celle d'autres protéines de taille comparable soit affectée en cas de pneumopathie chronique.

Dans ces conditions, il pourrait être préférable d'exprimer les résultats en fonction de la concentration en protéines totales .

1.3 INTERET CLINIQUE

Le recueil du matériel alvéolaire constitue un moyen privilégié d'étude des mécanismes biologiques de bon nombre d'affections respiratoires; celles-ci ont été classées par HUNNINGHAKE et coll (39) en 4 catégories.

-Les affections interstitielles, qui forment un groupe hétérogène de maladies chroniques du tractus respiratoire inférieur, caractérisées par une inflammation, un épaissement de la paroi alvéolaire, et une perte des unités fonctionnelles alvéolo-capillaires.

-Les maladies infectieuses, correspondant aux troubles chroniques et aigus dûs aux micro-organismes.

-Les maladies destructives, c'est-à-dire caractérisées par une perte des structures alvéolaires, parmi lesquelles l'emphysème.

-Et les maladies néoplasiques, c'est-à-dire les tumeurs pulmonaires primitives.

1.3.1 Les maladies pulmonaires interstitielles

Les maladies pulmonaires interstitielles forment un groupe d'environ 130 affections différentes, chacune étant caractérisée par une alvéolite chronique, c'est-à-dire une augmentation du nombre de cellules effectrices inflammatoires et immuno-compétentes dans le parenchyme pulmonaire. Chez de nombreux patients, l'alvéolite entraîne un dérangement des structures alvéolaires, incluant une fibrose de l'interstitium adjacent. S'ils ne sont pas contrôlés, ces processus inflammatoires et immuns vont perturber la structure du parenchyme pulmonaire de sorte que les alvéoles seront incapables d'assurer les échanges gazeux. C'est pourquoi il est intéressant d'évaluer l'alvéolite des maladies pulmonaires interstitielles et de comprendre les processus qui commandent la forme et l'intensité de chaque maladie.

Une classification de ces affections peut être basée sur les différentes formules cytologiques obtenues par lavage bronchoalvéolaire et on distingue ainsi différents types.

-Le premier est le type lymphocytaire, caractérisé par une augmentation du pourcentage des lymphocytes au-delà de 15%. Ce type est observé surtout dans la sarcoidose et les pneumopathies d'hypersensibilité. La sarcoïdose, affection de loin la plus fréquente parmi celles comportant une alvéolite lymphocytaire, a été de ce fait, la mieux explorée. C'est une maladie granulomateuse diffuse, de cause inconnue. De nombreux organes peuvent être affectés mais le tractus respiratoire inférieur est le site le plus fréquemment impliqué avec une évolution possible vers une insuffisance respiratoire grave.

L'étude cytologique du LBA montre une augmentation en nombre de T-lymphocytes, alors que leur taux dans le sang périphérique est diminué. L'évaluation des sous-populations de T-lymphocytes à l'aide d'anticorps monoclonaux, spécifiques de chacune d'entre elles a montré, dans les sarcoidoses très actives, une augmentation des T-helpers et un abaissement des T-suppresseurs dans le LBA, les rapports entre ces 2 populations restant inchangés dans le sang.

Les T-lymphocytes activés libèrent des lymphokines, en particulier un facteur chimiotactique des monocytes et un facteur d'activation des macrophages. Ces phagocytes mononucléés seront à l'origine de la formation des granulomes.

-Le second type cytologique est caractérisé par une augmentation des neutrophiles au-delà de 5 à 6 % (parfois beaucoup plus élevée). L'alvéolite à neutrophiles caractérise les processus fibrogènes : fibroses idiopathiques diffuses, fibroses associées aux connectivites ou fibroses familiales. Elle peut aussi s'associer aux stades tardifs d'affections telles que la sarcoidose, la pneumoconiose, et l'histiocytose X. L'augmentation en pourcentage des neutrophiles est associée à une hypercellularité globale marquée. Les macrophages, augmentés en nombre et activés, produisent un facteur chimiotactique attirant spécifiquement les neutrophiles qui migrent alors vers l'alvéole et libèrent des enzymes, notamment une collagénase, qui désorganisent le collagène et l'interstitium

pulmonaire. Cette désorganisation induit une resynthèse anarchique de collagène par les fibroblastes stimulés eux aussi par un facteur de croissance sécrété par les macrophages.

-Un troisième type de formule est caractérisée par la présence d'un pourcentage accru d'éosinophiles. Celui-ci peut atteindre 10 à 50 % et plus dans les pneumonies à éosinophiles et dans l'asthme.

1.3.2 Les maladies infectieuses

Dans une étude séquentielle des populations cellulaires présentes dans le poumon, lors de l'évolution des pneumonies bactériennes, TONNEL et coll (77) ont montré que les neutrophiles étaient prédominants, lors de la phase aiguë. Mais on n'a pas trouvé de neutrophiles dans les poumons de malades atteints d'affections pulmonaires chroniques telles que la tuberculose. Le liquide de lavage de patients atteints de cette affection révèle une accumulation de lymphocytes dans les structures alvéolaires, en particulier des T-lymphocytes.

Dans des cas particuliers, l'examen bactériologique ou parasitologique peut apporter une aide importante pour le diagnostic de maladies infectieuses. Le LBA représenterait le meilleur moyen d'identification, chez des sujets immunodéprimés, d'agents infectieux opportunistes, cytomégalo virus, mycobactéries, aspergillus, etc...

1.3.3 Les maladies destructives

Au cours de ces dernières années, l'intérêt porté au rôle des enzymes protéolytiques et de leurs inhibiteurs dans la pathogénie de l'emphysème a grandi rapidement. Ceci provient de deux observations faites dans les années 60 :

1- La reconnaissance que les sujets présentant un déficit héréditaire en α_1 AP, sont prédisposés à l'emphysème pulmonaire.

2- La démonstration qu'un enzyme protéolytique (papaine) est capable de produire des lésions semblables à celles de l'emphysème chez l'animal.

Au niveau du poumon sain, les protéases sont neutralisées par les antiprotéases, présentes en excès. Au contraire, un déséquilibre en faveur des protéases peut expliquer la survenue de l'emphysème (65) .

La maladie destructive intervient donc lorsque les enzymes sont présents à concentration supérieure à celle des inhibiteurs, de sorte qu'ils restent actifs dans le poumon, et provoquent la destruction des tissus.

Les enzymes élastolytiques ont été particulièrement étudiés en raison du rôle joué par l'élastase au niveau pulmonaire.

Les leucocytes neutrophiles contiennent deux protéases, actives à pH neutre, stockées dans les granules azurophiles.

L'élastase est libérée par le neutrophile durant la phagocytose; elle est la principale responsable de la destruction alvéolaire (expérimentalement, un emphysème peut apparaître après son instillation chez l'animal).

La cathepsine G qui présente une activité chymotrypsine-like est aussi produite par les neutrophiles. Elle ne semble cependant jouer qu'un rôle mineur.

Les macrophages pourraient contenir une élastase qui a les propriétés d'une sérine-protéase. Celle-ci proviendrait du neutrophile, elle serait absorbée par l'intermédiaire de récepteurs membranaires et libérée ultérieurement. Le macrophage produit aussi une élastase qui a les propriétés d'une métalloprotéase (Ca^{++} -dépendante); elle n'est pas stockée mais sécrétée par les macrophages activés.

L'équilibre élastase-antiélastase peut être perturbé pour plusieurs raisons, de sorte que les élastases prédominent. Le taux d'élastase dans le poumon peut augmenter, l'écran anti-élastase peut diminuer ou il peut y avoir une combinaison des deux facteurs. Ce mécanisme a été récemment appliqué à d'autres maladies pulmonaires. Cependant, c'est pour la bronchite chronique et l'emphysème qu'il est le mieux établi.

L'étude des antiprotéases du LBA est donc particulièrement intéressante pour mieux comprendre les mécanismes physiologiques de protection du tissu pulmonaire.

2 LES ANTIPROTEASES DU LAVAGE BRONCHOALVEOLAIRE

La présence de l' α_1 AP dans le LBA a été signalée en 1974 par REYNOLDS et coll (60). Celle-ci semble jouer un rôle essentiel dans la protection de la muqueuse respiratoire. Les données essentielles concernant cet inhibiteur seront donc rappelées dans ce travail.

Les autres inhibiteurs de sérine-protéases susceptibles d'être retrouvés dans le LBA seront ensuite présentés.

2.1 L' α_1 ANTIPROTEASE

2.1.1 Purification de l' α_1 AP

Celle-ci est généralement obtenue à partir du plasma. La séparation de l' α_1 AP et de la sérum-albumine, qui ont un comportement assez voisin dans différents protocoles de purification, est le problème le plus difficile à résoudre. Elle a été effectuée en utilisant, soit une chromatographie d'affinité sur ConA-Sépharose (81), qui tire partie de la nature glycoprotéique de l' α_1 AP, soit une chromatographie d'affinité sur thiol-Sépharose (47) basée sur la présence d'un groupement thiol libre dans l' α_1 AP réduite. Enfin, l'albumine peut être aussi absorbée sélectivement par immunoaffinité, à l'aide d'anticorps antialbumine ou par affinité sur Blue-Sépharose (78).

2.1.2 Structure de l' α_1 AP

C'est une glycoprotéine qui a un PM d'environ 54.000 et qui est constituée d'une seule chaîne polypeptidique. La structure primaire, entièrement connue (15), est constituée par 394 résidus d'acides aminés, avec un acide glutamique en position N-terminale et une lysine en position C-terminale. Elle ne comporte qu'un résidu de cystéine (en position 232)

situé à la surface de la molécule. Ce dernier peut s'engager dans un pont disulfure avec le glutathion ou avec d'autres protéines plasmatiques qui ont une cystéine libre et accessible.

La copule glucidique représente 12 % du poids de la molécule. Elle est constituée de 3 chaînes glycaniques de type N-acétyllactosaminique en position 46, 83 et 247.

L' α_1 AP humaine est présente chez le même sujet sous plusieurs formes différentes : trois bandes principales et plusieurs bandes mineures iso-inhibitrices sont séparées en isoélectrofocalisation. Cette microhétérogénéité a été expliquée d'abord par la différence dans le contenu d'acide sialique des chaînes glycaniques. Cependant, un traitement de l' α_1 AP par la neuraminidase n'altère pas de façon substantielle le schéma des bandes sur les gels d'isoélectrofocalisation sauf pour le déplacer vers les points isoélectriques les plus hauts.

La structure glycanique des trois bandes principales a été déterminée par VAUGHAN et coll (81). Chacune des trois bandes contient trois chaînes glycaniques de type N-acétyllactosaminique, mais l'une de ces bandes comporte trois chaînes biantennées (isoforme I), la deuxième, deux chaînes biantennées et une chaîne triantennée (isoforme II) et la troisième, une chaîne biantennée et deux chaînes triantennées (isoforme III).

Le pourcentage de ces différentes formes (I, II, III) est relativement constant chez des sujets sains, dans des proportions 5, 4, 1 respectivement. Un changement marqué survient dans le cas d'une inflammation avec une augmentation des isoformes II et III, contenant des chaînes glycaniques triantennées.

2.1.3 Polymorphisme de l' α_1 AP

Dans la population générale, d'un sujet à l'autre, les formes d' α_1 AP peuvent être différentes. Le polymorphisme génétique est exprimé par le système Pi (protéase-inhibiteur), représenté par le locus Pi multi-allélique à transmission autosomique co-dominante. Plus de 20 allèles différents

ont été mis en évidence; ils ont été nommés par des lettres, suivant leur mobilité électrophorétique en isoélectrofocalisation (79). Conventionnellement, l'allèle le plus courant ayant une mobilité électrophorétique intermédiaire est appelé M. Des allèles plus rapides (F), plus lents (S) et plus lents encore (Z) ont été découverts.

Les sujets portant le phénotype le plus courant M, homozygotes MM, ont une concentration en α_1 AP de l'ordre de deux grammes par litre de plasma.

D'autres allèles, ne conduisant pas à une diminution de la concentration plasmatique de l' α_1 AP, ont été décrits et désignés par diverses lettres de l'alphabet en fonction de leur rapidité de migration en isoélectrofocalisation. Les plus fréquents sont représentés par les lettres F, I, V et sont transmis à l'état homozygote (FF) ou hétérozygote (FM), (IM) ou (MV). Quelques allèles donnent des phénotypes caractérisés par une diminution de la concentration plasmatique de l' α_1 AP, par exemple FiZ et FiS.

Les sujets de phénotype Z, homozygotes ZZ, ont une concentration inférieure à 200 mg par litre de plasma. Cette protéine Z diffère de la M par la substitution d'un seul acide aminé (342, Glu \rightarrow Lys). Sa fréquence dans la population européenne est de l'ordre de 1 %.

La protéine S diffère aussi de la M par la substitution d'un acide aminé (264, Glu \rightarrow Val). Sa concentration dans le plasma est d'environ 1,2 g/l, sa fréquence est de l'ordre de 6 %.

La substitution de l'acide glutamique de ces variants implique une migration en isoélectrofocalisation plus lente que celle de Fi MM.

2.1.4 Biosynthèse et sécrétion de l' α_1 AP

La structure moléculaire du gène chromosomal codant pour l' α_1 AP est montrée dans la figure 1 : le gène est formé de 10.000 paires de bases, réparties en 5 exons, séparés par 4 introns.

La biosynthèse de l' α_1 AP a été étudiée par plusieurs auteurs (13,28, 30,31,82) le mRNA correspondant à l' α_1 AP a été isolé par les méthodes conventionnelles (immunoprécipitation des polysomes). Sa traduction dans

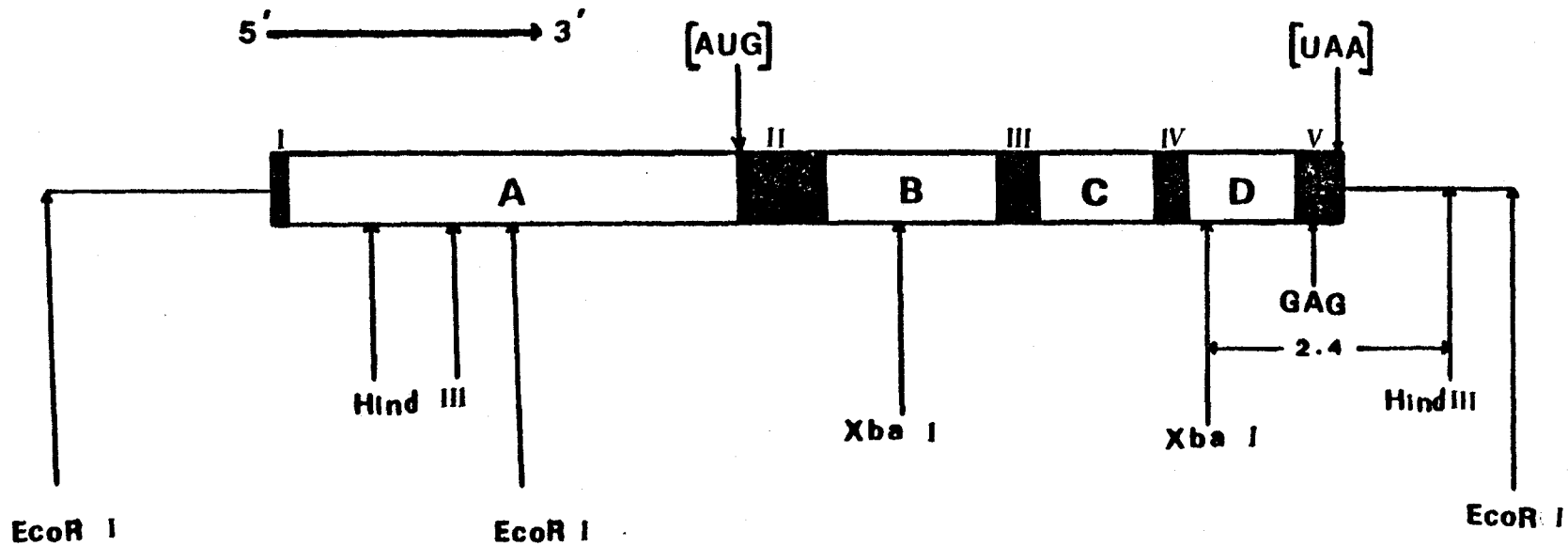


Figure 1 : Les régions codant l'exon sont représentées en hachures, et les introns par des blancs. L'orientation horizontale 5'→3' du gène est montrée par la flèche au dessus du gène. Les positions relatives du codon de départ AUG et du codon de terminaison UAA du gène sont aussi montrées.

La localisation du site de mutation impliquée dans la déficience Pi z est indiquée par le codon triplet GAG et la flèche montre sa position relative dans l'exon V.



une culture primaire d'hépatocytes de rat a mis en évidence un précurseur de l' α_1 AP qui présente, en position N-terminale, un peptide signal de 24 résidus d'acides aminés. La séquence de ce peptide, montre classiquement une richesse particulière en acides aminés hydrophobes.

Un précurseur intracellulaire nouvellement synthétisé, de PM 49.000 estimé par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS, peut être isolé des hépatocytes par immunoprécipitation. Il est déglycosylé par l'endo- β -N-acétylglucosaminidase H, les chaînes oligosacharridiques sont donc de type oligomannosidique.

Une deuxième forme de l' α_1 AP peut être isolée. Elle présente un PM de 54.000 et elle n'est pas sensible à l'endoglycosidase H. Par contre, elle est modifiée par la neuraminidase; elle est marquée, après incubation préalable en présence du galactose [3 H]. Ces résultats montrent que cette forme, qui présente des chaînes glycaniques de type N-acétyllactosaminique sialylées, correspond à l' α_1 AP sécrétée.

En présence de Tunicamycine, qui bloque la glycosylation de la protéine dès sa première étape, une α_1 AP, de PM apparent 41.000, a été trouvée dans les cellules et dans le milieu extracellulaire.

La différence de PM entre α_1 AP glycosylée (54.000) et non glycosylée, est de 13.000, ce qui représente 24 % , soit deux fois plus que le pourcentage de sucres présent dans l' α_1 AP. Cette discordance serait due aux erreurs possibles dans la détermination du PM des glycoprotéines par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS.

Chez les sujets FiZ, la déficience en α_1 AP est due au manque de sécrétion de l' α_1 AP qui s'accumule dans le foie, vraisemblablement au niveau du réticulum endoplasmique (25).

On a pensé tout d'abord que cette α_1 AP diffère de l' α_1 AP M par sa teneur plus faible en acide sialique, par déficience en sialyl-transférase (25,79). D'autres chercheurs (15) suggèrent que la molécule Z, accumulée dans le foie, présente des chaînes glycaniques de type oligomannosidique, qui n'ont pas subi le processus de maturation habituel.

Il y aurait donc blocage de la maturation habituelle ou du transport de la protéine mutée dans l'hépatocyte.

La substitution Glu → Lys, retrouvée dans l' α_1 AP Z, correspond à une mutation du DNA par transition G → A au niveau du cinquième exon.

La localisation de cette anomalie permet le diagnostic prénatal chez les sujets à risque, par hybridation de fragments du gène obtenu à l'aide des endonucléases de restriction, avec des oligonucléotides de synthèse marqués. Cet examen est pratiqué sur le DNA extrait des cellules amniotiques (44).

2.1.5 Fonction de l' α_1 AP

L' α_1 AP est une protéine dont la fonction est de protéger les tissus contre une attaque venant des enzymes protéolytiques. Sa demi-vie est de 5 à 6 jours; sa concentration normale dans le plasma est de l'ordre de 2 g/l; celle-ci peut quadrupler en réponse à un stimulus inflammatoire, par exemple lors d'une infection bactérienne, de brûlures graves, de tumeurs malignes. Sa concentration augmente aussi au cours de la grossesse.

Elle peut neutraliser l'activité de plusieurs sérine-protéases, parmi lesquelles les protéases d'origine pancréatique comme la trypsine, la chymotrypsine et l'élastase, ou les protéases synthétisées par les polynucléaires neutrophiles comme la cathepsine G et l'élastase.

La détermination de K ass, constante d'association apparente de second ordre entre l'inhibiteur et l'enzyme, montre que celle-ci est la plus élevée vis-à-vis de l'élastase leucocytaire qui apparaît ainsi comme la cible privilégiée de cet inhibiteur. Elle est 10 fois supérieure à celle correspondant à la chymotrypsine et 100 fois à celle mesurée en présence de la trypsine humaine (25).

2.1.6 Mécanisme d'action de l' α_1 AP

L' α_1 AP est un inhibiteur de sérine-protéases : ces enzymes ont la particularité de posséder un résidu de sérine, indispensable à leur activité.

Le mécanisme d'action de ces derniers peut être décrit en prenant comme exemple la chymotrypsine. A proximité de la sérine 195 du site actif, l'histidine 57 et l'acide aspartique 102 exercent une catalyse acide et créent une délocalisation électronique faisant intervenir des liaisons hydrogène entre ces acides aminés (fig. 2). Une augmentation du caractère nucléophile de la sérine permet une attaque du carbone de la fonction amide du substrat, qui va conduire à un intermédiaire tétrahédrique stabilisé par deux liaisons hydrogène au niveau de l'oxanion. Lors de la deuxième étape: passage de l'intermédiaire tétrahédrique à l'acyl-enzyme, une libération de l'amine se produit. Une molécule d'eau intervient alors, et par un processus inverse du précédent, le site actif fonctionnel se trouve régénéré, alors que l'acide provenant du substrat est libéré à son tour.

L'analyse cristallographique des inhibiteurs a mis en évidence une conformation des sites actifs telle que ceux-ci présentent une analogie avec le substrat; les protéases peuvent donc interagir avec les inhibiteurs comme avec les substrats.

Le mécanisme d'inhibition implique un freinage très intense de la réaction, probablement au niveau de l'intermédiaire tétrahédrique, l'enzyme est ainsi gêné stériquement, un complexe équimolaire est formé. Ce dernier résiste à la dissociation par des agents dénaturants tels que le SDS ou l'urée. Ceci implique qu'il y a formation d'une liaison covalente entre l'inhibiteur et la protéase.

Le site réactif de l' α_1 AP est centré sur un résidu méthionine en position 358, la liaison peptidique liant ce dernier à la sérine 359 se trouve entourée par le site actif de la protéase puis lentement hydrolysée.

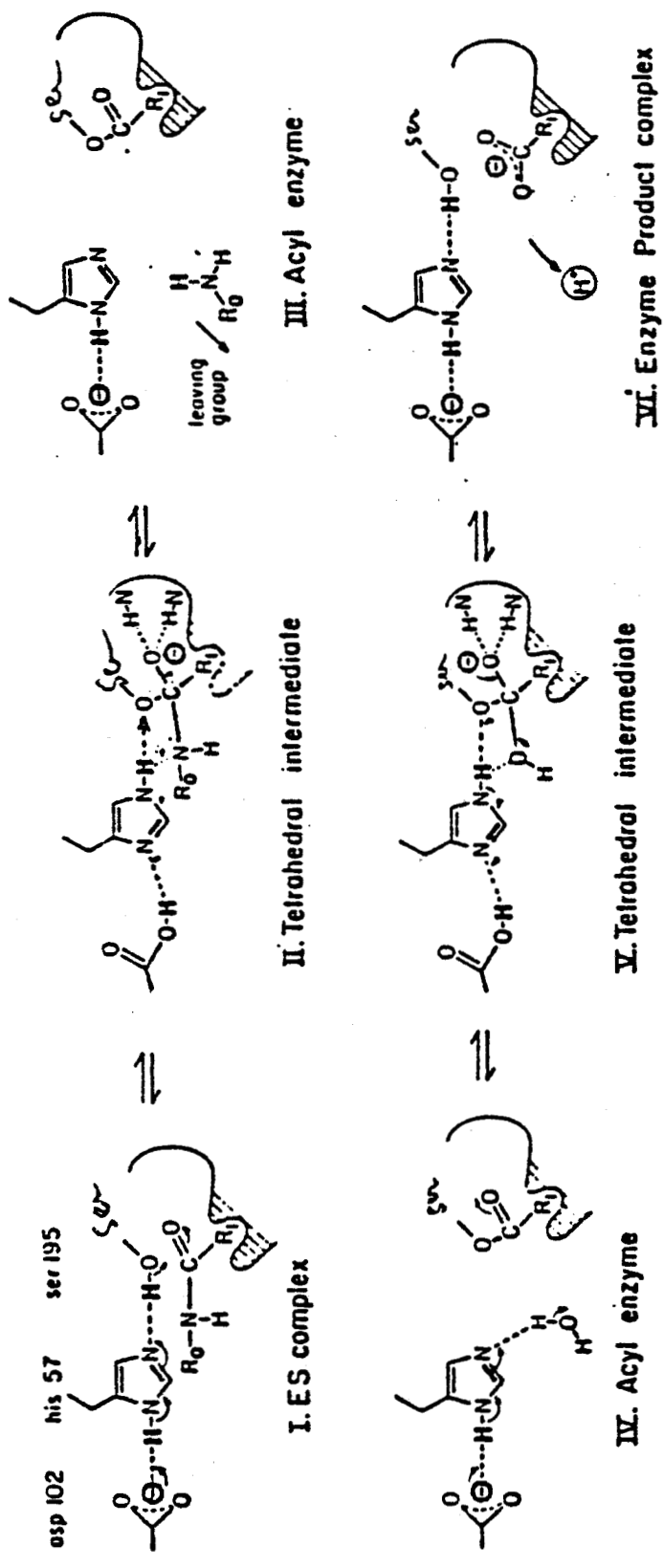


Figure 2 : Mécanisme de l'hydrolyse de peptides ou d'amides par une sérine protéase (la chymotrypsine bovine) d'après STROUD et coll (75)



Le mécanisme de l'interaction de toutes les sérine-protéases avec l' α_1 AP est semblable. A chaque fois, un petit peptide de 36 AA est libéré, l' α_1 AP est par la suite inactivée.

Le schéma suivant résume cette réaction



[E] : enzyme

[I] : inhibiteur

[EI] : complexe covalent non modifié

[EI*] : complexe covalent modifié

[I*] : inhibiteur non fonctionnel

Les résultats obtenus par MOROI et coll (54) dans l'étude de l'interaction entre l' α_1 AP et la trypsine permettent d'illustrer ce mécanisme d'interaction.

Après incubation de l' α_1 AP purifiée avec la β -trypsine dans un rapport molaire I/E de 1/3, pendant 10 minutes à 37°C, une électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS permet de visualiser quatre bandes différentes.

- Une bande de PM inférieur à 10.000 correspond au peptide C-terminal, provenant de l'hydrolyse de l' α_1 AP par la trypsine.

- Une bande de PM 48.000 correspond à l'inhibiteur modifié et inactivé par protéolyse limitée.

- Une troisième bande présente la mobilité de l' α_1 AP native (PM 54.000).

- Une bande de PM 74.000 correspond au complexe formé par l'inhibiteur partiellement hydrolysé, lié stoechiométriquement à la trypsine bovine. Il est stable en milieu SDS; ceci permet d'affirmer que la liaison enzyme-inhibiteur est de nature covalente.

La dissociation du complexe par l'hydrazine, conduit à deux constituants, le premier de PM 48.000 qui est l'inhibiteur dégradé, le second a un PM 23.000, il correspond à la trypsine.

2.1.7 Effet des oxydants sur l' α_1 AP

La présence du résidu de méthionine dans le site actif en position 358 lui permet de jouer un rôle critique dans la fonction inhibitrice de l' α_1 AP. Une deuxième méthionine est présente à proximité en position 351.

En présence d'oxydants chimiques ou biologiques, ces résidus de méthionine peuvent s'oxyder en méthionine sulfoxyde, très polaire, modifiant ainsi l'interaction entre l' α_1 AP et les protéases.

La K_{ass} entre l'inhibiteur oxydé par la N-chlorosuccinimide et l'enzyme diminue généralement, elle passe de $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ à 0 pour l'élastase pancréatique bovine et de $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ à $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ pour l'élastase leucocytaire humaine (79). Pour la plupart des sérine-protéases, l'affinité de l'inhibiteur oxydé est diminuée fortement, sauf pour la chymotrypsine. Des oxydants biologiques peuvent jouer le même rôle d'inactivateur de l' α_1 AP, le plus connu est le système myéloperoxydase, H_2O_2 , Cl^- qui peut former des ions hypochlorites oxydant la méthionine (fig. 3).

2.1.8 Présence de l' α_1 AP dans les alvéoles

L'étude du rôle de l' α_1 AP dans la protection du parenchyme pulmonaire peut être abordée par celle des sécrétions bronchiques expectorées ou mieux, par celle du LBA.

La concentration de cet inhibiteur dans le LBA des sujets normaux a été déterminée (26) par immunodiffusion radiale et électroimmunodiffusion (LAURELL) en utilisant un antisérum monospécifique anti α_1 AP. Elle est de l'ordre de $51 \pm 10 \text{ } \mu\text{g/mg}$ d'albumine chez les sujets normaux.

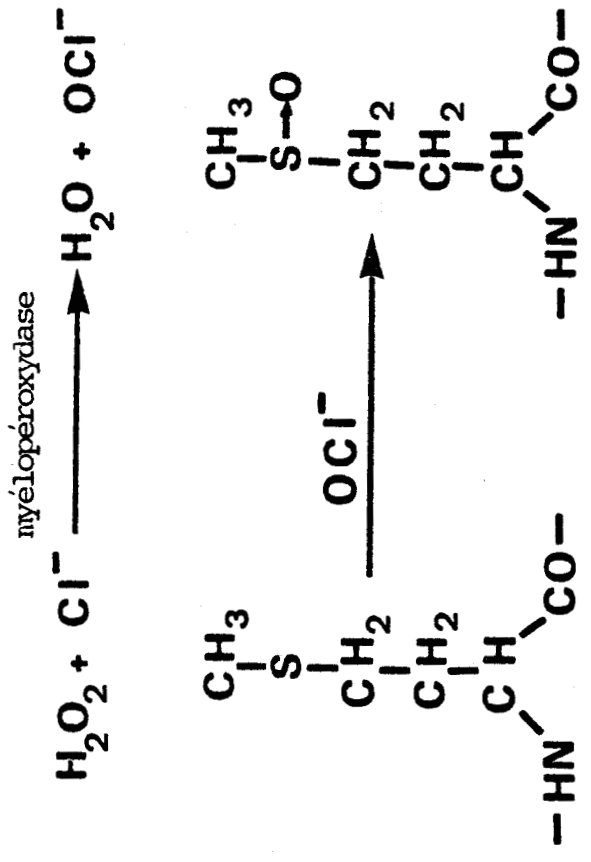


Figure 3: Résumé du mécanisme de transformation de la méthionine en méthionine-sulfoxyde.



a- Déficit congénital en α_1 AP

Les patients présentant une déficience congénitale en α_1 AP, par exemple les sujets PiZ, ont une concentration de cet inhibiteur dans le LBA, de l'ordre de 11 ± 2 μ g/mg d'albumine (26) soit 5 fois moins que les sujets normaux.

Puisque l' α_1 AP circulante diffuse aisément vers l'alvéole pulmonaire, le traitement des sujets déficients par une injection intraveineuse d' α_1 AP est envisagée.

L'oxydation de la méthionine conduit à une perte d'activité inhibitrice de l'élastase leucocytaire.

ROSENBERG et coll (61) ont récemment produit, grâce à des cultures de levure, un mutant d' α_1 AP dans lequel la méthionine du site actif a été remplacée par une valine. La plus grande stabilité de ce composé qui pourrait être préparé en quantité importante, est susceptible de faciliter le traitement proposé.

b- Déficit fonctionnel de l' α_1 AP

L'activité fonctionnelle de l' α_1 AP du LBA peut être dosée en présence de diverses protéases : le plus souvent, l'élastase leucocytaire humaine ou l'élastase pancréatique de Porc sont utilisées. L'activité élastasique résiduelle est déterminée en utilisant soit un substrat chromogénique tel le N-succinyl-L-alanyl-L-alanyl-L-alanyl-paranitroanilide (Suc-(Ala)₃ - pNA), soit une élastine insoluble.

Le rapport inhibiteur fonctionnel / inhibiteur total, dosé immunologiquement dans le LBA des sujets sains non fumeurs est très discuté. Il serait de l'ordre de 1 pour certains (14,26) ; cela implique que l' α_1 AP est totalement active. Pour d'autres (11,73), le rapport est inférieur à 1, d'où l'existence d'un certain pourcentage d'inhibiteur non fonctionnel dans le LBA d'individus normaux.

Chez les fumeurs, une altération de l' α_1 AP est retrouvée le plus souvent : une diminution de l'activité inhibitrice, de l'ordre de 40 à 50 %, a été signalée chez ces individus, comparés aux non fumeurs (14,24). Cependant certains auteurs (11,69,73) ne trouvent pas de différence significative dans le pourcentage d'AP fonctionnelle entre le LBA d'individus fumeurs et non fumeurs.

Ainsi BOUDIER et coll (11) trouvent 38 ± 14 % d' α_1 AP fonctionnelle chez les non fumeurs et 54 ± 12 % chez les fumeurs.

Récemment, ABBOUD et coll (1) reprenant cette étude concluent que l'activité de l' α_1 AP n'est pas ou est très peu diminuée chez les fumeurs.

L'activité inhibitrice de l' α_1 AP peut aussi être réduite dans le LBA de certains malades, par exemple chez des sujets atteints de bronchite chronique le pourcentage moyen d'activité de l' α_1 AP dans le LBA est de l'ordre de 14 %, avec une gamme de valeurs de 0 à 55 %, selon MORRISSON et coll (55). Ce pourcentage moyen d'activité est 3 fois moins important que celui trouvé dans l'expectoration des mêmes patients. De même, chez les sujets ayant un syndrome de détresse respiratoire de l'adulte (ARDS), on constate que le pourcentage d' α_1 AP active est inférieur à celui des sujets sains (48,52,53). Ainsi, COCHRANE et coll (16) montrent que 55 % des patients étudiés ont une α_1 AP complètement inactivée. En outre, dans ce cas, une activité élastolytique peut être mise en évidence dans le LBA(52).

- Mécanismes du déficit acquis de l' α_1 AP

La fumée de cigarette prend une importance particulière au niveau du poumon car elle interfère, soit directement avec la capacité inhibitrice de l' α_1 AP (14), en oxydant la méthionine du site actif en méthionine sulfoxide, soit indirectement, en stimulant les monocytes et les macrophages alvéolaires qui produisent des agents oxydants et jouent ainsi un rôle dans l'inactivation locale de l' α_1 AP (41). Ce fait pourrait expliquer au moins en partie la fréquence accrue de l'emphysème et des bronchopneumopathies chroniques chez les fumeurs.

Différents mécanismes physiologiques ont été décrits qui permettraient de s'opposer à l'action nocive des oxydants.

Récemment, JANOFF (41) a suggéré que la céruléoplasmine (protéine plasmatique transportant le cuivre) présente dans le LBA est susceptible d'exercer un rôle de protection vis-à-vis des agents oxydants de l' α_1 AP.

ABRAMS et coll (2) ont montré qu'un enzyme purifié d'E. coli, la méthionine sulfoxide-réductase, est capable de réactiver in vitro l' α_1 AP oxydée chimiquement. Un enzyme similaire a été caractérisé dans les homogénats de poumon humain (41).

Selon ABBOUD (1) il n'y aurait pas de différence dans l'activité inhibitrice de l' α_1 AP entre non fumeurs et fumeurs lorsque ces derniers s'abstiennent de fumer pendant 8 heures, avant d'effectuer le lavage. Ceci serait dû à la réduction de l' α_1 AP qui retrouve alors son activité inhibitrice pendant le temps écoulé depuis la dernière prise de cigarette. Ce facteur pourrait expliquer en partie les discordances dans les niveaux d'activité de l' α_1 AP, rapportées chez les fumeurs.

La diminution de la fonction inhibitrice de l' α_1 AP peut aussi être expliquée par l'action des protéases présentes au niveau pulmonaire. En effet, l'électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS suivie d'un transfert sur papier de nitrocellulose, du LBA de patients atteints de bronchite chronique permet de mettre en évidence, après révélation par immunoglobulines monospécifiques, trois formes différentes de l' α_1 AP : une forme native ayant un PM de 54.000, une forme dégradée de PM 49.000 et une forme complexée à un enzyme qui pourrait être l'élastase leucocytaire de PM 82.000. Les deux dernières formes ne sont pas fonctionnelles mais sont prises en compte lors du dosage immunologique.

Il existe dans les poumons plusieurs sources de protéases qui pourraient agir sur l' α_1 AP alvéolaire: l'élastase leucocytaire a fait

l'objet d'une très grande attention; elle a été retrouvée notamment dans les sécrétions bronchiques de certains fumeurs et de patients atteints de bronchite (55).

Les macrophages contiennent deux sortes d'élastase dont l'une est une métalloprotéase Ca^{++} -dépendante. Celle-ci n'est pas inhibée par l' α_1 AP qui, par contre, est rapidement inactivée en sa présence.

D'autres facteurs peuvent être aussi responsables de l'inactivation de l' α_1 AP. Ainsi, STOCKLEY et AFFORD (70) démontrent la présence dans une culture de *Pseudomonas* d'une activité élastasique, capable d'inactiver l' α_1 AP.

En conclusion, l' α_1 AP est présente au niveau alvéolaire, mais son activité fonctionnelle peut être altérée par oxydation par la fumée de cigarette ou par des agents oxydants biologiques. Cette oxydation pourrait être réversible. L' α_1 AP peut être aussi inactivée par protéolyse, mais dans ce cas, le rôle protecteur de l' α_1 AP est irréversiblement perdu.

2.2 LES AUTRES ANTIÉLASTASES DU POU MON

Parmi les agents protecteurs de l'élastine pulmonaire et, à côté de l' α_1 AP, plusieurs inhibiteurs de faible PM et un inhibiteur de PM plus élevé, l' α_2 M, ont été caractérisés au niveau alvéolaire.

2.2.1 Les inhibiteurs de faible PM

OHLSSON et coll (57) ont isolé des sécrétions bronchiques, un inhibiteur acido-stable de PM 10.500. Ils l'ont appelé "antileucoprotéase". Ce dernier inhibe l'élastase, la cathepsine G (les deux sont d'origine leucocytaire), la trypsine et la chymotrypsine, mais il n'a aucune action sur l'élastase pancréatique. Il est synthétisé localement par les cellules séreuses de la muqueuse du tractus respiratoire supérieur.

HOCHSTRASSER et coll (37) ont trouvé deux inhibiteurs de protéases acido-stables. Tous deux sont de taille voisine, PM 11.000. L'un, appelé BSI-E, inhibe l'élastase pancréatique de Porc et l'élastase leucocytaire humaine, il est sans action sur la trypsine pancréatique de Bœuf. L'autre, appelé BSI-TE, inhibe la trypsine pancréatique de Bœuf et l'élastase leucocytaire humaine. Celui-ci semble correspondre à l'inhibiteur décrit par OHLSSON qui présente le même spectre d'activité inhibitrice, la même taille moléculaire, et le même caractère basique.

HOCHSTRASSER et coll (36) ont caractérisé deux autres inhibiteurs acido-stables : l'un appelé HI-30 de PM 30.000, l'autre HI-14 de PM 14.000. Tous les deux inhibent la trypsine, la chymotrypsine et plus faiblement l'élastase leucocytaire. Ces deux inhibiteurs ont été caractérisés dans d'autres milieux biologiques: ils ont été isolés du sérum humain traité par la trypsine (35), ils ont été également trouvés dans l'urine humaine (35).

WACHTER et HOCHSTRASSER (84) ont étudié en détail la structure des inhibiteurs HI-30 et HI-14. Ce dernier est formé d'une chaîne polypeptidique qui comporte 6 ponts disulfures intrachânes; il est constitué de deux domaines de type KUNITZ, stabilisés chacun par 3 ponts disulfures.

- Un domaine HI-8E, correspondant à un peptide glucosaminé, inhibe seulement l'élastase leucocytaire.

- Un domaine C-terminal HI-8T inhibe la trypsine et la chymotrypsine (5).

HI-30 diffère de HI-14 par un peptide N-terminal comportant une structure glycanique. Ce dernier peut être séparé de HI-30 par hydrolyse trypsique. HI-30 présente une réaction immunologique croisée avec l'inter- α -trypsine inhibiteur (ITI).

Cette antiprotéase du plasma ne semble jouer dans ce milieu qu'un rôle mineur, en raison de sa faible teneur (300 à 500 mg/l) et de sa spécificité restreinte (64). Cependant, l'ITI jouerait un rôle important comme proinhibiteur, capable de libérer des fragments de petite taille. Ceux-ci diffuseraient dans différents milieux et notamment sur le

revêtement alvéolaire où ils pourraient intervenir parmi les moyens de défense, face aux agressions protéasiques.

GIRARD et coll (29) obtiennent un seul inhibiteur des sécrétions bronchiques. Ses caractéristiques sont très différentes de celles décrites par OHLSSON; par contre, cet inhibiteur ressemble à HI-30, décrit par HOCHSTRASSER, sur le plan de la composition en acides aminés, mais il en diffère par son PM (18.500). Il ne présente pas la même réaction antigénique avec ITI (tableau I).

KUEPPERS et BROMKE (45) ont identifié plusieurs inhibiteurs de protéases à partir des sécrétions trachéobronchiques humaines, trois protéines basiques séparées par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS (PM respectif 16.000, 12.600 et 6.500) ayant la même réactivité immunologique. Leur composition en acides aminés présente une ressemblance avec celle de l'inhibiteur sécrétoire bronchique. Ils ont tous un résidu Tyr en position N-terminale.

KUEPPERS et BROMKE ont aussi mis en évidence deux autres inhibiteurs: l'un de PM 64.000 (AI), l'autre de PM 20.000 (AII). Ces deux inhibiteurs présentent un caractère acide et paraissent immunologiquement en relation avec ITI (l'inhibiteur AII provient de AI probablement par protéolyse). AI correspondrait peut être à HI-30 et AII à HI-14.

Les différentes antiprotéases ainsi caractérisées par KUEPPERS et BROMKE inhibent la trypsine, la chymotrypsine et l'élastase leucocytaire mais sont sans action sur l'élastase pancréatique de Porc.

L'examen de ces différents résultats montre qu'il existe encore de nombreuses incertitudes, certaines peuvent sans doute s'expliquer par les différences de méthodologies utilisées.

Un accord semble cependant se faire sur la présence dans le poumon, à côté de l' α_1 AP, d'un inhibiteur sécrétoire de caractère basique et d'un autre qui présenterait une parenté immunologique avec l'ITI.

TABLEAU I : Les inhibiteurs de faible PM

BSI-E : Bronchial secretion inhibitor with activity against pancreatic and leucocyte elastase.

BSI-TE : Bronchial secretion inhibitor with activity against trypsin, chymotrypsin, elastase and cathepsin G from human polymorphonuclear leucocytes.

HI-30 : Human inhibitor with Mr 30.000.

HI-14 : " " 14.000:

HUSI-I: Human seminal plasma inhibitor.

BMPI : Bronchial mucus proteinase inhibitor.

A I : Acid protease inhibitor

A II : " " "

br I : bronchial inhibitor.

ITI : Inter α trypsin inhibitor.

Trypsine : trypsine pancréatique de Porc;

Chymotrypsine pancréatique de Porc;

ELH : élastase leucocytaire humaine;

EPP : élastase pancréatique de Porc.

Auteurs	HOCHSTRASSER (37)		DHLSON (57)	STOCKLEY (72)	GIRARD (29)	HOCHSTRASSER (36)		KUEFFERS (45)	
Nomenclature	BSI-E	BSI-TE	HUSI-I	BMPI	br I	HI-30	HI-14	A I	A II
PM	11.000	11.000	10.500	18.500	19.500	30.000	14.000	64.000	20.000
Trypsine	-	+	+	+		+	+	+	+
Chymo- Trypsine	-	+	+			+	+	+	+
ELH	+	+	+	+	+	faible	+	+	+
EPP	+	-	-	-	-	-	-	-	-
réaction immuno- croisée avec ITI		-	-	-	-	+	-	+	+

2.2.2 Leur rôle physiologique

Les inhibiteurs de l'élastase leucocytaire jouent un rôle essentiel dans la protection du poumon vis-à-vis des attaques protéolytiques. L' α_1 AP serait pour certains auteurs la principale antiélastase du tractus respiratoire inférieur.

Ainsi, GADEK et coll (26) déterminent l'activité antiélastasique du LBA en incubant ce dernier avec l'élastase leucocytaire et en utilisant l'élastine- $^{[3]H}$ insoluble comme substrat. Ces auteurs montrent qu'après neutralisation de l' α_1 AP du LBA par des immunoglobulines monospécifiques (IgG), presque toute l'activité antiélastasique présente disparaît. La quasi totalité de cette activité est éluée, lors d'une chromatographie de gel filtration sur Séphadex G 75, en un seul pic dont le volume d'éluion correspond à celui de l' α_1 AP. De plus, par immunoelectrophorèse du LBA en présence d'un anticorps monospécifique, l'inhibiteur bronchique (IB) n'est retrouvé qu'en faible quantité.

L'ensemble de ces éléments tend ainsi à affirmer le rôle prépondérant de l' α_1 AP au sein de l'alvéole pulmonaire.

D'autres résultats, cependant, ne sont pas en accord avec cette notion. Ainsi TEGNER (76) a montré, en 1978, par dosage en immunodiffusion radiale, que l'inhibiteur de faible PM représente en moyenne 90 % de la concentration molaire totale d'antiprotéase (α_1 AP, anti-chymo, α_2^M et IB) dans le LBA de sujets sains. Après gel filtration sur Séphadex G 75, cet inhibiteur est élué en deux pics qui réagissent avec un Ac monospécifique (anti IB), l'un correspond à l'inhibiteur natif, l'autre est élué au même niveau que l'inhibiteur complexé à l'élastase leucocytaire. L'inhibiteur natif représente 85 % de IB total. Il représente aussi l'essentiel de l'activité inhibitrice disponible pour protéger le poumon vis-à-vis de l'élastase leucocytaire.

BOUDIER et coll (11) ont montré qu'à côté de l' α_1 AP, il existe d'autres antiélastases leucocytaires. En effet, l'activité antiélastasique du LBA

des sujets normaux est très supérieure quand elle est déterminée avec l'élastase leucocytaire humaine plutôt qu'avec l'élastase pancréatique de Porc. Cette dernière est inhibée surtout par l' α_1 AP; au contraire, l'élastase leucocytaire humaine peut être inactivée par l' α_1 AP et par les inhibiteurs acido-stables qui sont donc présents en quantité importante.

D'autre part, STOCKLEY et coll (72) ont mesuré immunologiquement la concentration de l'inhibiteur acido-stable (qu'ils ont appelé BMPI) et celle de l' α_1 AP dans les LBA de patients atteints de bronchite chronique, à l'aide d'antisérums monospécifiques. Ces auteurs trouvent également un rapport molaire moyen BMPI / α_1 AP de l'ordre de 5,72 mais avec une gamme de valeurs très large (1,84 - 19,91).

Parallèlement, l'activité antiélastasique a été déterminée en utilisant l'élastase leucocytaire humaine purifiée et l'élastase pancréatique de Porc. La capacité inhibitrice de l' α_1 AP du LBA varie selon les patients et représente environ 5 % de la capacité inhibitrice de l'élastase leucocytaire humaine. Ces résultats démontrent une très grande importance de l'inhibiteur BMPI dans le LBA de ces patients.

Selon STOCKLEY, ces résultats contradictoires, sur l'importance du rôle joué par l'IB dans les alvéoles, peuvent s'expliquer par la présence d'une quantité variable de mucus dans le LBA. Ce mucus provient du tractus respiratoire supérieur où l'inhibiteur bronchique est sécrété en grande quantité. L'auteur explique ainsi par cette hypothèse les résultats obtenus par BOUDIER chez les sujets sains .

Ceux-ci restent cependant difficiles à réconcilier avec ceux présentés par GADEK. Seules des études ultérieures permettront de mieux préciser le rôle respectif de l' α_1 AP et des inhibiteurs acido-stables au sein de l'alvéole pulmonaire .

2.2.3. L' α_2 -macroglobuline

L' α_2 M est une protéase du sérum, de PM très élevé 720.000. La molécule est constituée par l'assemblage de 4 sous-unités qui ont des propriétés immunologiques et électrophorétiques identiques. Le tétramère

peut être dissocié en deux parties par dénaturation par l'urée, par abaissement du pH ou par le SDS, avec libération de deux dimères constitués chacun de deux sous-unités reliées entre elles par des ponts disulfures. La réduction douce, avec ou sans dénaturation, aboutit à la dissociation du tétramère en ses 4 sous-unités de PM 185.000.

La taille de l' α_2 M lui interdit de diffuser à travers les structures alvéolaires, par conséquent son rôle de protection antiélastasique est mineur dans les poumons. Elle représente moins de 1 % de la capacité inhibitrice totale.

Dans l'état actuel des connaissances, on ignore le mécanisme de la présence d' α_2 M à ce niveau : diffusion depuis le sérum ou sécrétion des fibroblastes pulmonaires et / ou des macrophages alvéolaires. L' α_2 M se distingue des autres inhibiteurs de protéases, par sa large spécificité. Elle réagit avec des protéases faisant partie de chacune des 4 classes catalytiques (carboxyl-, thiol-, sérine- et métallo-protéases).

De l'ensemble des résultats précédemment exposés, il ressort que l' α_1 AP est présente au niveau de l'alvéole pulmonaire et qu'elle participe à la protection tissulaire vis-à-vis des agressions protéolytiques. Elle est, de plus, sensible à l'action de diverses protéases et d'agents oxydants capables de l'inactiver.

L'estimation de l' α_1 AP sous ses différentes formes pourrait permettre de mieux comprendre le mécanisme de diverses pneumopathies. Il pourrait aussi apporter au clinicien une information supplémentaire pour le diagnostic ou le suivi de l'évolution de ces affections.

Dans ce travail, nous rapportons les résultats que nous avons obtenus lors de la mise au point de méthodologies fiables permettant le dosage en grandes séries de l' α_1 AP et de son activité biologique dans le liquide de lavage bronchoalvéolaire.

L'étude d'échantillons, prélevés sur un grand nombre de patients atteints de diverses pneumopathies, nous permettra de préciser l'intérêt clinique éventuel de ces explorations.

DOSAGE DE L' α_1 ANTIPROTEASE.

TRAVAUX PERSONNELS.

1. DOSAGES IMMUNOLOGIQUES DE L' α_1 -ANTIPROTEASE

1.1 INTRODUCTION

Les techniques de dosage immunologique des protéines se sont multipliées au cours de ces dernières années; elles permettent actuellement le dosage fiable et rapide d'une protéine spécifique dans un mélange d'antigènes. Ces méthodes ont été surtout développées pour le dosage des protéines plasmatiques. Elles peuvent naturellement être appliquées au dosage de l' α_1 AP dans le LBA.

La réaction d'un Ag avec l'Ac correspondant donne lieu à la formation d'un agrégat macromoléculaire. L'étude de la quantité de précipité formé en présence de quantités croissantes d'Ag, avec une concentration fixe d'anticorps correspondant présente trois zones caractéristiques :

- La première correspond à la zone d'excès d'Ac. Les sites actifs des Ag sont saturés par des molécules d'Ac en excès, la quantité de précipité formé est faible : en effet il se forme essentiellement des petits complexes solubles.

- La deuxième : zone d'équivalence, correspond au maximum de formation des complexes qui sont capables de donner un réseau tridimensionnel macromoléculaire insoluble.

- La troisième correspond à un excès d'Ag. Les Ac sont saturés par de nombreuses molécules d'Ag, ce qui provoque une redissolution du précipité avec réapparition d'immun-complexes solubles.

1.2 DIFFERENTES TECHNIQUES UTILISEES

Trois groupes de dosages immunochimiques peuvent être distingués

- Les méthodes en milieu gélifié.
- Les méthodes avec marqueurs (radio-immunologiques, immunoenzymatiques, immunofluorescentes).
- Les méthodes en milieu liquide.

1.2.1 Les méthodes en milieu gélifié

Elles correspondent à l'immunodiffusion radiale (IDR) de MANCINI (51) et à l'électroimmunodiffusion (EID) de LAURELL (46). Elles sont fondées sur la précipitation spécifique des protéines dans un gel d'agarose contenant les Ac correspondants. Celle-ci survient au point d'équivalence où on obtient une surface délimitée par le front de précipitation, proportionnelle à la concentration en Ag.

- L'IDR est basée sur une migration libre de l'Ag: après une diffusion radiale suffisante et quand on arrive à la zone d'équivalence, on obtient un anneau de précipitation.

- Dans l'EID, la migration de l'Ag est accélérée par un champ électrique. Quand le complexe atteint son point d'équivalence, il précipite et s'immobilise dans le gel. L'aspect obtenu évoque celui d'une fusée d'où la terminologie anglo-saxonne de Rocket.

1.2.2 Les méthodes avec marqueurs

Elles utilisent soit des isotopes radioactifs, soit des marqueurs enzymatiques ou fluorescents. Elles sont souvent basées sur la compétition entre l'antigène froid (protéine à doser) et l'antigène marqué, présent en quantité connue, incubés simultanément en présence de l'anticorps correspondant. Plus il existe d'Ag froid dans l'échantillon, moins l'Ag marqué se fixe; la diminution du marquage du complexe Ag-Ac est fonction de la concentration en Ag froid.

Il est nécessaire de séparer les fractions d'Ag marqué libre et combiné sous forme de complexe Ag-Ac; ceci est réalisé par adsorption sélective, chromatographie, électrophorèse ou, plus récemment, par l'action d'un deuxième Ac précipitant en présence de PEG. Certaines techniques utilisant un Ac immobilisé sur un support solide permettent d'éliminer l'excès d'Ag par un simple lavage de la phase fixe.

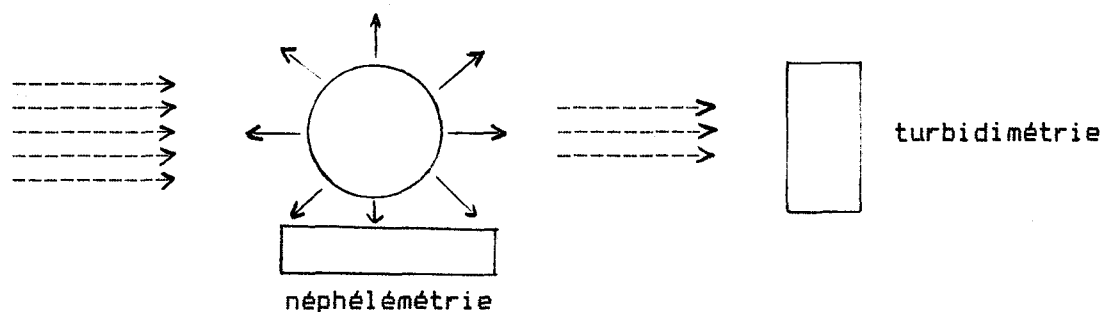
1.2.3 Les méthodes en milieu liquide

La néphélémétrie et la turbidimétrie sont des procédés analytiques permettant d'apprécier dans un milieu transparent, la concentration de particules diffusantes; lorsqu'un rayon lumineux traverse le milieu transparent contenant des particules ayant un indice de réfraction différent de celui du milieu, la lumière est diffusée dans l'espace et dans toutes les directions.

L'intensité de cette diffusion est fonction de la quantité de complexes formés lors d'une réaction Ag-Ac, à condition qu'on se trouve en excès d'Ac.

La turbidimétrie mesure la quantité de lumière qui, après diffusion par les particules du complexe Ag-Ac, arrive au récepteur photoélectrique, lui-même placé dans l'axe du faisceau incident.

Par contre, la néphélémétrie mesure l'intensité de la lumière diffusée par le milieu dans une direction autre que celle du faisceau incident: deux diaphragmes sélectionnent les rayons dispersés qui sont dirigés vers le récepteur. Cette méthode est plus sensible que la turbidimétrie.



Il y a quelques années, l'apparition de petits lasers à gaz relativement simples et bon marché, a suscité la création de plusieurs appareils utilisant ceux-ci comme source lumineuse; parmi eux, le néphélomètre-laser. L'intérêt des sources lasers est de donner un faisceau lumineux intense, monochromatique et parallèle (ce qui est difficile à obtenir avec une source classique).

Parmi ces différentes techniques de dosage immunologique des protéines, le choix est fonction de plusieurs critères comme la sensibilité, l'exactitude et la précision.

La radioimmunologie est très sensible, mais nécessite un appareillage lourd et coûteux. Parmi les autres méthodes, l'immunonéphélométrie et l'électroimmunodiffusion présentent une bonne sensibilité, mais cette dernière n'est pas adaptée au dosage de grandes séries d'échantillons.

1.3 DOSAGE DE L' α_1 -ANTIPROTEASE DANS LES LAVAGES BRONCHOALVEOLAIRES

1.3.1 Problèmes posés par ces dosages

La plupart des auteurs qui ont étudié l' α_1 AP présente dans le LBA (11, 14, 26, 32, 55, 72) ont dosé cette dernière après concentration du milieu, 5 à 100 fois selon les cas. Celle-ci est effectuée par ultrafiltration à l'aide de membrane Millipore Cx₁₀ ou le plus souvent de membrane Amicon UM₂ ou UM₁₀.

La concentration de l' α_1 AP dans les LBA concentrés est déterminée soit par immunodiffusion radiale, soit par électroimmunodiffusion.

Cependant, au cours de la concentration, une perte considérable en protéines est signalée (8). Celle-ci est vraisemblablement due à une adsorption sur les membranes d'ultrafiltration. De plus, dans un autre liquide biologique (urines), certains auteurs (38, 59) ont montré que les pertes, survenant lors de la concentration par différentes méthodes, varient d'une protéine à l'autre. Il pourrait en être de même lors de la concentration du LBA. L'utilisation d'un facteur de correction basé sur le dosage des protéines totales, avant et après concentration pourrait aussi conduire à des erreurs. Une méthode de dosage de l' α_1 AP sans concentration est donc souhaitable.

L' α_1 AP pulmonaire est mesurée en se référant à une solution-standard de concentration connue en α_1 AP. L'exactitude de ces techniques dépend entièrement de l'identité immunologique de la protéine présente dans l'échantillon et de celle utilisée pour préparer la gamme d'étalonnage.

STOCKLEY et coll (67) ont dosé par EID l' α_1 AP pure, incubée en présence d'élastase leucocytaire dans différents rapports molaires (E/I) et pendant des temps variables. Ces deux facteurs interviennent dans la formation du complexe [E-I] au cours de la réaction d'inhibition et dans sa dégradation : ces auteurs ont constaté tout d'abord une sous-estimation de l' α_1 AP si le temps d'incubation est inférieur à 1 heure. Cette sous-

estimation augmente avec le rapport molaire jusqu'à 0,75 puis elle diminue (fig. 4).

Les résultats obtenus pour des temps d'incubation compris entre 1 heure et 6 heures sont relativement exacts. Cependant, si l'incubation est supérieure à 6 heures (de 24 à 48 h), on remarque une sur-estimation importante de l' α_1 AP, pouvant atteindre jusqu'à 3 fois la valeur contrôle (fig. 5).

Ceci est fonction de la quantité d' α_1 AP partiellement protéolysée. Cette dernière a été mise en évidence par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS.

Ces mêmes auteurs ont essayé pour ce dosage, 3 antisérums polyclonaux spécifiques d'origine différente.

Les résultats expérimentaux mesurant l' α_1 AP après incubation avec différentes quantités d'élastase leucocytaire, pendant 1 heure, montrent que ces antisérums donnent tous le même résultat pour la valeur contrôle (α_1 AP pure). Cependant, le dosage de l' α_1 AP, incubée avec l'élastase à différents rapports molaires, montre qu'un antisérum donne des résultats très proches de la valeur contrôle pour tous les échantillons alors que les 2 autres conduisent à une surestimation pouvant atteindre 200 % (fig. 6).

Ces résultats, obtenus pour différents antisérums, montrent que le choix de l'anticorps utilisé est d'une importance capitale pour le dosage de l' α_1 AP par électroimmunodiffusion comme par immunodiffusion radiale.

STOCKLEY et AFFORD (66,67) ont aussi étudié l'effet de certains oxydants sur le dosage de l' α_1 AP par EID. Ils ont constaté que l'addition d'une solution d' H_2O_2 n'entraîne pas de changement immunologique très important même si on ajoute une quantité capable d'inhiber la totalité de cet inhibiteur. Par contre, les études faites avec une solution de fumée de cigarette montrent des changements dans les propriétés immunologiques de la protéine. En effet, en EID, deux pics de précipitation superposés sont observés : un pic bien coloré dont la hauteur est plus basse que celle

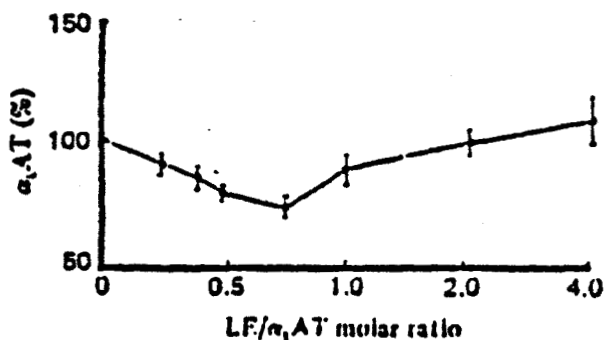


FIG. 4 Quantification of α_1 AT by RIEP 10 min after addition of LE. The vertical axis is the quantity expressed as a percentage of α_1 AT alone and the horizontal axis the functional LE/ α_1 AT molar ratio. Each point is the mean of six experiments and the bar lines are $\pm 1.5\sigma$. (67)

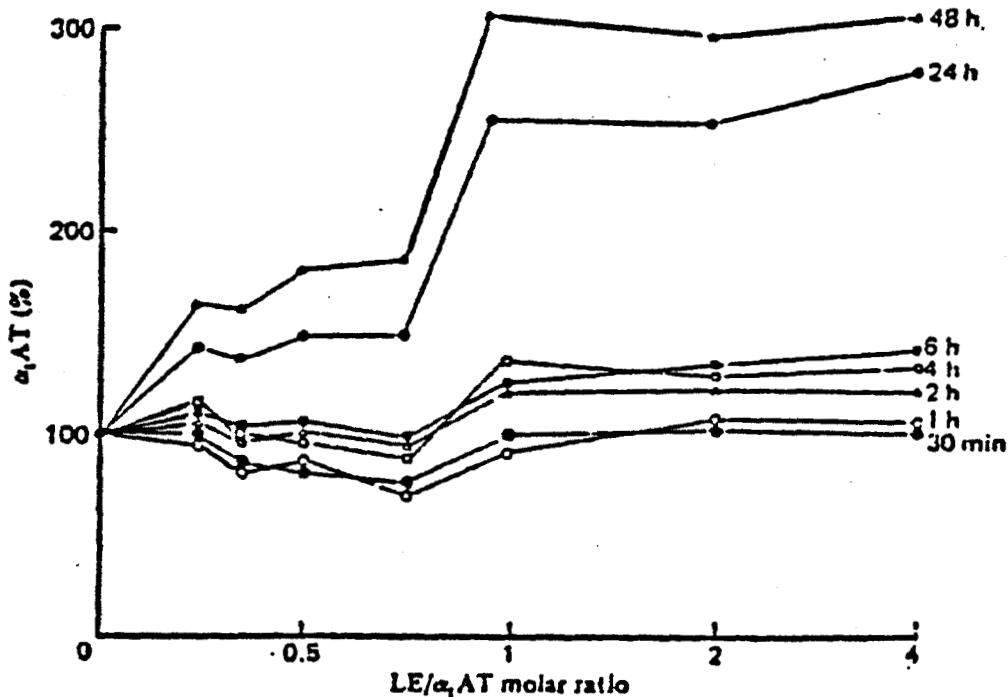


FIG. 5 Effect of time on the quantification of α_1 AT after the addition of LE with antibody Z567 (see the text). Lines join results of an experiment for a given time, indicated on the right. (67)

de l' α_1 AP native et un autre pic faiblement coloré et plus haut. Ceci est fonction de la quantité de la fumée de cigarette ajoutée (fig. 7). Cependant, ABBoud et coll (1) dosant l' α_1 AP par IDR, ont constaté une sous-estimation beaucoup plus limitée des résultats sous l'action de la fumée de cigarette.

En conclusion, il nous a paru intéressant d'utiliser des méthodes de dosage assez sensibles (telles que la néphélométrie-laser et l'électroimmunodiffusion) pour être applicables au LBA sans concentration préalable, de manière à éviter les risques d'erreur inhérents à la concentration.

D'autre part, le dosage de l' α_1 AP dans le LBA peut être inexact, en raison de la présence de quantités plus ou moins importantes des différentes formes d' α_1 AP (complexée, dégradée, oxydée) existant dans le milieu.

Dans ce cadre, nous avons cherché à déterminer la sensibilité des techniques choisies à la présence de ces différentes formes.

1.3.2 Immunonéphélométrie-laser

La méthodologie utilisée dérive de celles précédemment décrites pour le dosage des protéines du sérum (85). (La description détaillée de la méthode est présentée dans l'appendice technique).

a- Standard

Un sérum-standard Hyland, titrant 1,23 g/l d' α_1 AP, a été dilué par du NaCl 0,14 M afin d'obtenir une gamme de concentration variant entre 0,65 et 16,4 mg/l d' α_1 AP, correspondant aux valeurs habituellement rencontrées dans le LBA. Cette solution, conservée à + 4 ° C, reste stable pendant au moins 15 jours.

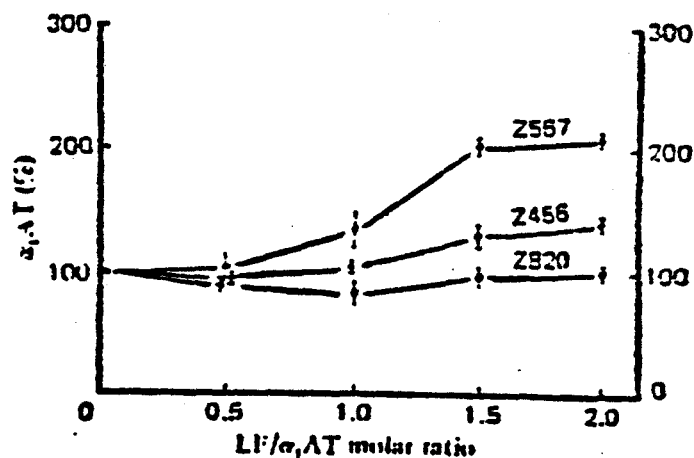


FIG. 6 Effect of different antisera. Results are 1 h after addition of LF. Each point represents the mean of four experiments and the SD bar lines are shown. The lines join results with each antiserum, laboratory code number indicated above the line on the right. (67)

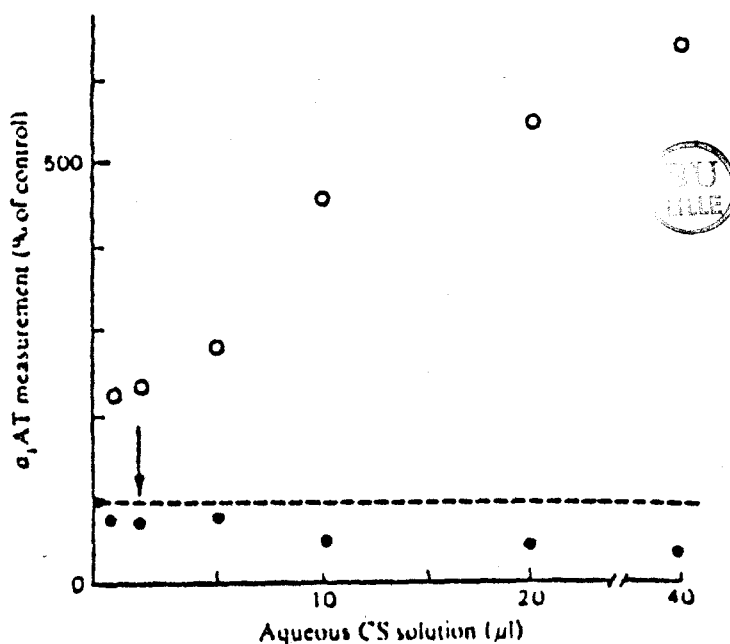


FIG. 7 Immunological measurement of α_1 AT after the addition of cigarette smoke (CS). The vertical axis is the value obtained for α_1 AT expressed as a percentage of the pure α_1 AT alone. The horizontal axis is the volume of smoke solution added to 9.7 μ g of α_1 AT. ---- Signifies the control value; ●, values obtained from measurement of the distinct peak; ○, from the indistinct peak. The arrow indicates the result for a mixture equivalent to 30% inactivated α_1 AT (14 μ l of CS added to 57.6 μ g of α_1 AT). (68)

b- Concentration en anticorps

Les dilutions d'immun-sérums ont été choisies en se référant aux conditions décrites pour le dosage de l' α_1 AP du sérum. Deux dilutions, au $1/4^{\text{ème}}$ et au $1/8^{\text{ème}}$, ont été ainsi retenues. Elles sont effectuées dans un tampon phosphate de sodium (PBS) 10 mM, NaCl 0,14 M, pH 7,4 contenant du polyéthylène-glycol 6000 à 40 g/l et du Tween 20, 2 g/l. Les courbes obtenues sont présentées dans la figure 8 ; leur aspect est très voisin : nous sommes en excès d'Ac.

Un LBA ayant une concentration très élevée en α_1 AP a été dilué pour obtenir des valeurs de concentration allant jusque 63,2 mg/l. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 9 ; elle montre que la dilution au $1/8^{\text{ème}}$ de l'antisérum permet de doser l' α_1 AP jusqu'à des concentrations voisines de 20 mg/l, rarement atteintes dans les LBA. Celle-ci a donc été retenue pour la suite de notre travail.

Pour éviter tout risque de se situer dans la zone d'excès d'Ag, nous avons dosé systématiquement les protéines totales dans les différents échantillons, par la méthode de BRADFORD (12).

L' α_1 AP représente en moyenne 2 à 3 % de ces dernières; ce rapport peut monter jusqu'à 9 % dans certains cas. Si le LBA contient une quantité de protéines totales supérieure à 250 mg/l, on procède à nouveau au dosage de l' α_1 AP avec une prise d'essai diminuée de moitié. Si le résultat obtenu n'est pas de moitié inférieur au premier résultat, on est en excès d'Ag, il faut alors diluer l'échantillon.

c- Filtration des LBA

Lors du dosage d'une protéine par néphélométrie-laser, il est recommandé (87) de filtrer les échantillons donnant une valeur élevée de blanc (supérieure à 75 % de la valeur du dosage).

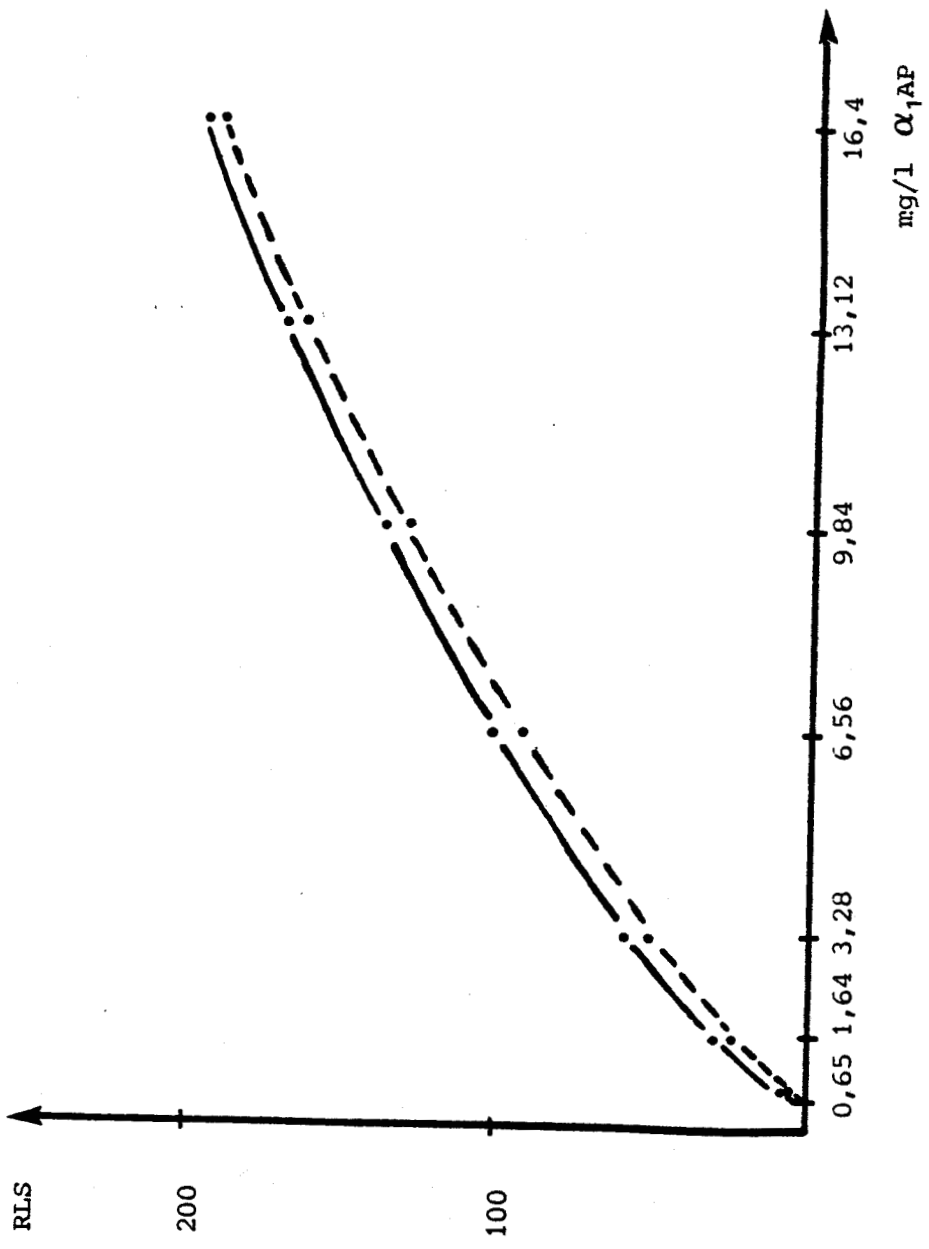


Figure 8 : Gamme-étalon de 0,65 à 16,40 mg/l d' α_1AP dosée en INL par

- dilution de 1'IS au 1/8
- - - dilution de 1'IS au 1/4



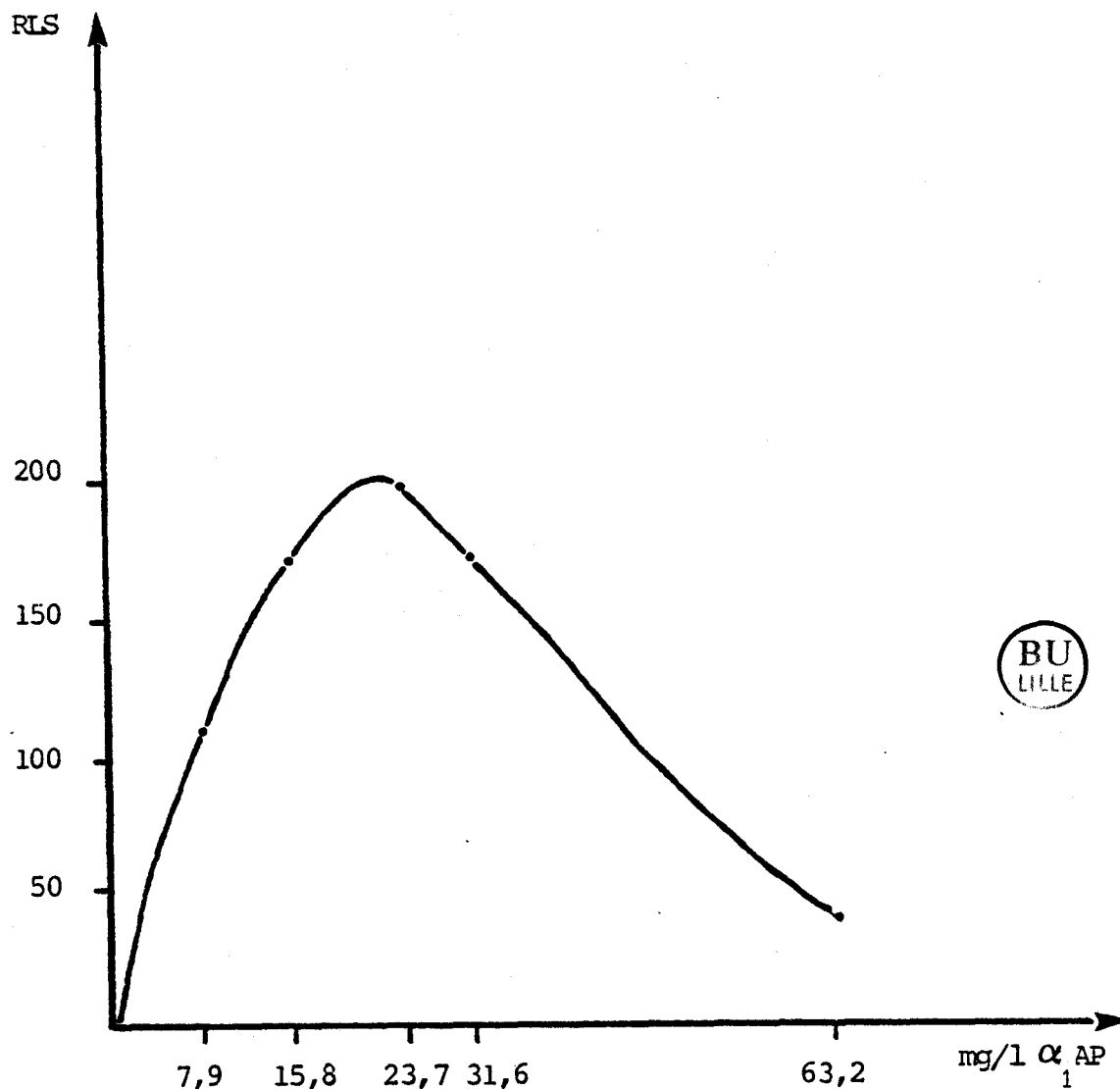


Figure 9 : Evaluation en INL de différentes concentrations d' α_1 AP obtenues par dilution d'un IBA contenant initialement une forte concentration d' α_1 AP.

Dans notre cas, à de rares exceptions près, les résultats des blancs exprimés en RLS (relative light scattering ou dispersion relative du rayon lumineux) ne dépassent pas 15 % de ceux des dosages quand le LBA contient plus de 1 mg/l d' α_1 AP (limite de sensibilité de la technique). Nous avons vérifié que la filtration de ces LBA n'améliore pas la qualité des résultats. Dans les autres cas (2 % des LBA contenant plus de 1 mg/l d' α_1 AP) le RLS est élevé, la filtration s'est avérée nécessaire.

L'utilisation de certains filtres MILLEX-HA (0,45 μ m, en ester de cellulose) conduit à une diminution d'environ 50 % de la concentration d' α_1 AP; le même effet a déjà été signalé pour les IgG (85,86). Par contre, l'emploi des filtres NUCLEPORE (0,4 μ m, en polycarbonate) n'entraîne aucune perte.

d- Critères de qualité de la méthode

* Précision de la méthode

La précision de la méthode est évaluée :

- par la détermination de la répétabilité intrasérielle sur 30 échantillons, d'un même LBA, dosés simultanément, le même jour et dans la même série.

- par la détermination de la reproductibilité intersérielle qui a été effectuée aussi sur 30 échantillons d'un même LBA à des jours différents.

Les coefficients de variation sont de 6,27 % pour la répétabilité intrasérielle et de 9,59 % pour la reproductibilité intersérielle, coefficients satisfaisants, compte tenu de la nature du prélèvement et de la quantité de protéine à doser.

Les moyennes, écarts-types et coefficients de variation obtenus sont rapportés dans le tableau II .

* Evaluation de l'exactitude

En l'absence de méthode de référence, l'évaluation de l'exactitude a été déterminée par la méthode des ajouts dosés. Pour ce faire, 8 LBA ont été dosés avant et après addition de quantités connues d' α_1 AP obtenues par dilution du standard Hyland.

Les échantillons sont préparés de la manière suivante : à 450 μ l de LBA sont ajoutés 50 μ l de NaCl 0,14 M, additionnés ou non, d'une certaine quantité d' α_1 AP (standard dilué au 1/40^{ème} ou au 1/20^{ème}).

Les différents pourcentages de récupération sont indiqués dans le tableau III .

L' α_1 AP peut donc être dosée, sans concentration préalable des LBA, par immunonéphélémétrie-laser. Cette méthode peut être applicable en grandes séries et présente des avantages évidents de praticabilité.

* Seuil de détection

La limite de détection est établie à partir d'essais à blanc, par dosage répété 30 fois dans une même série, de la solution d'IS au 1/8^{ème}, en l'absence d'inhibiteur. La limite de détection est calculée à partir de l'écart-type déterminé sur les mesures des blancs. Celle-ci correspond à 1 mg/l d'inhibiteur.

1.3.3 Electroimmunodiffusion

a- Description de la méthode

La concentration en α_1 AP des LBA a été également déterminée par électroimmunodiffusion quantitative, selon la technique décrite par LAURELL (46).

Tableau II Précision du dosage de l' α_1 AP dans le LBA par immunonéphélémétrie-laser

	Répétabilité intrasérielle	Reproductibilité intersérielle
	sur un même LBA	
nombre de mesure n	30	30
moyenne en mg/l $(\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n})$	4,06	4,49
écart type $\sigma = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$	0,25	0,43
coefficient de variation $CV = 100 \times \frac{\sigma}{\bar{x}}$	6,27 %	9,59 %



Tableau III Exactitude du dosage de l' α_1 AP par immunonéphélométrie-laser (méthode des ajouts dosés)

Les concentrations en α_1 AP sont exprimées en mg/l

L B A	concentration en α_1 AP en mg/l	concentration après surcharge avec la dilution au 1/40 ^{ème}	% de récupération	concentration après surcharge avec la dilution au 1/20 ^{ème}	% de récupération
Témoin	0	3,4	100	6,6	100
1	4,1	7,0	93	11,2	108
2	1	4,8	109	8	105
3	3,8	7,5	104	11,7	112
4	2,2	5,9	105	8,7	99
5	1,9	5,5	104	7,5	88
6	2,5	5,8	98	8,3	91
7	2,2	5,3	95	8,9	101
8	3,7	6,5	92	10,1	98
récupération moyenne \pm 1SD		3,36 \pm 0,39		6,63 \pm 0,74	
% de récupération \pm 1SD:		99 \pm 11,5		100 \pm 11,2	



L' EID a été réalisée en gel d'agarose à 1 % dans un tampon véronal 0,002 M, pH 8,6 (la description de la méthode est présentée dans l'appendice technique).

Un sérum-standard Behring, titrant 120 mg/l d' α_1 AP, est dilué dans du NaCl 0,14 M, de manière à obtenir une gamme étalon d' α_1 AP allant de 1 à 15 mg/l.

Deux quantités différentes d'IS Behring anti α_1 AP ont été successivement essayées (0,5 et 0,4 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$). Avec 0,4 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ on observe la formation de fusées bien pointues, la hauteur des pics est proportionnelle à la concentration d' α_1 AP des étalons (fig. 10). La quantité d'IS utilisée est donc correcte. (1 mg/l d' α_1 AP représente la quantité minimale qui donne un pic visible).

b- Effet du milieu de dilution de l' α_1 AP pure

A partir d'une solution d' α_1 AP pure concentrée, dont le titre avait été préalablement déterminé à la fois par EID et par IDR, selon la méthode de MANCINI, nous avons procédé à deux séries de dilutions; d'une part, dans l'eau ou le NaCl 0,14 M, d'autre part dans une solution de sérum-albumine bovine (SA) à 150 mg/l dans du NaCl 0,14 M, avant de doser par EID, les différents échantillons ainsi préparés.

Dans le premier cas, les résultats obtenus font apparaître clairement une sous-estimation voisine de 12 % de l' α_1 AP réellement présente dans l'échantillon. Par contre, en diluant dans une solution de SA, les pics obtenus sont nettement plus hauts et le titre en α_1 AP calculé est très proche de la valeur attendue. Nous avons vérifié que la SA ne contient pas d' α_1 AP comme contaminant.

Le même effet de matrice a déjà été signalé pour le dosage de la préalbumine (21).

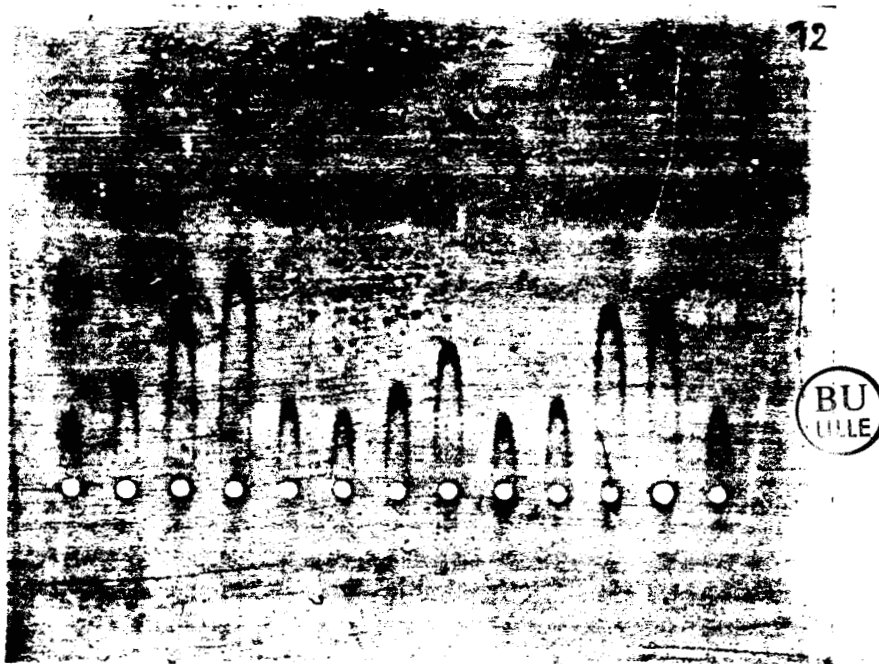


Figure 10 : Dosage par électroimmunodiffusion de l' α_1 AP de différents LBA.

Volume d'échantillon déposé: 5 μ l. Concentration en α_1 AP de la gamme-étalon : 1, 2.5, 5 et 10 μ l/ml.

c- Les critères de qualité de la méthode

Ils sont appréciés, comme pour la néphélométrie-laser, par la détermination de la répétabilité intrasérielle, de la reproductibilité intersérielle et de l'exactitude.

L'analyse statistique des résultats obtenus permet de constater que les coefficients de variation de la reproductibilité et de la répétabilité sont satisfaisants (tableau IV).

L'exactitude a été évaluée par la méthode des ajouts dosés : à 450 μ l de LBA à analyser, on ajoute 50 μ l d'une solution de SA à 150 mg/l, contenant ou non, une surcharge de 4,3 mg/l d' α_1 AP pure. Un témoin est effectué par mélange de 450 μ l de la même solution de SA et de 50 μ l de la solution contenant la surcharge de l' α_1 AP.

Les pourcentages de récupération sont indiqués dans le tableau V .

L' α_1 AP est donc dosée sans concentration préalable des LBA par EID comme par INL. On constate que la précision de l'EID est supérieure à celle de l'INL. Par contre, les deux méthodes donnent des résultats présentant le même degré d'exactitude, évalué par la méthode des ajouts dosés.

Tableau IV Précision du dosage de l' α_1 AP des LBA par électroimmunodiffusion

	Répétabilité intrasérielle sur un même LBA	Reproductibilité intersérielle
nombre de mesure n	18	24
moyenne en mg/l \bar{x}	3,49	3,57
écart type σ	0,11	0,19
coefficient de variation CV	3,09	5,26

Tableau V Exactitude du dosage de l' α_1 AP des LBA par électroimmunodiffusion (méthode des ajouts dosés)
Les concentrations en α_1 AP sont exprimées en mg/l

L B A	concentration en α_1 AP en mg/l	concentration après surcharge avec l' α_1 AP pure	% de récupération
Témoin	0	4,3	100
1	8,7	13	100
2	2,9	7,5	107
3	7,5	11,8	100
4	3,4	7,7	100
5	5,3	9,6	100
6	3,4	7,7	100
7	3,1	7,7	107
8	2,5	6,9	102
9	4,4	8,5	95
10	5,8	10,6	112
récupération moyenne \pm 1SD:		4,4 \pm 0,20	
% de récupération		102 \pm 4,65	

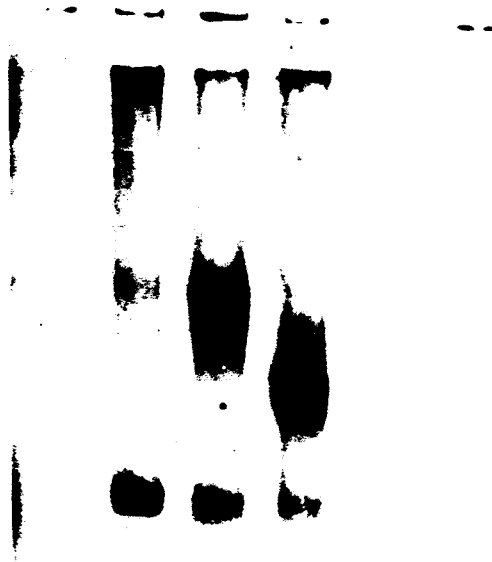
1.4 DOSAGE DES FORMES MODIFIEES DE L' α_1 AP PAR INL ET EID

La sensibilité des techniques choisies aux différentes formes d' α_1 AP a été étudiée.

Nous avons opéré de deux manières différentes :

- Dans un premier temps, nous avons incubé pendant 10 minutes, une solution d' α_1 AP pure à 1 mg/ml (fraction active 0,55 mg/ml) et une solution de trypsine bovine titrée (active à 60 %) dans des rapports molaires I/E de (1/1) et (0,5/1). A cette concentration d' α_1 AP, il est possible de contrôler la formation du complexe protéase-antiprotéase par électrophorèse en gel de polyacrylamide alcalin à 10 % (fig. 11). Plusieurs bandes de migration plus lentes que l' α_1 AP native sont effectivement visualisées. Celles-ci correspondent au complexe α_1 AP-trypsine, susceptible d'être modifié progressivement par protéolyse due à l'excès d'enzyme. L'immunoélectrophorèse bidimensionnelle confirme la modification de la mobilité électrophorétique de l' α_1 AP en présence de trypsine (fig. 12). Le dosage immunologique de l' α_1 AP des différents échantillons a été effectué après dilution de ces derniers (tableau VI). On remarque tout d'abord une sous-estimation de l' α_1 AP dosée par EID en fonction du rapport molaire I/E; au contraire, les résultats de l'INL sont beaucoup plus proches de ceux du témoin correspondant.

- Pour éviter les erreurs dues aux dilutions importantes des échantillons lors de l'essai précédent, nous avons travaillé avec des concentrations beaucoup plus faibles en α_1 AP; nous avons incubé 30 mn à température ambiante un sérum dilué au 1/100^{ème}, dont la concentration en α_1 AP a été dosée par INL, avec une solution d'élastase pancréatique de Porc ou de trypsine bovine, dans des rapports molaires I/E de (1/0,25), (1/0,5), (1/0,75) et (1/1).



1 2 3 4

Figure 11 : Etude par électrophorèse en gel de polyacrylamide alcalin de mélanges d' α_1 AP-trypsine pancréatique de boeuf dans des rapports molaires différents.

dépôts : 1 : α_1 AP native;
2 : α_1 AP/trypsine : 1/1;
3 : α_1 AP/trypsine : 0,5/1;
4 : trypsine.

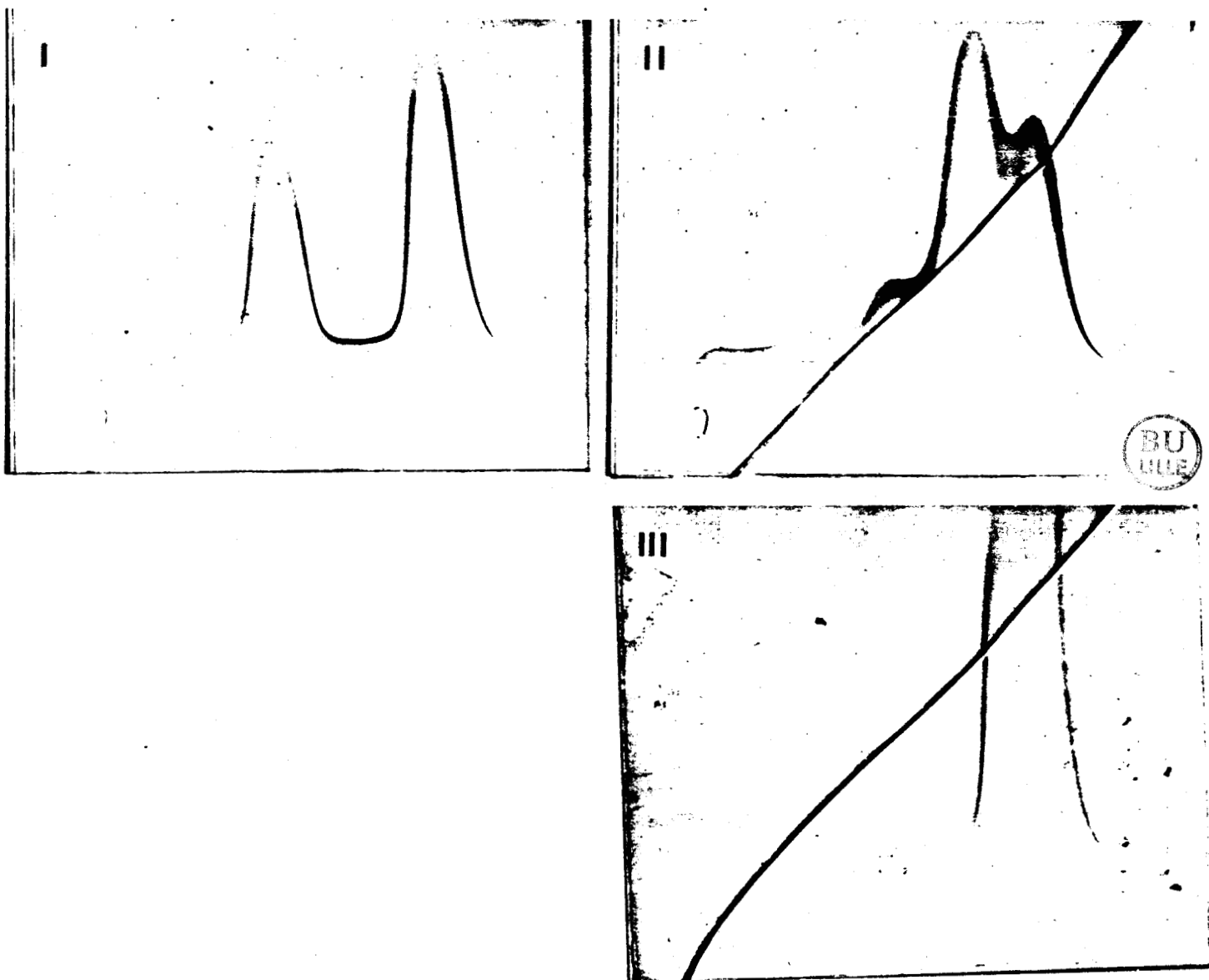


Figure 12 : Etude par immunoélectrophorèse bidimensionnelle de mélanges α_1 AP-trypsine dans des rapports molaires différents:

- IS utilisé: anti α_1 AP
- I : α_1 AP/trypsine : 1/1
- II: α_1 AP/trypsine : 0,5/1
- III: α_1 AP pure.

Tableau VI Dosage de l' α_1 AP par INL et EID après incubation avec la trypsine pancréatique de Boeuf à des rapports molaires différents

α_1 AP dosée	néphélométrie-laser	méthode de LAURELL
Témoin dilution 1/100 ^{ème}	9 mg/l	7,2 mg/l
Témoin dilution 1/50 ^{ème}	16,63 mg/l	13,7 mg/l
Mélange rapport I/E = 1/1 dilution 1/100 ^{ème}	6,69 mg/l	1,97 mg/l
dilution 1/50 ^{ème}	14,83 mg/l	4,88 mg/l
Mélange rapport I/E = 0,5/1 dilution 1/100 ^{ème}	8,06 mg/l	2,91 mg/l
dilution 1/50 ^{ème}	14,06 mg/l	6,86 mg/l



Dans une partie de chaque échantillon, la protéase est immédiatement inhibée par le PMSF (excès 100 fois molaire par rapport à la concentration en enzyme introduite) : cette fraction sert au dosage immunologique (EID et INL). Le reste est utilisé pour déterminer l'activité inhibitrice résiduelle de l' α_1 AP contre l'élastase pancréatique de Porc, par la technique qui sera développée dans le chapitre suivant. Cette activité inhibitrice diminue en fonction de la quantité de protéase ajoutée, elle est déterminée pour contrôler l'apparition de formes inactives d' α_1 AP.

Les résultats des dosages immunologiques obtenus sont reportés sur la figure 13 . Ceux-ci montrent que la concentration de l' α_1 AP est sous-estimée par EID, proportionnellement à la quantité de protéase ajoutée et donc à celle des formes non fonctionnelles de l' α_1 AP présente dans l'échantillon.

La même constatation a été faite par STOCKLEY et coll (67), pour un rapport molaire I/E inférieur à l'équivalence et un temps d'incubation inférieur ou égal à 1 heure. En effet, ces auteurs trouvent pour un rapport molaire α_1 AP/élastase leucocytaire humaine, de 0,75/1 et un temps d'incubation de 30 mn, une sous-estimation de l'ordre de 25 à 30 % . Dans notre travail, pour le même temps d'incubation et le même rapport molaire α_1 AP/trypsine bovine, ou α_1 AP/élastase pancréatique de Porc, nous constatons une sous-estimation de l'ordre de 45 % et 57 % respectivement.

Il y a donc sous-estimation quel que soit la protéase utilisée, mais à des degrés variables.

Au contraire, la néphélométrie-laser donne dans tous les cas des valeurs peu modifiées: il nous semble évident que cette technique présente un avantage sur l'électroimmunodiffusion pour le dosage de l' α_1 AP totale dans les milieux biologiques, où elle peut exister sous plusieurs formes.

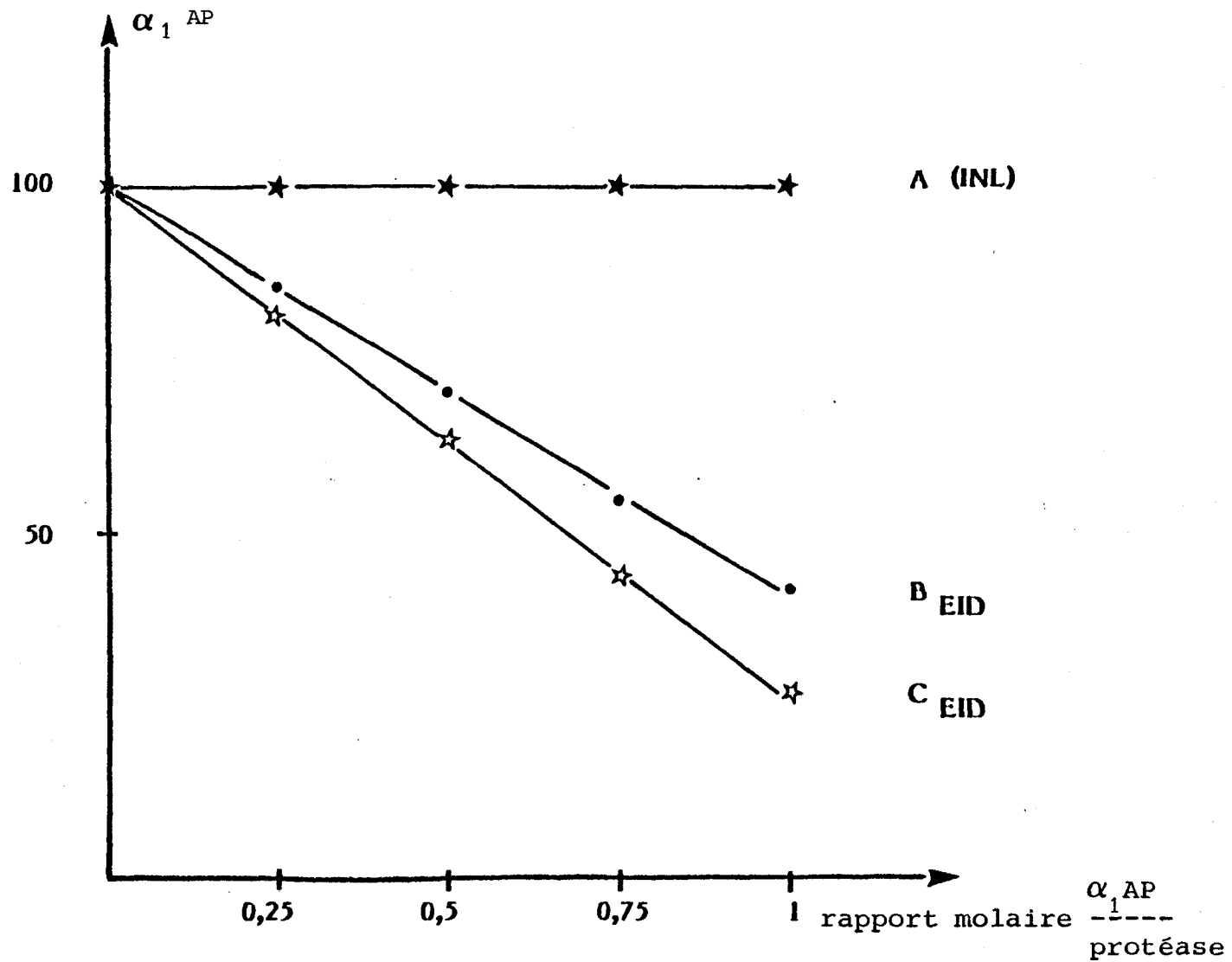


Figure 13 : Dosage de α_1 AP par INL (A) et par EID (B et C) après mélange à :



- A : l'élastase pancréatique de Porc ou la trypsine pancréatique de Boeuf
- B : l'élastase pancréatique de Porc;
- C : la trypsine pancréatique de Boeuf.

1.5 APPLICATION DES DEUX TECHNIQUES AU DOSAGE DE L' α_1 AP DANS LE LBA

Pour vérifier les résultats précédents, 55 échantillons de LBA, pris au hasard, ont été dosés par les deux techniques. Les résultats (fig. 14 A) montrent que, pour la plupart des échantillons, la corrélation apparaît satisfaisante, alors que dans les autres cas (42 %), les points figuratifs s'éloignent nettement de la ligne d'identité.

$$y = 1,18 x + 0,73 \quad (r = 0,83)$$

y : valeur obtenue par la méthode immunonéphélométrique.

x : valeur obtenue par la méthode d'électroimmunodiffusion.

Comme le montre l'équation de la droite de régression, les valeurs données par INL sont globalement supérieures à celles obtenues par EID. Cette discordance peut ainsi s'expliquer par la présence de formes modifiées de l' α_1 AP dans certains échantillons, celles-ci étant mieux prises en compte par la méthode immunonéphélométrique, alors qu'elles sont sous-estimées par EID.

En nous basant sur le fait que l' α_1 AP du plasma est essentiellement sous sa forme native, nous avons voulu contrôler l'absence de résultats discordants en dosant l'inhibiteur dans ce milieu par les deux méthodes. La figure 14 B montre les résultats obtenus à partir de 34 échantillons de plasma dilués pour obtenir des concentrations comprises entre 1 et 14 mg/l d' α_1 AP.

Il est évident que, cette fois, la corrélation est satisfaisante pour l'ensemble des échantillons.

$$y = 0,99 x + 0,76 \quad (r = 0,99)$$

La mise au point de la méthode de détermination de l'activité inhibitrice de l' α_1 AP, nous a permis de prouver ultérieurement que les échantillons de LBA pour lesquels les résultats de l'INL et de l'EID

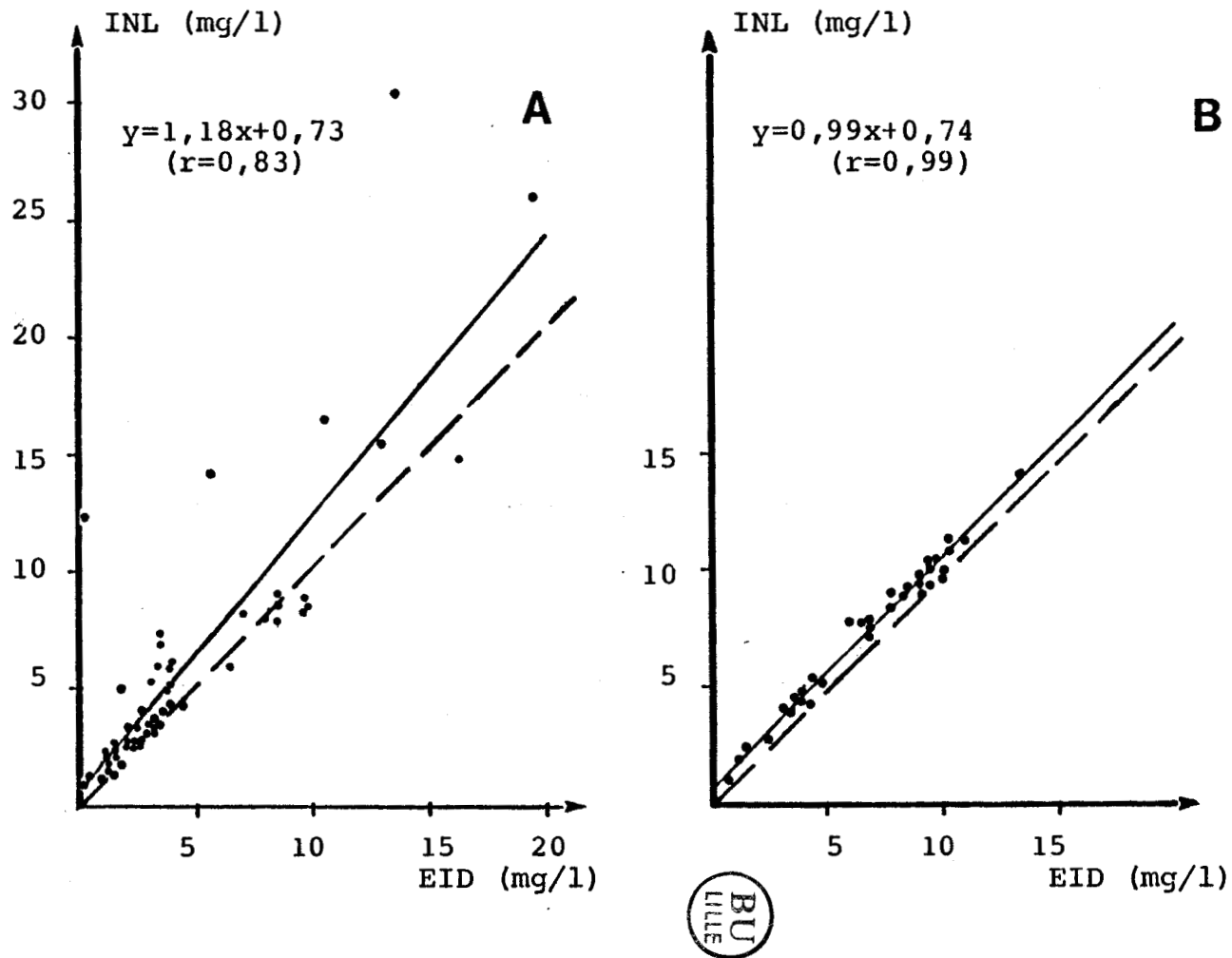


Figure 14 : Corrélation entre les résultats de dosage de l' α_1 AP, obtenus par INL et EID.

A : dans le LBA

B : dans un plasma dilué à différentes concentrations.

--- : ligne d'identité ($y = x$)



diffèrent fortement, contiennent effectivement un pourcentage important d' α_1 AP non fonctionnelle. Une relation existe entre la quantité d' α_1 AP sous-estimée par EID et la quantité d' α_1 AP non fonctionnelle présente dans le LBA (fig. 15).

1.6 CONCLUSION

L' α_1 AP peut être dosée sans concentration préalable des LBA par EID comme par INL. Le dosage de cet inhibiteur par la première méthode conduit à des résultats sous-estimés dans certains LBA. Ce fait est dû à la présence de formes non fonctionnelles d' α_1 AP. La différence entre ces résultats fournis par les deux techniques pourrait être liée soit à la qualité de l'Ac utilisé, soit à la sensibilité différente des deux méthodes aux différentes formes moléculaires de l'Ag.

En effet, HERION et coll (34) ont mis en évidence à l'aide d'Ac monoclonaux anti- α_1 AP, trois déterminants antigéniques indépendants sur la molécule d' α_1 AP. L'un d'entre eux paraît impliqué dans l'interaction entre l' α_1 AP et l'enzyme. Ainsi, l'affinité de certains Ac pour l' α_1 AP modifiée au niveau de ce déterminant pourrait être diminuée, d'où une sous-estimation possible lors du dosage de l' α_1 AP en EID.

La réponse supérieure de l'INL aux formes modifiées de l' α_1 AP peut aussi s'expliquer par la moindre sensibilité de cette méthode à la masse molaire de l'Ag.

Ainsi, DELACROIX et coll (20) ont mesuré les concentrations des préparations d'IgA monomérique (M), dimérique (D), trimérique (T) et tétramérique (Q) et aussi d'IgA sécrétoire (IgAs) par l'absorbance spécifique des protéines pures, et ils les ont comparées à celles mesurées immunologiquement, en utilisant l'immunonéphélémétrie (IN) et l'immunodiffusion radiale (IDR).

Aucune différence significative n'a été trouvée entre les concentrations données par absorbance spécifique et IN, alors que pour

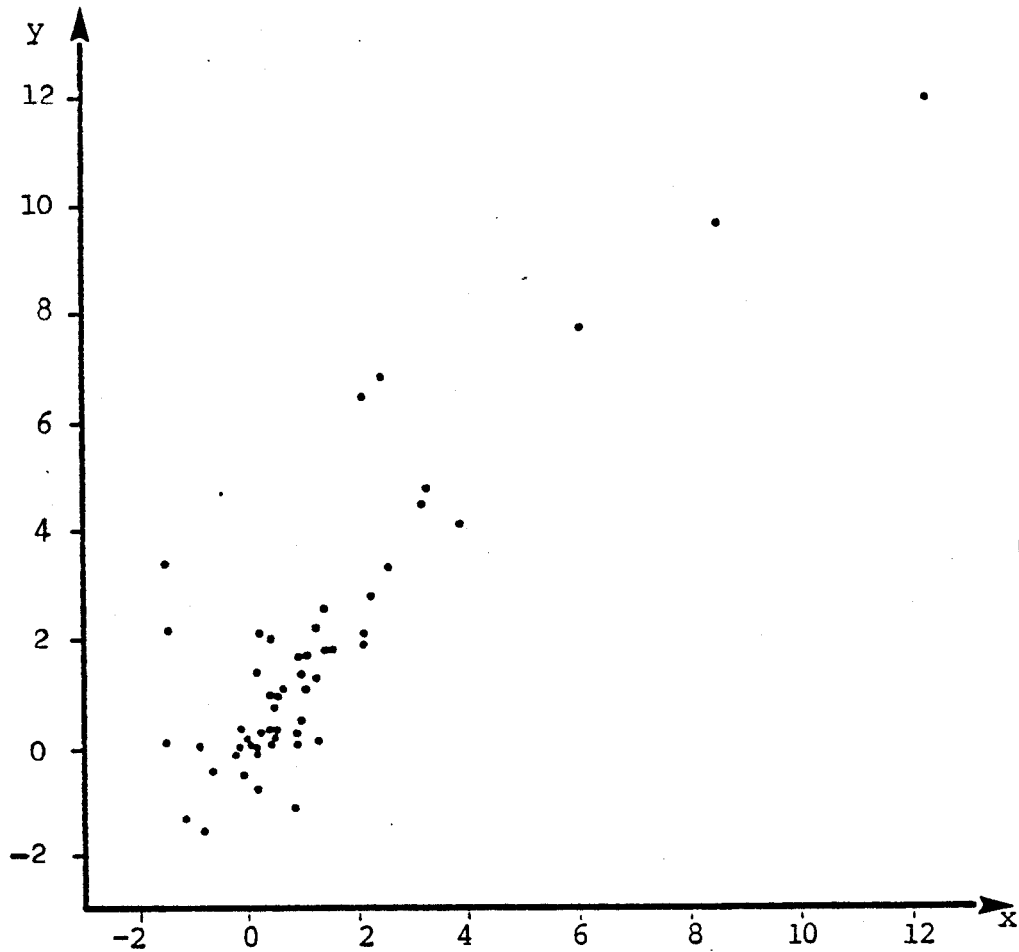


Figure 15 : x : différences entre les concentrations d' α_1 AP mesurées par INL et EID

y : concentration d' α_1 AP non fonctionnelle mesurée par la différence entre la concentration d' α_1 AP totale, déterminée par INL et d' α_1 AP fonctionnelle, mesurée par son activité antiélastasique.

Les concentrations d' α_1 AP sont exprimées en mg/l.

d'autres méthodes immunologiques, par exemple l'IDR, on constate une sous-estimation de 65 %, 54 %, 38 % et 47 % respectivement pour l'IgA (D), (T), (Q) et (IgA₅); les concentrations sont obtenues en utilisant l'IgA (M) comme standard.

De même, VALETTE et coll (80) dosant l'haptoglobine (Hp), ont constaté une sous-estimation de Hp₁₋₁ de 40 % par IDR quand Hp₂₋₁ est utilisé comme standard. Au contraire, le dosage par IN donne des résultats beaucoup moins sous-estimés (7 %).

L'IN semble donc préférable pour doser les Ag susceptibles d'être présents sous plusieurs formes moléculaires, et, est donc bien adaptée à l'étude de l' α_1 AF dans les LBA.

2 DOSAGE DE LA FRACTION FONCTIONNELLE DE L' α_1 -ANTIPROTEASE

2.1 GENERALITES

2.1.1 Principe général du dosage de l' α_1 AP fonctionnelle

La détermination immunologique de la concentration en α_1 AP, basée sur l'utilisation d'un Ac, dose un Ag, l' α_1 AP, quelle que soit sa forme:

- l' α_1 AP native, fonctionnellement active
- l' α_1 AP plus ou moins modifiée.

Le dosage de l'activité inhibitrice révèle seulement l' α_1 AP fonctionnelle. Le dosage de cette activité antiprotéasique se déroule en deux étapes successives :

- dans un premier temps, la protéase est ajoutée en excès aux échantillons contenant l'inhibiteur. Il se forme un complexe enzyme-inhibiteur non fonctionnel.

- dans un second temps, on ajoute le substrat, la protéase en excès hydrolyse ce dernier. La capacité inhibitrice de l' α_1 AP est inversement proportionnelle à la quantité de substrat hydrolysé.

2.1.2 Dosage de l' α_1 AP dans le sérum

Historiquement, pour le dosage de l' α_1 AP fonctionnelle dans le sérum, la trypsine pancréatique de Boeuf a été employée, car elle peut être obtenue plus aisément à l'état pur et dosée facilement à l'aide de substrats synthétiques. D'autres enzymes ont été également utilisés comme la chymotrypsine, ou plus récemment, l'élastase pancréatique de Porc, car cette protéase, déjà commercialisée, est plus spécifique de l' α_1 AP que la trypsine. Cette dernière est aussi inhibée par l'inter- α -trypsine inhibiteur et par l'antithrombine III. De plus, BIETH et coll (9) ont décrit pour l'élastase un substrat synthétique le N-succinyl-L-alanyl-L-alanyl-L-alanyl-paranitroanilide (Suc-(Ala)₃-pNA). Celui-ci présente une bonne spécificité pour l'élastase pancréatique de Porc et permet un dosage sensible, facilité par le faible niveau de son hydrolyse spontanée.

2.1.3 Dosage de l'activité inhibitrice de l' α_1 AP dans le LBA

Les méthodes habituellement choisies pour le dosage immunologique de l' α_1 AP des LBA, nécessitent une concentration préalable de ces derniers. Dans ces conditions, l'activité inhibitrice de l' α_1 AP a été déterminée, à partir des LBA déjà concentrés (tableau VII).

Cependant, dans certains cas, il est possible de travailler avec des LBA non concentrés.

Ainsi, STONE et coll (73) ont dosé, dans ces conditions, l' α_1 AP fonctionnelle en travaillant avec des protéases marquées. Ils ont utilisé l'élastase pancréatique de Porc (EPP) marquée au [3 H] ou l'élastase leucocytaire humaine (ELH) marquée à [125 I].

La quantité de complexe élastase- α_1 AP formé, qui est proportionnelle à celle de l' α_1 AP fonctionnelle présente dans le milieu, est évaluée après isolement par chromatographie de gel filtration.

McGUIRE et coll (52) ont mesuré cette activité en incubant le LBA avec la trypsine marquée à [25 I]. Ils ont approximativement évalué la quantité du complexe par autoradiographie, après séparation des différentes formes par électrophorèse sur gel de polyacrylamide, en présence de SDS.

Il nous a semblé intéressant d'évaluer la sensibilité des méthodes chromogéniques de dosage pour les appliquer au LBA, en évitant les risques d'erreur dus à la concentration préalable.

Le choix de la protéase utilisée est d'une importance capitale. En effet, l' α_1 AP fonctionne in vivo comme inhibiteur d'élastase leucocytaire, mais cet enzyme non commercialisé est inhibé par d'autres antiprotéases du poumon, comme indiqué plus haut (tableau I, page 33).

Les auteurs (14,26) qui ont utilisé cette protéase pour doser l' α_1 AP fonctionnelle dans les LBA, ont déterminé l'activité antiélastasique avant et après élimination de l' α_1 AP par des immunoglobulines spécifiques de cet inhibiteur. Par différence, ils ont déterminé la concentration de l' α_1 AP fonctionnelle dans les échantillons.

Tableau VII

Auteurs	L B A concentré	Enzyme utilisé	Substrat	Méthode
BOUDIER (11)	Oui	E P P	Suc-(Ala) ₃ -pNA	Absorbance
COCHRANE (16)	Oui	E P P	Suc-(Ala) ₃ -pNA	à 410 nm
MORRISON (55)	Oui	E P P	Suc-(Ala) ₃ -pNA	
STOCKLEY (72)	Oui	E P P	Suc-(Ala) ₃ -pNA	
CARP (14)	Oui	E P P et E L H	Suc-(Ala) ₃ -pNA	
GADEK (26)	Oui	E L H	³ H -élastine	Comptage de la radioactivité libérée
STONE (73)	Non	³ H - E P P et ¹²⁵ I - E L H		Comptage du complexe* séparé par gel filtration
Mc GUIRE (52)	Non	¹²⁵ I - Trypsine		Autoradiographie après PAGE-SDS

Au contraire, dans le LBA, l'élastase pancréatique de Forc ne semble inhibée que par l' α_1 AP, car la présence de l'inhibiteur de faible PM, BSI-E (tableau I) ne paraît pas définitivement établie dans ce milieu. De plus, cette élastase n'est pas sensible à la présence des inhibiteurs bronchiques acido-stables. Enfin, l' α_2 M est rarement détectable dans le LBA.

Dans ces conditions, et en utilisant le protocole proposé par BIETH (9), nous avons automatisé le dosage dans le double but d'en améliorer la précision et la sensibilité, afin qu'il puisse être directement appliqué aux LBA non concentrés et réalisé en grandes séries pour permettre une enquête clinique élargie.

2.2 LA METHODE AUTOMATIQUE SUR ABA 100

2.2.1 Description de l'appareil

Nous avons utilisé un analyseur automatique ABA 100 (Abbott Bichromatic Analyzer), qui se compose de deux éléments de base :

- L'analyseur ou module de traitement, qui prend en charge les opérations nécessaires à l'analyse elle-même. Il comporte un photomètre, un dispositif de distribution et un portoir cylindrique ou carroussel de 32 postes pour les godets-échantillon. Ce portoir reçoit aussi une multicuve en son centre; la multicuve est maintenue à 30 ° C grâce à un bain-marie thermostaté.

- Le module électronique (ou unité de commande), qui comprend le panneau de commande, les circuits électroniques, le calculateur et les éléments nécessaires à l'affichage des données et du résultat.

L'ABA 100 réalise une analyse bichromatique, c'est-à-dire qu'il mesure la différence d'absorption d'un chromophore entre deux longueurs d'onde présélectionnées : une longueur d'onde est proche du pic d'absorption du chromophore (point de transmission minimale) et l'autre se situe sur le côté de ce pic. Les rayons lumineux passent alternativement à travers la même cellule-échantillon: ceci permet de minimiser les erreurs causées par les facteurs tels que poussières et turbidité, mauvais alignement optique et variation de la sensibilité du détecteur.

Ainsi, grâce à ce système, l'instrument fournit une précision et une exactitude beaucoup plus grandes que celles obtenues avec un spectrophotomètre monochromatique.

2.2.2 Les conditions opératoires

Dans un premier temps, 25 μ l de chaque échantillon sont prélevés, puis distribués simultanément avec 250 μ l d'une solution d'EPP dans un tampon

Tris/HCl 0,2 M, pH 8,0, dans un compartiment de la multicuve. La pression du jet de réactif assure le mélange lors de la dispensation effectuée par le plateau de dilution 1/11^{es}. Vingt minutes après cette opération, 250 µl de la solution de Suc-(Ala)₃-pNA sont distribués dans chaque compartiment.

Après une incubation de 5 mn, la quantité de paranitroaniline libérée, colorée en jaune, est mesurée. Elle est proportionnelle à l'élastase présente dans le milieu. Le mécanisme de cette réaction d'hydrolyse est résumé dans la figure 16.

L'activité inhibitrice est obtenue en retranchant de la valeur du témoin, déterminée en l'absence d'inhibiteur, le résultat du dosage de chaque échantillon.

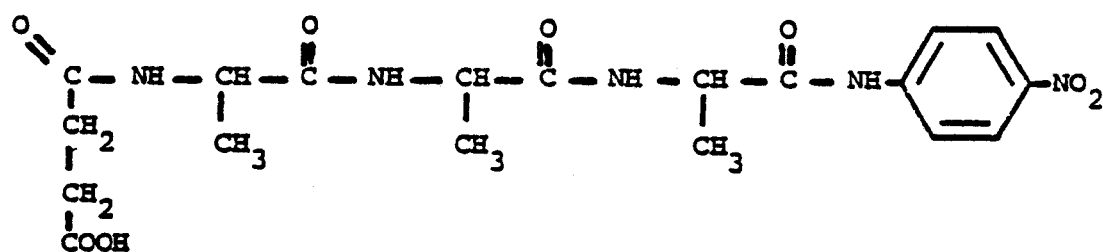
L'introduction d'un facteur de calibration dans le calculateur de l'ABA 100, permet d'exprimer les résultats en unités internationales par litre de LBA: 1 UI correspond à une micromole de paranitroaniline libérée par minute à partir du Suc-(Ala)₃-pNA. Ce facteur dépend du coefficient d'absorption du chromogène libéré et de l'appareil (voir appendice technique).

2.2.3 Les différents stades de la mise au point de la méthode

a- Choix de la concentration d'élastase

Celle-ci est fonction de la quantité d' α_1 AP que l'on peut s'attendre à trouver dans les LBA. Il est nécessaire de travailler dans une zone de concentration où l'activité mesurée est proportionnelle à la concentration en inhibiteur. Cette condition est généralement respectée par une inhibition allant jusqu'à 80 % de la quantité d'enzyme mise en jeu (11).

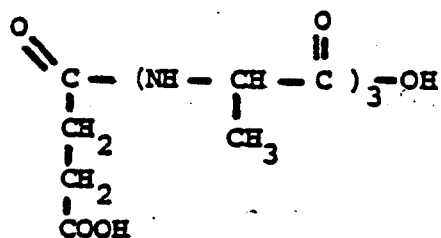
Etant donné que la réaction, élastase- α_1 AP se fait mole à mole, la concentration d'EPP que nous avons choisie ($33,36 \cdot 10^{-9}$ M) permet de doser des quantités d' α_1 AP fonctionnelle inférieures à 14,4 mg/l de LBA (soit $26,69 \cdot 10^{-9}$ M dans le milieu d'incubation)



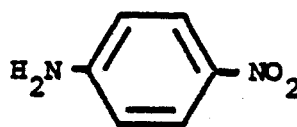
Suc - (Ala)₃ - pNA

élastase

H₂O



Suc - (Ala)₃ - OH



paranitroaniline

Figure 16 : Mécanisme d'hydrolyse du substrat Suc-(Ala)₃-pNA en présence d'élastase.

b- Choix de la concentration de substrat

Nous avons utilisé une concentration finale de Suc-(Ala)₃-pNA de l'ordre de 1 mM, en nous référant au travail effectué par BIETH (9).

Four différentes concentrations d'élastase encadrant la concentration d'enzyme choisie pour le dosage de l' α_1 AP, nous avons mesuré l'activité, 5, 10, 15 et 20 minutes après déclenchement de la réaction enzyme-substrat. La figure 17 montre classiquement que pour les faibles concentrations d'enzyme, la réaction évolue linéairement en fonction du temps, alors qu'à fortes concentrations, la réaction n'est plus linéaire.

Pour la concentration en enzyme utilisée lors du dosage, la linéarité en fonction du temps est satisfaisante jusqu'à 20 mn.

Lors du dosage de l' α_1 AP dans les LBA, les concentrations d'élastase mesurées sont comprises entre $4,24 \cdot 10^{-9}$ M et $30,33 \cdot 10^{-9}$ M. Par dilution de la solution d'élastase, une gamme a été préparée dans cette zone de concentration. Aux erreurs de dilution près, l'activité mesurée est proportionnelle à la quantité d'enzyme présente dans le milieu, quand cette activité est mesurée pendant les cinq premières minutes de l'incubation (fig. 18).

c- Le témoin enzyme

En solution diluée, l'élastase tend à s'adsorber sur le verre; de plus, son activité est sensible aux variations de force ionique (74). Afin de vérifier si le milieu utilisé pour le dosage influence l'activité de l'enzyme, celle-ci a été mesurée dans diverses conditions.

Une augmentation de 10 % est ainsi constatée en présence d'une faible quantité de SA; cette augmentation paraît indépendante de la quantité de SA quand celle-ci est comprise entre 50 et 300 mg/l dans la solution échantillon.

Dans ces conditions, les témoins enzyme sont obtenus en remplaçant le LBA-échantillon par une solution dans le NaCl 0,14 M de SA à 150 mg/l, ce

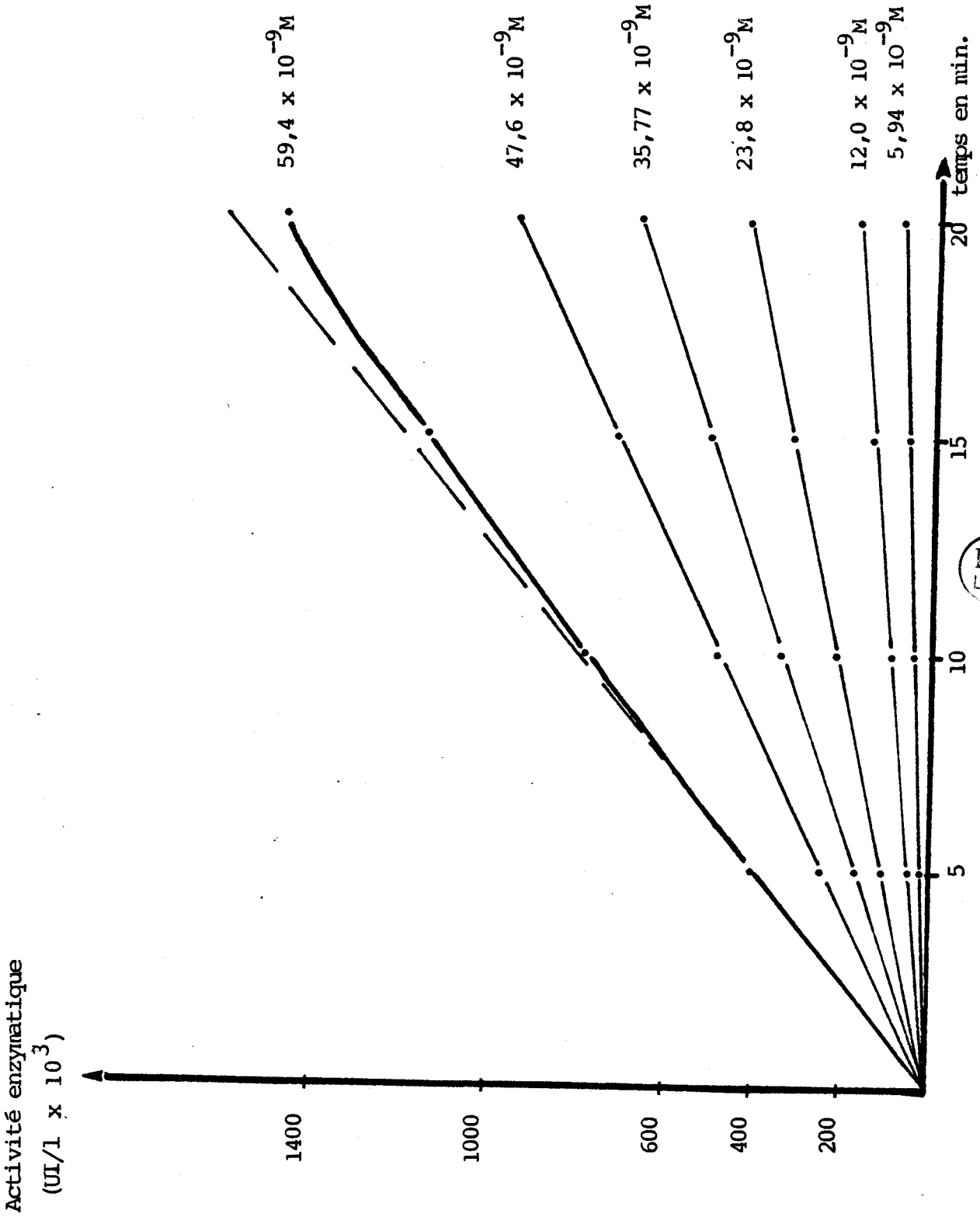


Figure 17 : Influence de la concentration en élastase pancréatique de Porc sur la vitesse d'hydrolyse du substrat Suc-(Ala)₃-pNA.

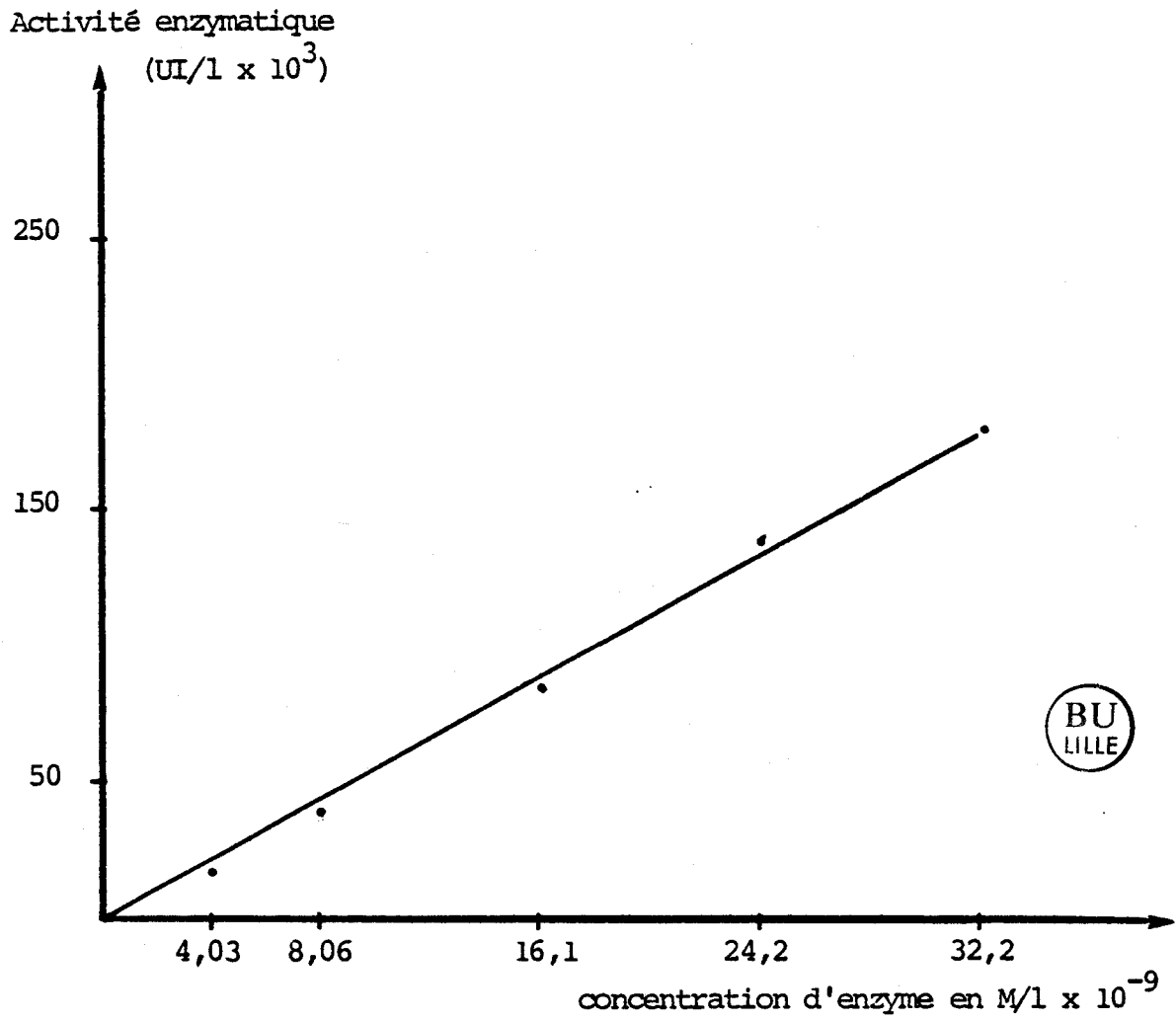


Figure 18 : Etude de la linéarité de la réaction élastase-substrat.

qui correspond à la concentration moyenne des protéines retrouvées dans le LBA. Cette précaution diminue les pertes de l'activité élastasique qui pourraient être dues à l'adsorption sur les parois de la multicuve ou à une autolyse de l'enzyme pendant l'incubation. Le même effet a été signalé pour l'élastase leucocytaire humaine (83). On remarque aussi que WYSS et coll (88) utilisent une solution d'élastase pancréatique de Porc contenant de la SA pour le dosage de l'activité inhibitrice de l' α_1 AP.

d- Temps de préincubation enzyme-inhibiteur

L'exactitude du dosage de l' α_1 AP fonctionnelle ne peut être obtenue que si l'association entre l' α_1 AP et l'EPP est complète, c'est-à-dire si le mélange a été préincubé assez longtemps avant l'addition du substrat. L'association entre l'EPP et l' α_1 AP n'est pas immédiate aux faibles concentrations d'élastase (11).

Le temps de préincubation peut être déduit, selon BOUDIER et coll (11) de la constante d'association de la réaction ($K_{ass} = 10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$) et de la concentration initiale en élastase (E^0) dans le milieu d'incubation ($E^0 = 33,36 \cdot 10^{-9} \text{ M}$). Pour une réaction équimolaire et irréversible (ce qui est le cas de la réaction entre l' α_1 AP et l'EPP), la demie-vie de la formation du complexe est égale à $\frac{1}{K_{ass} \times E^0} = 300 \text{ s}$.

Le temps de préincubation que nous avons utilisé (20 mn) représente 4 fois la demie-vie de la réaction et est, par conséquent, suffisant pour assurer une association satisfaisante entre l'élastase et l' α_1 AP. Ceci a été vérifié en incubant pendant des temps variables, 5, 10, 20 et 30 mn, l'enzyme avec des quantités croissantes d' α_1 AP pure . Les courbes d'inhibition exprimant l'activité inhibitrice en pourcentage de l'activité du témoin sans inhibiteur, et en fonction de la concentration relative en α_1 AP, sont tracées dans la figure 19 . Elles montrent que l'allongement du temps d'incubation à 30 mn, soit 6 fois la période (11), ne modifie pas sensiblement la qualité des résultats obtenus.

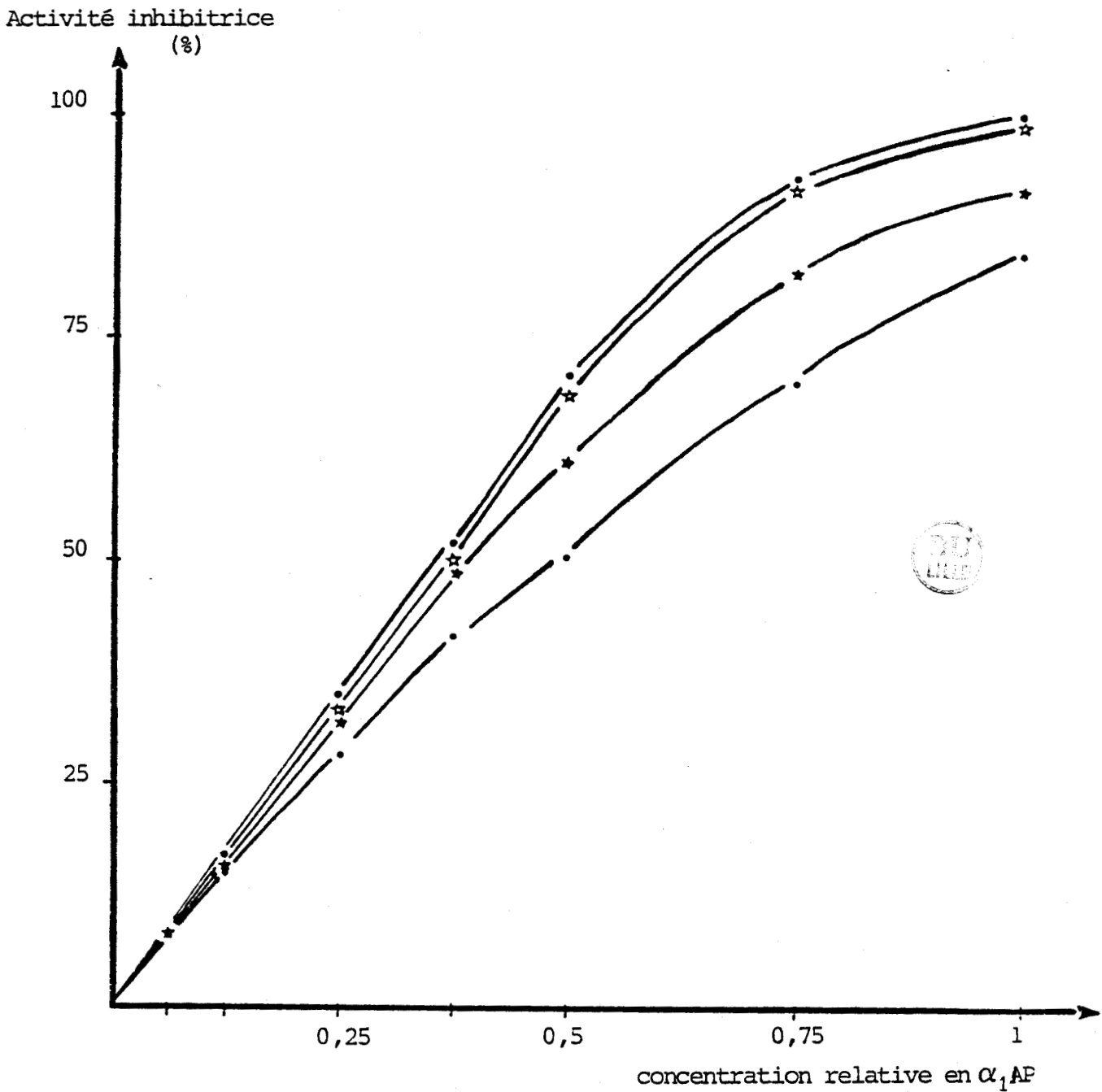


Figure 19 : Détermination du temps de pré-incubation Enzyme-Inhibiteur. L'activité inhibitrice est exprimée en pourcentage de l'activité du témoin sans inhibiteur.

- : - incubation E-I pendant 5 minutes;
- : - " " " 10 "
- : - " " " 20 "
- : - " " " 30 "

2.2.4 Application aux LBA

a- Spécificité du dosage de l' α_1 AP dans le LBA

Nous avons cherché à vérifier que l'activité mesurée dans les LBA est spécifiquement celle de l' α_1 AP. Pour ce faire, nous avons utilisé pour neutraliser l' α_1 AP, des immunoglobulines de Lapin anti α_1 AP Dako, dont 1ml neutralise $300 \pm 30 \mu\text{g}$ d' α_1 AP. 20 μl de cette solution d'anticorps sont ajoutés à 200 μl d'échantillon contenant des quantités croissantes d' α_1 AP purifiée. Après incubation de 10 mn à 25 °C, l'activité inhibitrice est mesurée.

La figure 20 montre que l' α_1 AP est inhibée totalement jusqu'à une concentration de 60 mg/l dans l'échantillon. Nous avons vérifié aussi que ces IgG ne modifient pas l'activité élastasique, mesurée en absence d' α_1 AP.

L'activité inhibitrice de 28 LBA a été déterminée après incubation en présence de l'anticorps dans les mêmes conditions, la prise d'essai contenant une quantité d' α_1 AP, dosée immunologiquement, inférieure à 20 mg/l. Dans 16 échantillons, l'activité disparaît totalement, elle est donc due intégralement à la présence de l' α_1 AP.

Dans les autres LBA, la présence d'inhibiteurs différents de l' α_1 AP est probable.

b- Expression des résultats du dosage de l' α_1 AP fonctionnelle

Nous avons voulu exprimer les concentrations en α_1 AP fonctionnelle en mg/l de LBA. Celles-ci peuvent être calculées en se référant à la quantité d'élastase inhibée ou à un étalon d' α_1 AP titré.

Dans le premier cas, on se base sur le fait que la réaction élastase- α_1 AP se fait mole à mole; connaissant le pourcentage d'inhibition de l'élastase par l' α_1 AP, par rapport à l'activité du témoin enzyme dont la concentration en élastase est connue, on peut déterminer le nombre de moles d'enzyme inhibées pour chaque échantillon. Ce dernier correspond au nombre

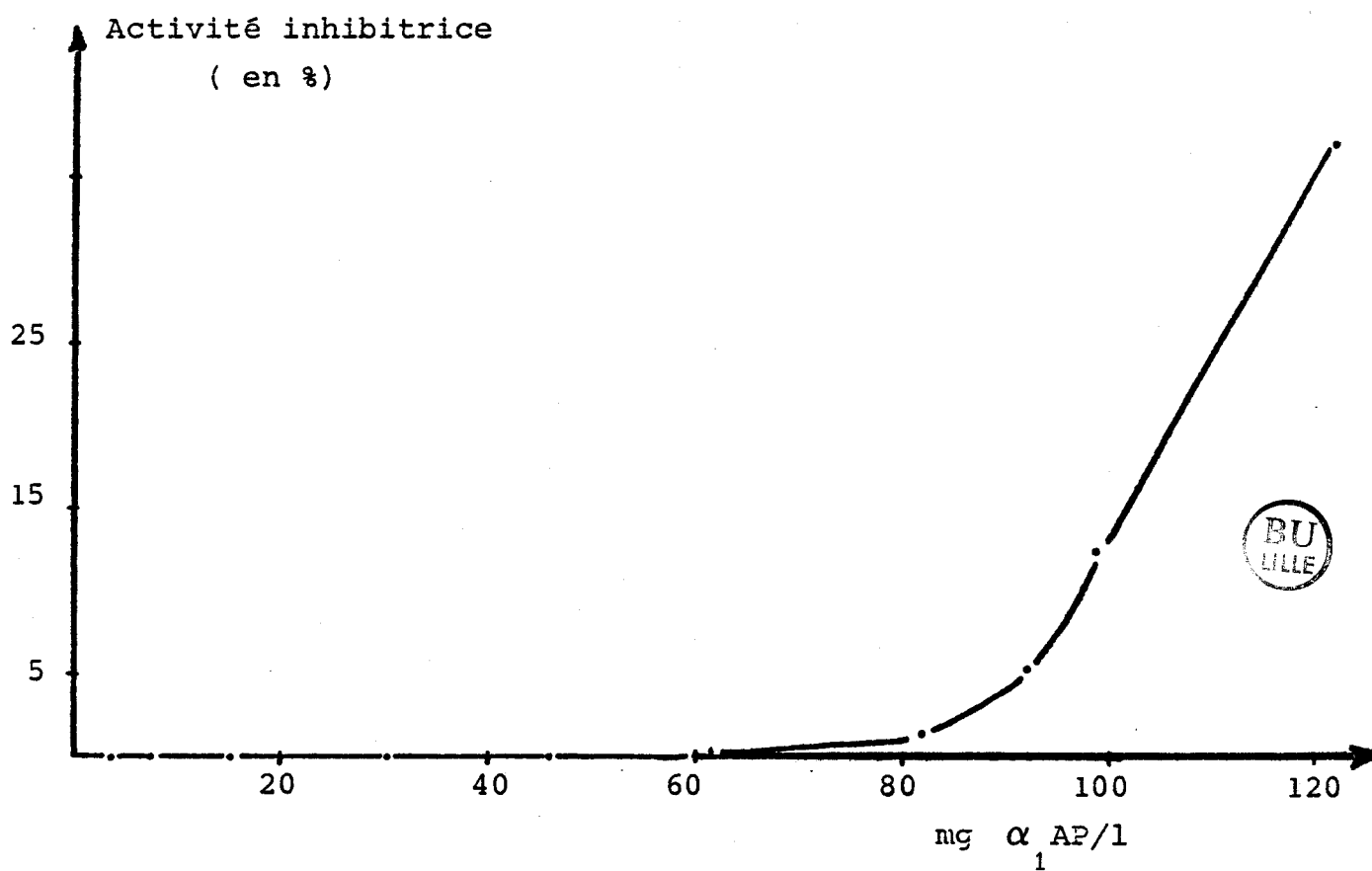


Figure 20 : Inhibition de 200 μ l d'une solution d' α_1 AP pure à différentes concentrations par 20 μ l d'IgG anti α_1 AP Dako. L'activité inhibitrice est exprimée en pourcentage de l'activité du témoin élastase.

de moles d' α_1 AP fonctionnelle. La concentration en mg/l d'inhibiteur fonctionnel est obtenue en multipliant le nombre de moles d' α_1 AP fonctionnelle par sa masse moléculaire.

Dans le deuxième cas, le nombre de mg/l d' α_1 AP fonctionnelle peut aussi être déterminé en se rapportant à un inhibiteur-étalon, dont la concentration est préalablement déterminée contre une protéase titrée. Pour notre travail, nous avons utilisé un étalon d' α_1 AP purifiée qui est introduit dans chaque série de dosages.

Dans les deux cas, l'exactitude du dosage dépend de la détermination du titre exact de l'élastase pancréatique de Forc. Une solution de cet enzyme a été préparée, dont la concentration molaire est déterminée à partir de son coefficient d'absorption molaire, $\epsilon = 52000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, son titre a été estimé à 95 % d'activité (10).

* Titre de l' α_1 AP

Une gamme de concentrations croissantes en α_1 AP, préparée par dilution dans une solution de SA à 150 mg/l, a été dosée par immunonéphélémétrie-laser et l'activité inhibitrice a été mesurée dans les conditions précédemment décrites.

La courbe d'inhibition exprimant le pourcentage d'activité résiduelle de l'élastase en fonction du rapport molaire I/E (α_1 AP immunoréactive / élastase) est tracée. Le pourcentage d' α_1 AP fonctionnelle est calculé en multipliant par 100 l'inverse de la valeur du rapport molaire, déterminé par extrapolation de la droite d'inhibition jusqu'à l'axe des abscisses. Ce rapport correspond à l'inhibition complète d'une mole d'enzyme par 1,83 mole d'inhibiteur immunoréactif (fig. 21).

Cette figure montre que l' α_1 AP purifiée selon (7) est active à 55 %, soit $(1/1,83) \times 100$, elle montre aussi que la droite d'inhibition est

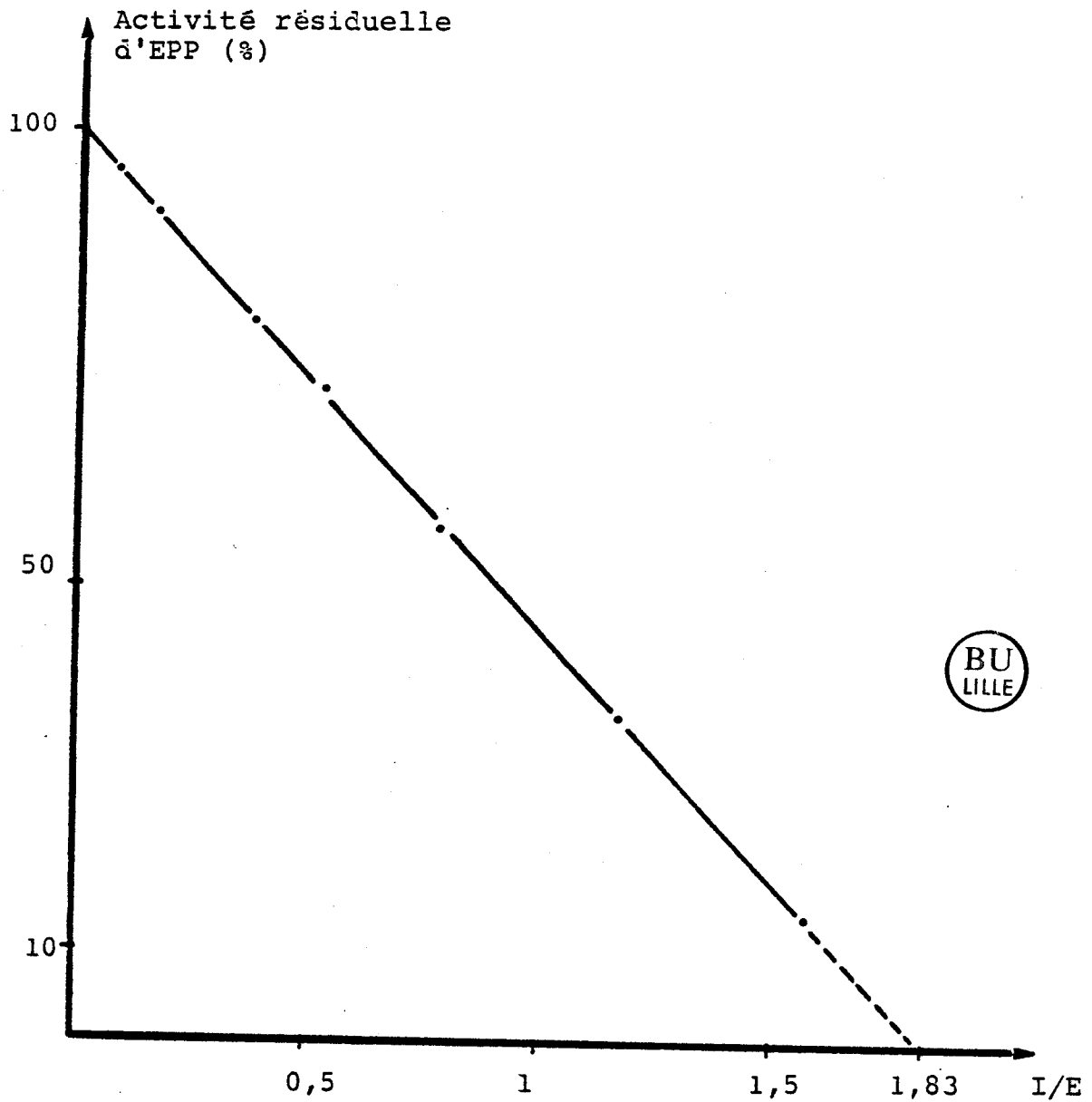


Figure 21 : Droite d'inhibition de l'élastase pancréatique de Porc par l' α_1 AP purifiée, diluée dans une solution de S.A. à 150 mg/l.

L'axe des abscisses représente le rapport molaire $\frac{\alpha_1 \text{ AP immunoréactive}}{\text{EPP active}}$.

linéaire jusqu'au moins 85 % d'inhibition. Donc, seuls les LBA présentant une capacité d'inhibition inférieure à cette valeur pourront être dosés directement; au delà, le LBA est dosé à nouveau après dilution.

Il est à noter qu'en absence de SA, les points figuratifs sur la droite d'inhibition ne sont pas alignés pour les faibles concentrations en α_1 AP. L'activation de l'élastase par la SA a été précédemment signalée (21).

La même méthode a été appliquée au dosage de l' α_1 AP d'un plasma dilué. La courbe d'inhibition (fig. 22) montre un point d'équivalence de l'ordre de 1,01. L' α_1 AP du plasma analysé est donc active à 99 % . Ce résultat est en accord avec celui de BOUDIER et coll (11), ce qui vérifie indirectement l'exactitude de la méthode décrite. Il faut cependant, signaler que la présence d' α_1 AP oxydée a été déterminée dans le plasma de certains fumeurs (40).

Il a été vérifié que les courbes d'inhibition étant linéaires, il est possible de doser l' α_1 AP fonctionnelle des LBA sur un point. Le pourcentage d'activité peut être alors déterminé si l'on tient compte de la concentration d' α_1 AP dosée immunologiquement.

Cette technique a été appliquée à 2 LBA, non concentrés, pris au hasard, et au plasma précédemment analysé, dilué au $1/200^{\text{ème}}$. Les résultats obtenus montrent que l' α_1 AP des 2 LBA est active respectivement à 73 % et à 52 % , alors que celle du plasma est active à 95 % .

Après concentration préalable sur membrane AMICON PM 10, les courbes d'inhibition ont été obtenues pour les mêmes LBA (fig. 22); les points d'équivalence correspondant montrent un pourcentage d' α_1 AP fonctionnelle respectivement de l'ordre de 85 % et 56 % . Ces résultats, dans les limites de précision des méthodes utilisées pour le dosage de l' α_1 AP totale (INL) et fonctionnelle (ABA 100), sont en bon accord avec ceux obtenus par dosage direct. Le pourcentage d' α_1 AP fonctionnelle peut donc être déterminé directement sur les LBA, sans concentration préalable.

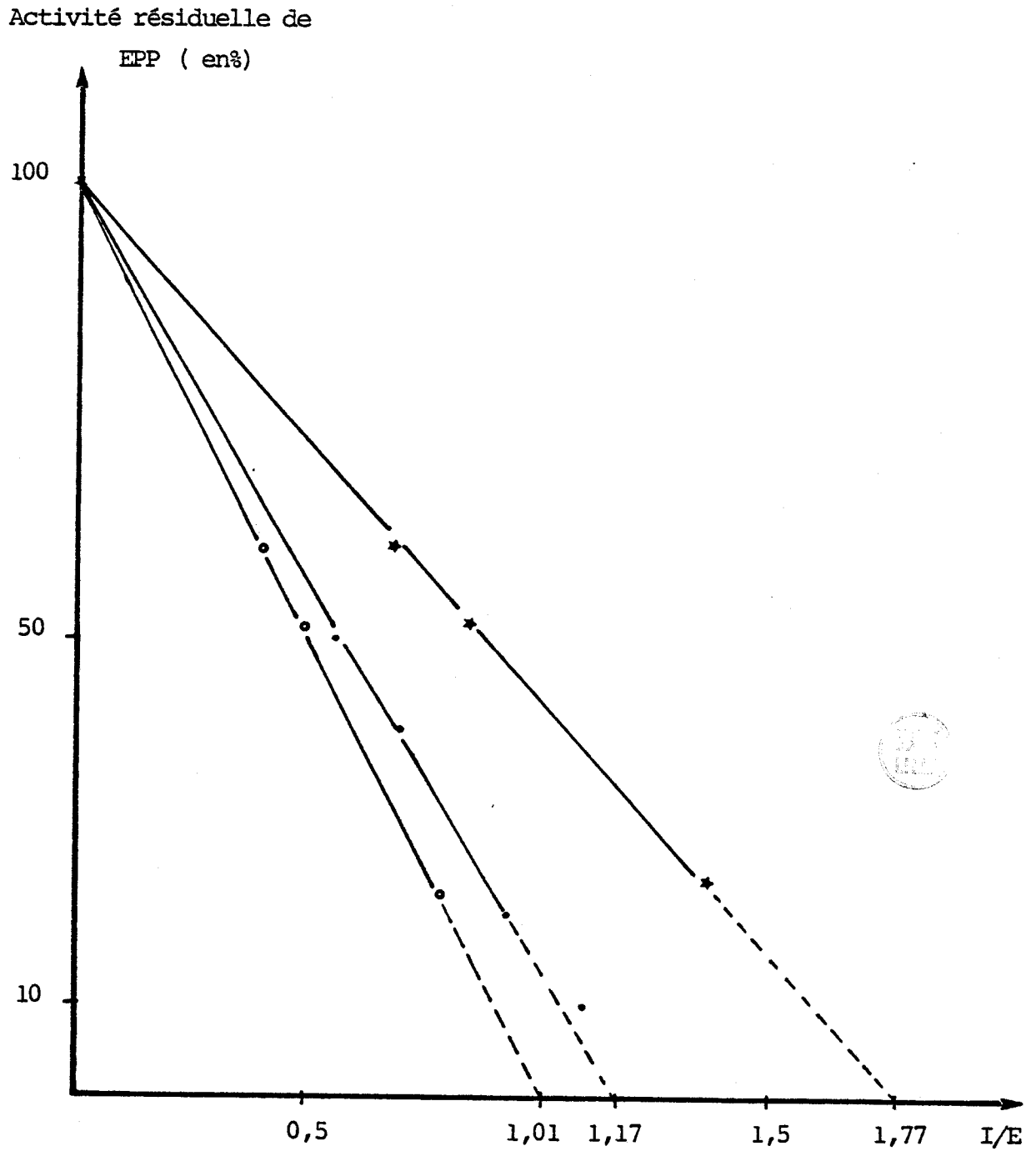


Figure 22 : Droite d'inhibition de l' EPP par l' α_1 AP :

- : d'un plasma dilué
- : de deux LBA, pris au hasard, concentrés
- ★ : au préalable.

2.2.5 Critères de qualité de la méthode de dosage de l' α_1 AP fonctionnelle

Ils sont appréciés, comme nous l'avons fait pour l'INL et l'EID, par la détermination de la répétabilité intrasérielle, de la reproductibilité intersérielle, de la limite de détection et de l'exactitude.

L'analyse statistique des résultats obtenus permet de constater que les coefficients de variation de la reproductibilité et de la répétabilité sont très satisfaisants (tableau VIII).

La limite de détection est établie à partir d'essais à blanc par dosage répété dans une même série de la solution d'enzyme, en l'absence d'inhibiteur.

La limite de détection est calculée à partir de l'écart-type déterminé sur 30 mesures de blanc. Dans ce cas particulier :

$$x = \bar{x} - 3\sigma = 121,9 - (3 \times 0,607) = 120$$

On peut considérer que 120 est la valeur limite qui peut être interprétée. Celle-ci correspond à 0,3 mg/l d' α_1 AP fonctionnelle.

L'exactitude a été évaluée par la méthode des ajouts dosés : à 450 μ l de LBA à analyser, on ajoute 50 μ l d'une solution de SA à 150 mg/l contenant ou non une surcharge de 4,3 mg/l d' α_1 AP pure. Un témoin est effectué par mélange de 450 μ l de la même solution de SA et de 50 μ l de solution contenant la surcharge d' α_1 AP.

Les pourcentages de récupération indiqués dans le tableau IX, sont très satisfaisants.

La méthode de dosage que nous avons automatisée nous semble fiable. ELLE est en mesure de permettre la réalisation d'enquêtes cliniques.

Tableau VIII Précision du dosage de l' α_1 AP fonctionnelle dans le LBA

	Répétabilité intrasérielle sur un même LBA	Reproductibilité intersérielle
nombre de mesure n	25	32
moyenne en mg/l \bar{x}	7,76	5,61
écart type σ	0,07	0,19
coefficient de variation CV	0,87 %	3,33 %

Tableau IX Exactitude du dosage de l' α_1 AP fonctionnelle
(méthode des ajouts dosés)

L B A	concentration en α_1 AP en mg/l	concentration après surcharge avec 2,82 mg/l d' α_1 AP fonction- nelle	% de récupération
Témoin	0	2,82	100 %
1	9,39	11,89	88 %
2	3,13	6,05	103 %
3	7,40	10,12	96 %
4	3,34	6,05	96 %
5	4,07	7	104 %
6	3,23	5,94	96 %
7	3,44	6,26	100 %
8	2,19	4,90	96 %
9	4,38	7,30	103 %
10	5,84	8,45	92 %
récupération moyenne \pm 1 SD		2,76 \pm 0,14 mg/l	
% de récupération \pm 1SD		98 \pm 4,96	



3 ETUDE GENERALE DES DIFFERENTS LBA

3.1 L' α_1 AP IMMUNOREACTIVE

Les méthodes de dosage précédemment décrites ont été appliquées à l'étude de l' α_1 AP de 283 LBA, collectés dans le Département de Pneumologie, Hôpital Calmette, Lille (Pr VOISIN). Toutes les déterminations ont été effectuées 2 fois.

23 % des LBA présentent des concentrations en α_1 AP totale inférieures à 1 mg/l, seuil de sensibilité du dosage de l' α_1 AP par INL. La figure 23 montre que pour la plupart des échantillons (52 %), la concentration de l' α_1 AP est comprise entre 1 et 4 mg/l.

Pour tenir compte de la dilution variable des liquides de lavage recueillis, il est habituel d'exprimer les concentrations d' α_1 AP par rapport à une substance de référence. Pour ce faire, les protéines totales ont été dosées par la méthode de BRADFORD adaptée à l'analyseur automatique ABA 100 (12) ; (cette méthode est développée dans l'appendice technique)

La figure 24 montre que pour les LBA présentant une concentration d' α_1 AP supérieure à 1 mg/l, celle-ci représente au maximum 90 μ g/mg de protéines totales. 25 % des échantillons présentent une concentration comprise entre 20 et 30 μ g/mg. Les autres se répartissent également au dessus et en dessous de ces limites.

Certains auteurs (14,26,69) utilisent comme substance de référence la sérum-albumine (SA), le plus souvent dosée par EID ou IDR.

Pour 52 LBA de concentration connue en α_1 AP et en protéines totales, la SA a été dosée par immunonéphélométrie-laser. La répartition des valeurs de concentration d' α_1 AP est nettement plus resserrée quand on se réfère aux protéines totales plutôt qu'à la SA (fig. 25). Ceci correspond au fait que

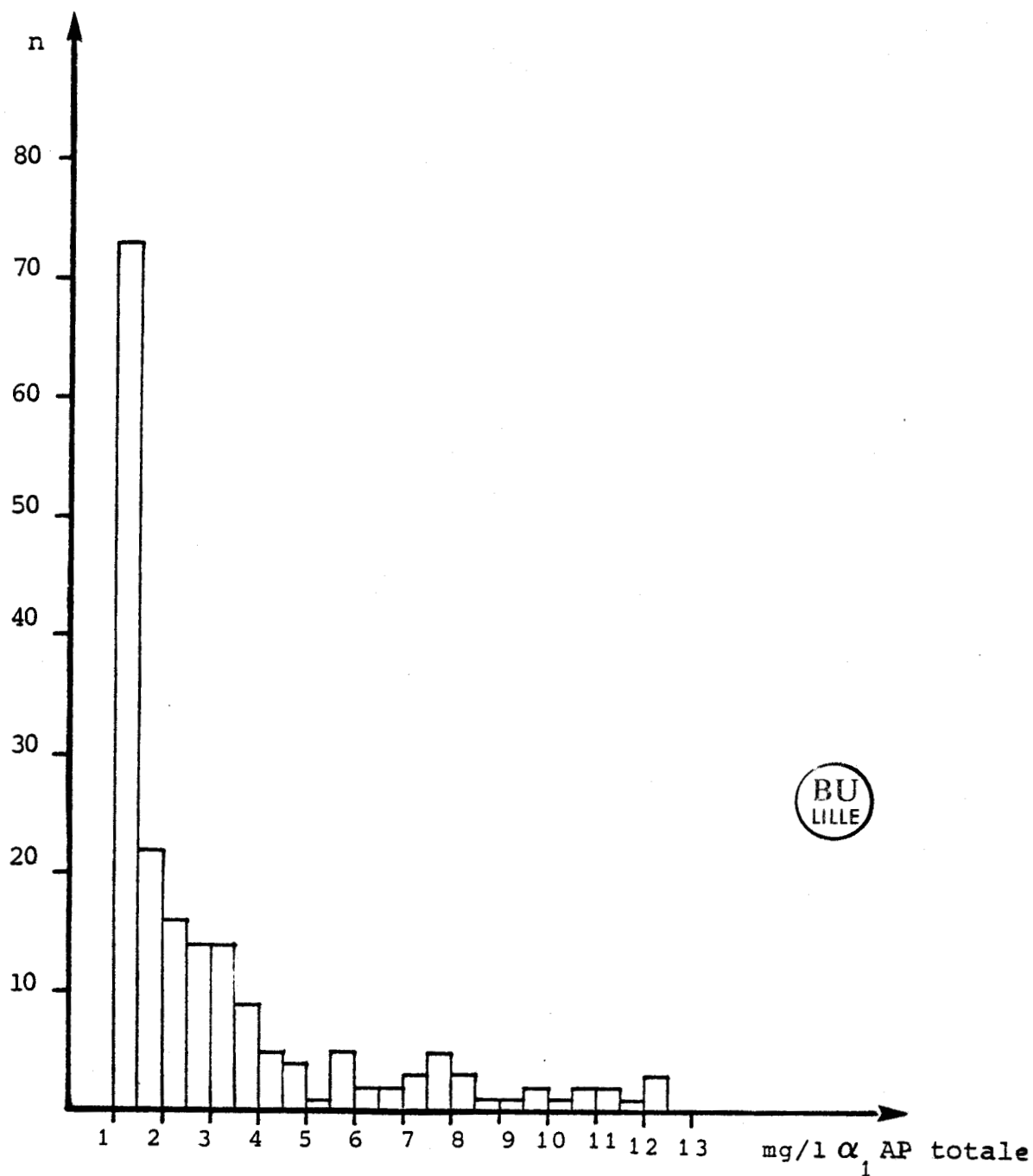


Figure 23 : Distribution de 283 LBA, en fonction de la concentration d' α_1 AP, déterminée immunologiquement par INL.

n : nombre de LBA examinés.
(dans 64 échantillons, l' α_1 AP immunoréactive est < 1 mg/l; dans 28 échantillons, l' α_1 AP immunoréactive est $> 12,5$ mg/l; ces échantillons ne sont pas pris en compte dans cette figure.)

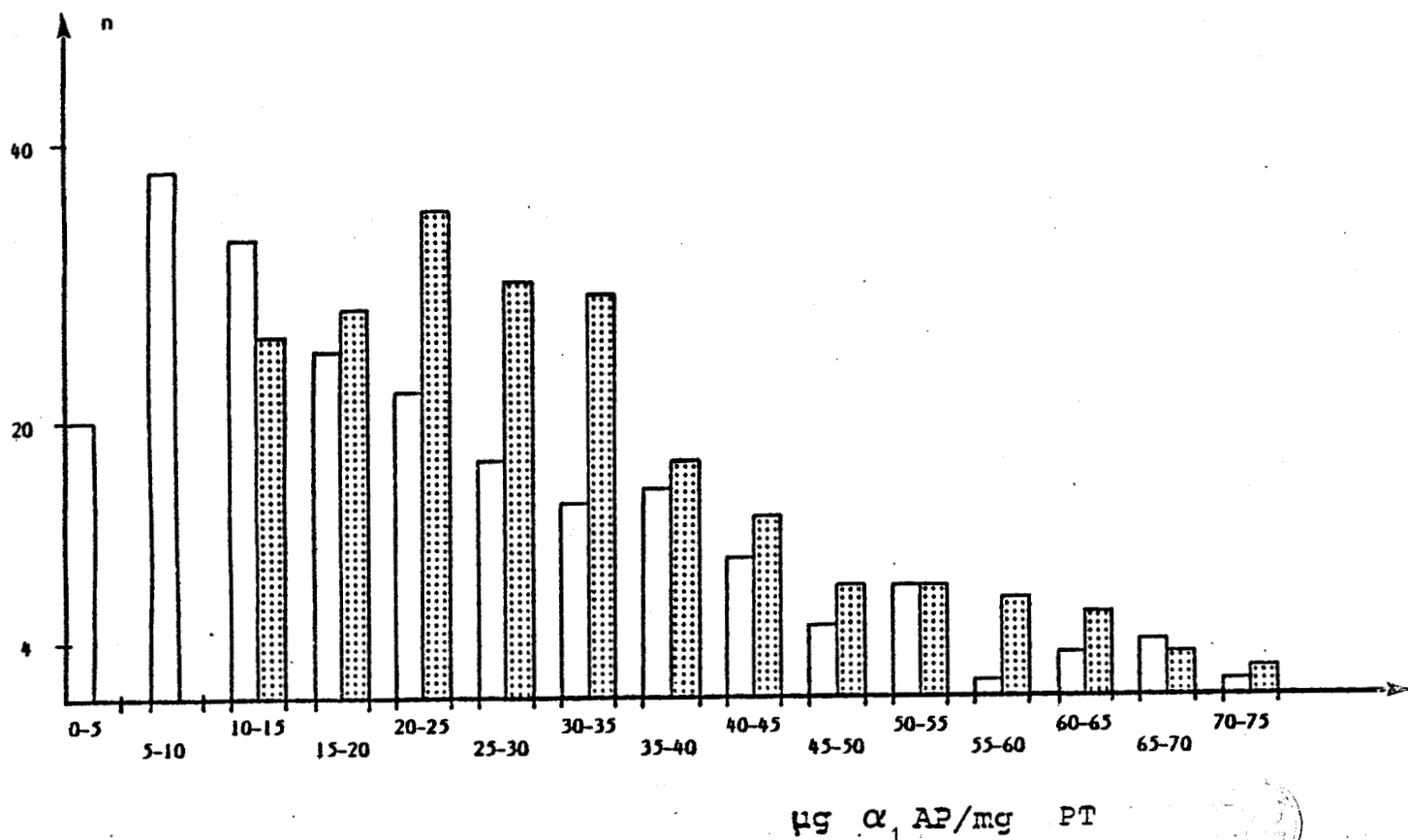


Figure 24 : Distribution des LBA en fonction du rapport $\frac{\alpha_1\text{AP}}{\text{PT}}$

- ▤ : α₁AP immunoréactive déterminée par INL
- ▭ : α₁AP fonctionnelle déterminée par la méthode cinétique
- n : nombre de LBA analysés.

(7 échantillons où le rapport α₁AP immunoréactive/PT est supérieur à 75 µg/mg et 3 échantillons où le rapport α₁AP fonctionnelle/PT est supérieur à 75 µg/mg ne sont pas représentés dans cette figure).

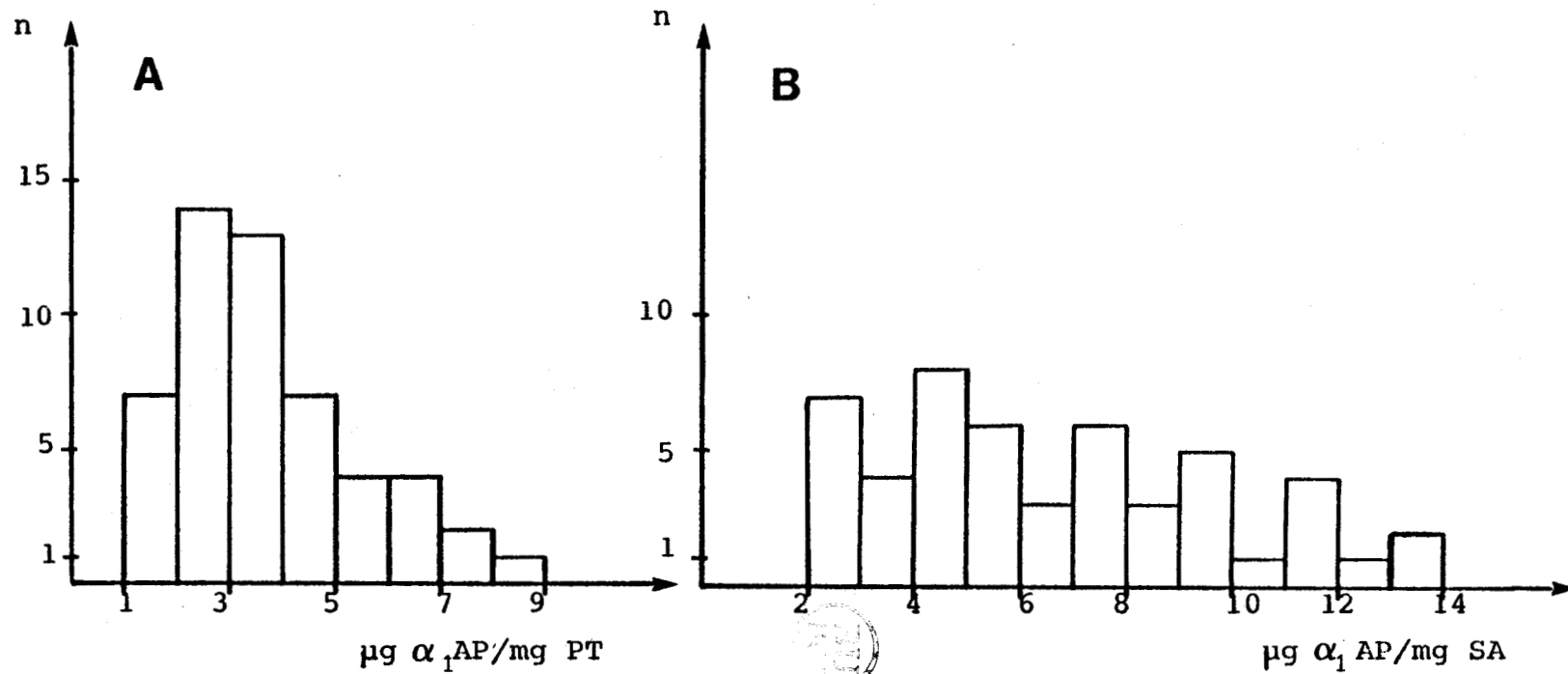


Figure 25 : Distribution de 52 LBA en fonction de la concentration d' α_1 AP immunoréactive rapportée à la concentration des protéines totales (A) ou à celle de la sérualbumine (B).

dans cette population de LBA, la SA représente de 30 à 85 % des protéines totales (fig.26). La variation relative de ces deux paramètres ne semble pas fonction de la concentration des protéines présentes (fig.27). De même, les valeurs exprimant la concentration d' α_1 AP en fonction des protéines totales semblent corrélées à celles rapportées à la SA sur la plus grande partie de la gamme. La dispersion des points autour de la droite de corrélation est cependant importante (fig. 28).

3.2 POURCENTAGE D' α_1 AP FONCTIONNELLE PAR RAPPORT A L' α_1 AP IMMUNOREACTIVE

Le dosage de l'activité inhibitrice de l' α_1 AP a été effectué sur 219 LBA présentant une concentration d' α_1 AP immunologiquement réactive supérieure à 1 mg/l (77 % des LBA). Le pourcentage d'activité de l'inhibiteur s'échelonne entre 0 et 125 % (fig.29). Celui-ci ne dépend pas de la concentration en α_1 AP totale présente dans l'échantillon (fig. 30). Pour 12 % des LBA analysés, le pourcentage d'activité de l' α_1 AP est compris entre 100 et 125 % .

La même constatation a été faite par ABBOUD et coll (1). Ce résultat pourrait laisser supposer la présence d'autre(s) inhibiteur(s) dans ce milieu. Pour les mettre en évidence, nous avons mesuré l'activité inhibitrice après incubation préalable des échantillons en présence d'un excès d'IgG anti α_1 AP pour neutraliser l' α_1 AP. Ceci a été effectué pour 28 LBA ayant une concentration en α_1 AP fonctionnelle suffisante pour être mesurable avec précision.

Effectivement, nous avons constaté pour 17 LBA, la présence d'une activité inhibitrice résiduelle qui, cependant, reste généralement très faible, puisqu'elle est comprise entre 3 et 12 % de la quantité d' α_1 AP

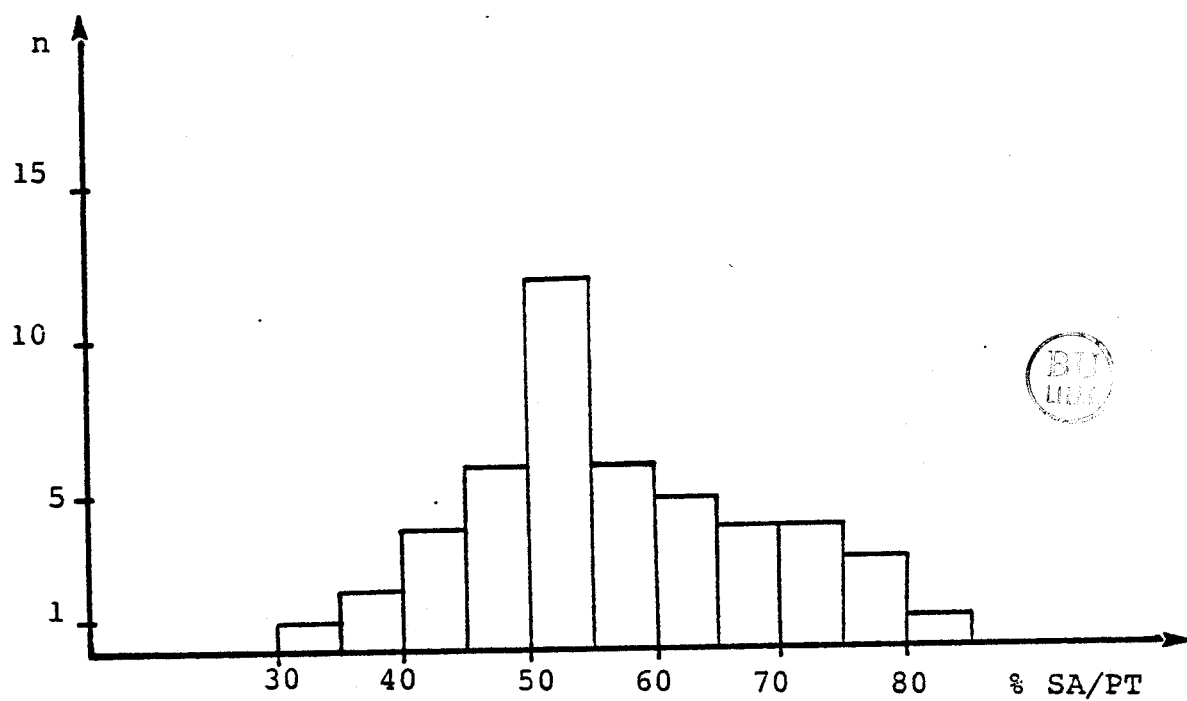


Figure 26 : Distribution de 52 LBA en fonction du rapport- $\frac{SA}{PT}$ - x 100

n : nombre de LBA examinés.

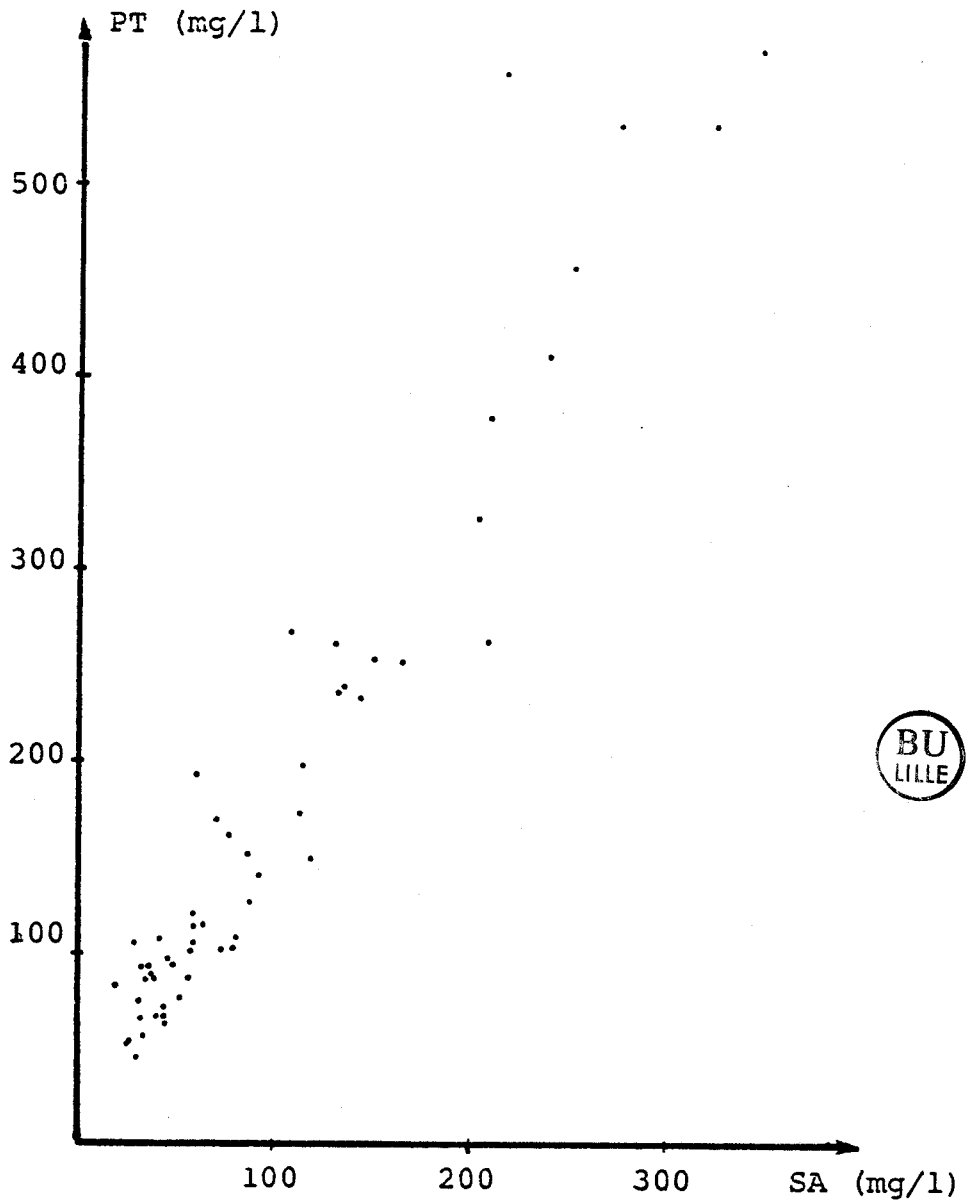


Figure 27 : Corrélation entre le nombre de mg/l de protéines totales et le nombre de mg/l de sérum albumine dans les 52 LBA analysés.

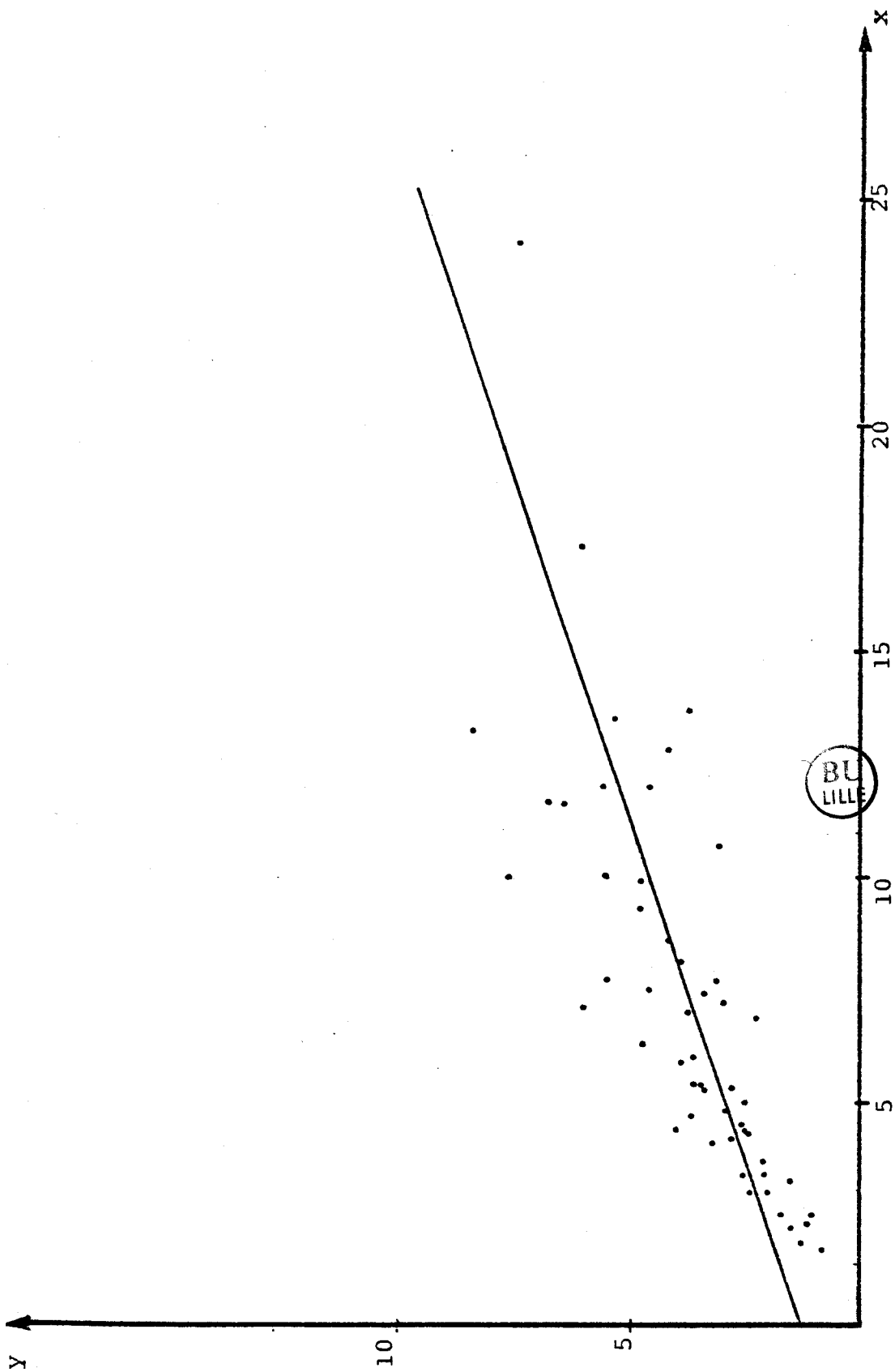


Figure 28 : Corrélation entre le rapport des concentrations d' α_1 AP immunoréactive / PT et le rapport de celles de l' α_1 AP immunoréactive/ SA.
 Les rapports de concentration sont exprimés en $\mu\text{g}/\text{mg}$

Equation de corrélation : $y = 0,33 x + 1,32$ ($r = 0,81$)

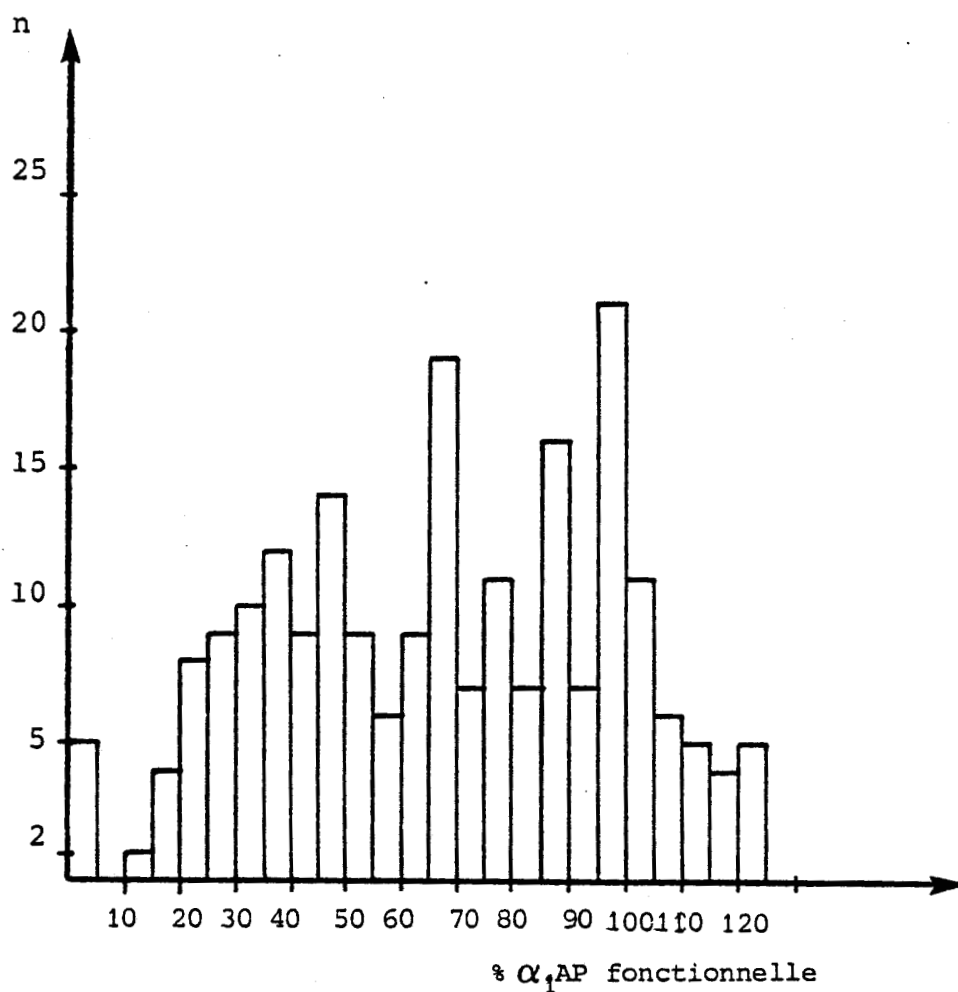


Figure 29 : Distribution des 219 LBA, en fonction du % d' α_1 AP active (α_1 AP fonctionnelle / α_1 AP immunoréactive x 100)
n = nombre de LBA analysés.

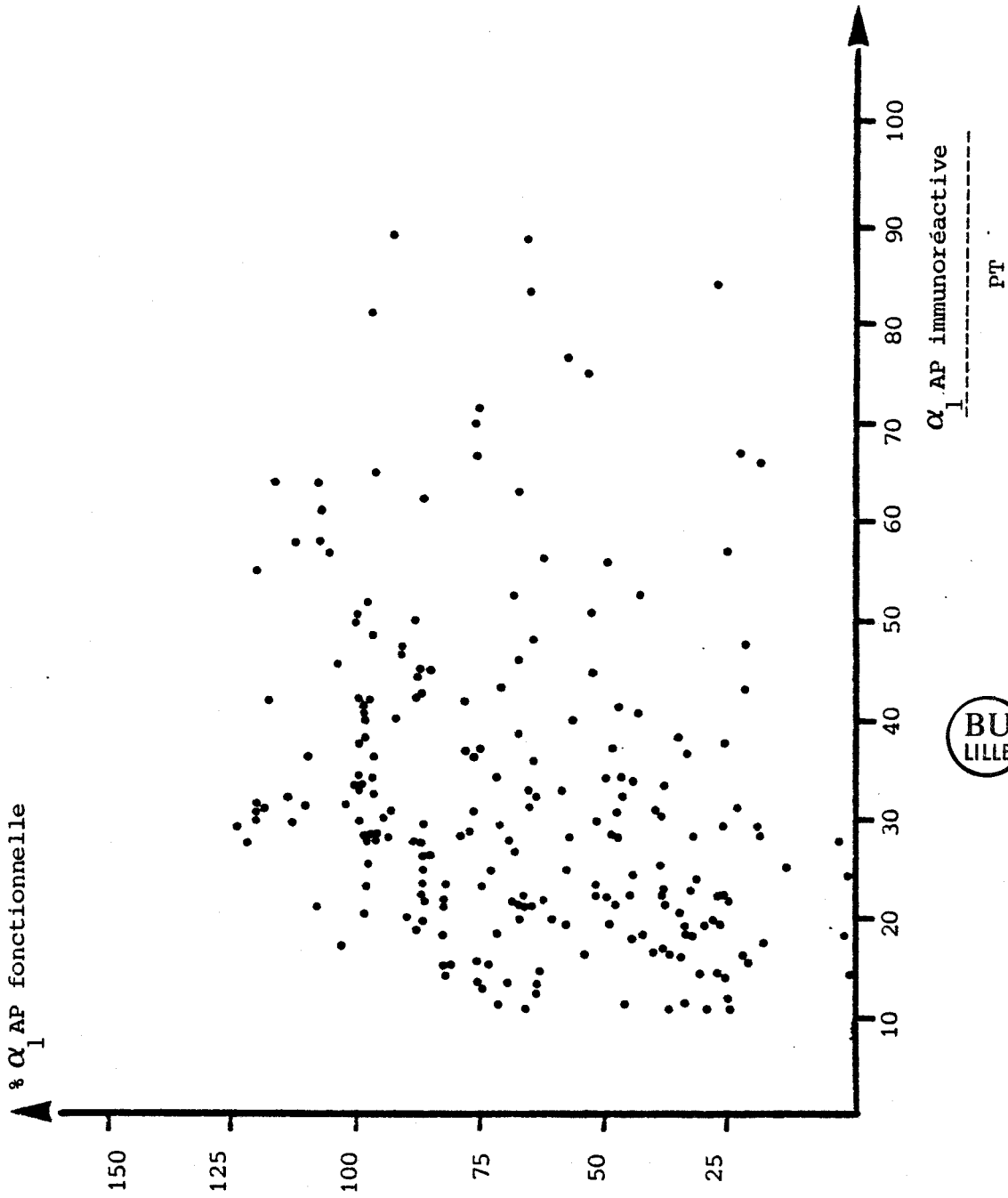


Figure 30 : Corrélation entre le % d' α_1 AP fonctionnelle / α_1 AP totale et le rapport α_1 AP immunoréactive / protéines totales (μ g/mg)

dosée immunologiquement. Pour deux échantillons, cette valeur s'élève à 21 et à 23 % (fig.31). Cette activité résiduelle ne paraît pas dépendre de la quantité de protéines totales présentes dans le LBA . Elle peut, de plus, être retrouvée en quantités voisines, dans des échantillons pour lesquels l' α_1 AP n'est que partiellement active; sa présence n'a cependant pas été recherchée systématiquement. Dans les autres échantillons, l'activité inhibitrice résiduelle est inférieure au seuil de sensibilité de la méthode de dosage.

Si l'activité de l' α_1 AP est obtenue par différence à partir de la mesure de l'activité inhibitrice totale et de celle calculée après inhibition de l' α_1 AP, le pourcentage d'activité de cette dernière ne dépasse jamais sensiblement la limite de 100 % , ce qui nous paraît un contrôle supplémentaire de l'exactitude des résultats obtenus.

La figure 32 représente la répartition des valeurs du pourcentage d'activité de l' α_1 AP en fonction de la quantité de protéines totales présentes dans les LBA. Quand ces dernières sont en concentration relativement faible (inférieure à 300 mg/l) le degré d'activité de l' α_1 AP est très variable; par contre, celui-ci paraît augmenter assez régulièrement quand la concentration en protéines s'élève. Ceci traduit sans doute une augmentation de la diffusion des protéines du plasma et donc d' α_1 AP fonctionnelle au travers de la paroi alvéolocapillaire. Il existe cependant, 4 exceptions nettes à ce schéma habituel. Un de ces LBA a été obtenu chez un malade atteint de pneumopathie infectieuse, deux autres proviennent du même malade atteint de fibrose, le dernier correspond à un cas de sarcoïdose.

Exprimée en se référant à la quantité de protéines totales, la concentration moyenne de l' α_1 AP fonctionnelle des 219 échantillons de LBA est égale à 21 μ g/mg. Si l'on considère que chez les sujets sains, l' α_1 AP présente dans le LBA est totalement active, la zone des valeurs rencontrées

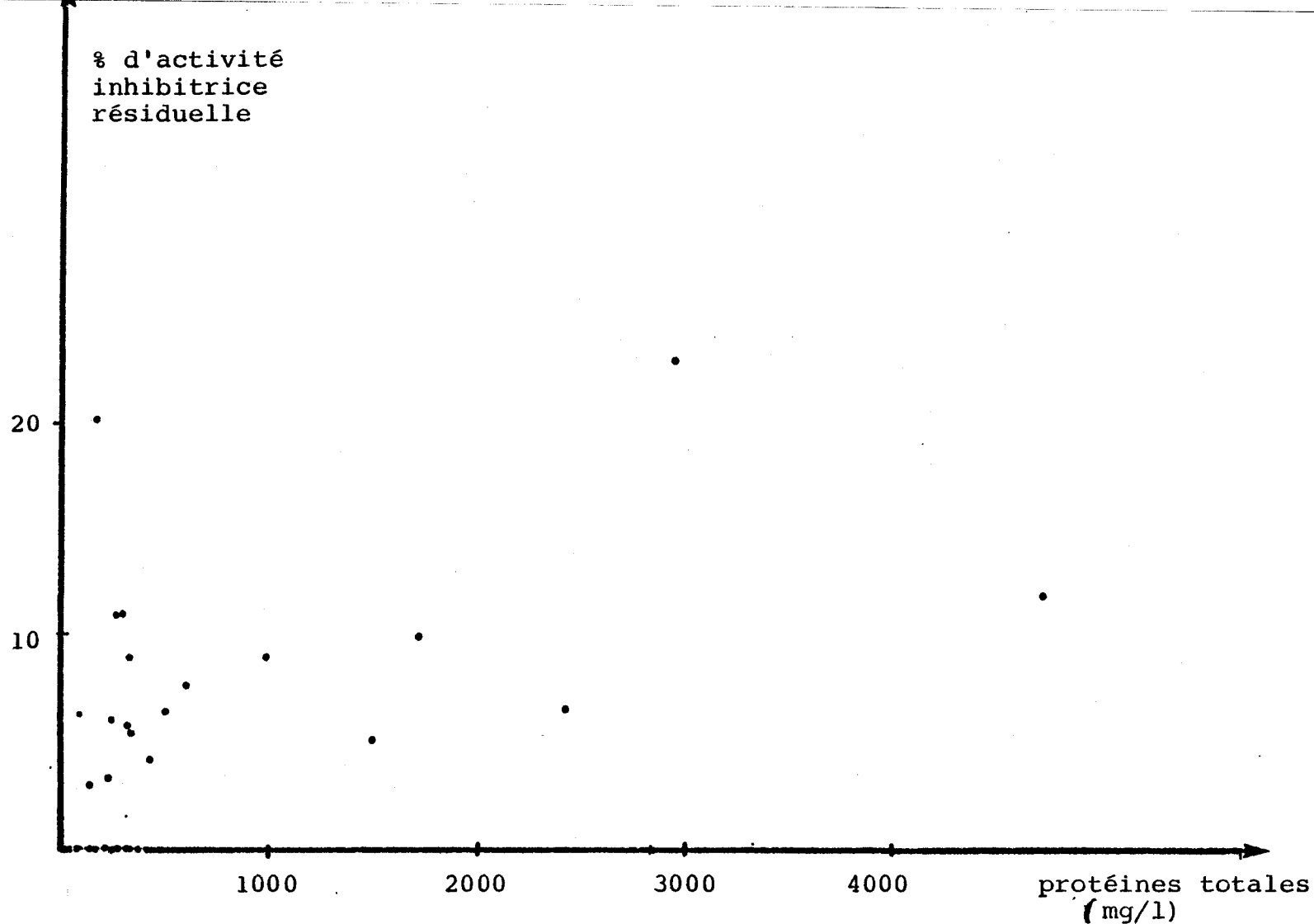


Figure 31 : % d'activité inhibitrice résiduelle de 28 LBA, après inhibition de l' α_1 AP par les IgG anti α_1 AP.

L'axe horizontal représente le nombre de mg/l de protéines totales présentes dans l'échantillon.



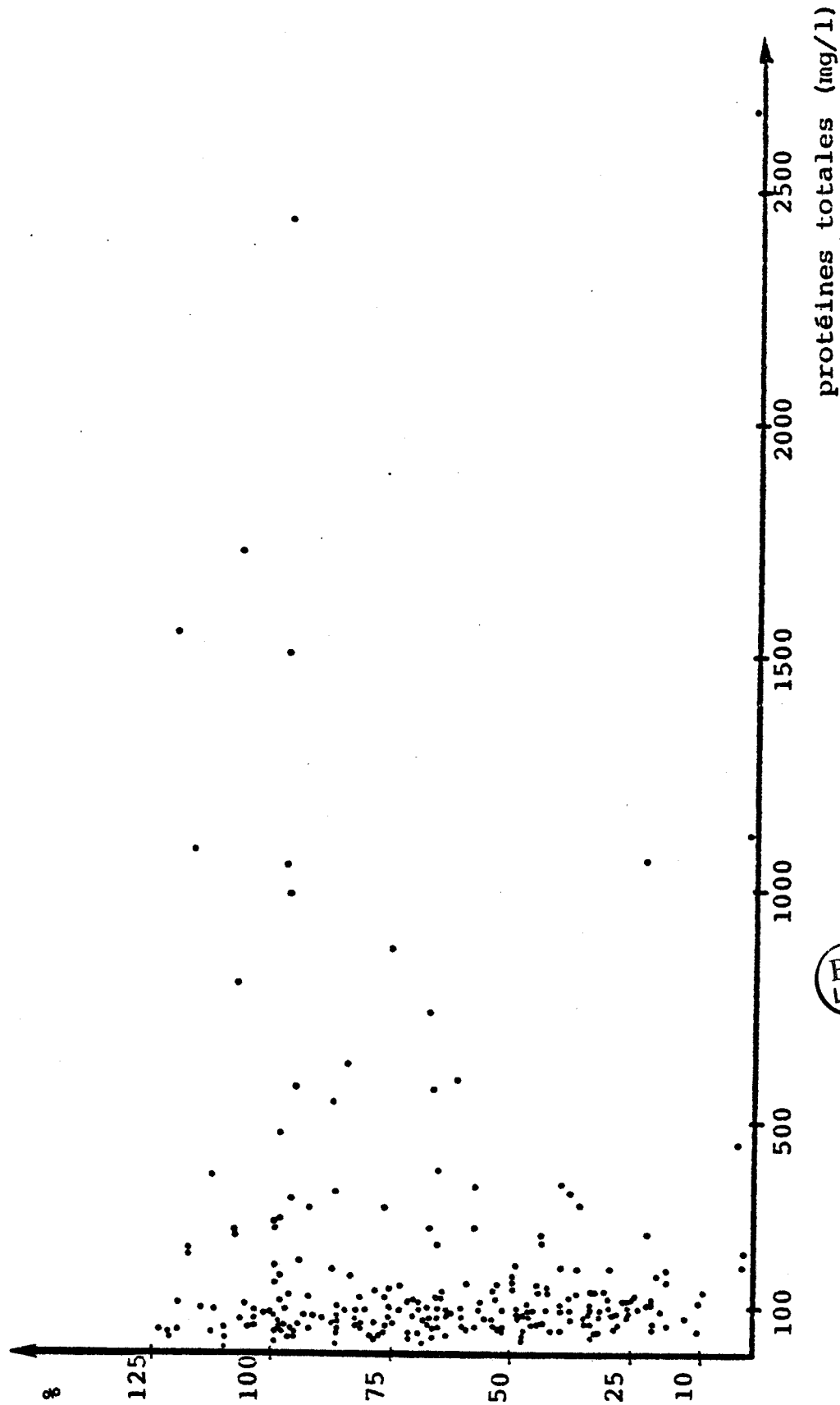


Figure 32 : % d'activité inhibitrice de l' α_1 AP des LBA (—) α_1 AP fonctionnelle (---) α_1 AP immunoréactive) $\times 100$
 en fonction du taux de protéines totales de l'échantillon (mg/l).

pourrait être comprise entre 20 et 30 $\mu\text{g}/\text{mg}$. 17 % des échantillons dosés se situent à ce niveau. 59 %, au contraire, se placent à un niveau inférieur, compris le plus souvent entre 5 et 10 $\mu\text{g}/\text{mg}$ (fig. 24).

Il n'existe pas de relation entre le nombre de polynucléaires neutrophiles et la quantité d' α1AP fonctionnelle ou inactive présente dans le LBA (fig. 33 et 34).

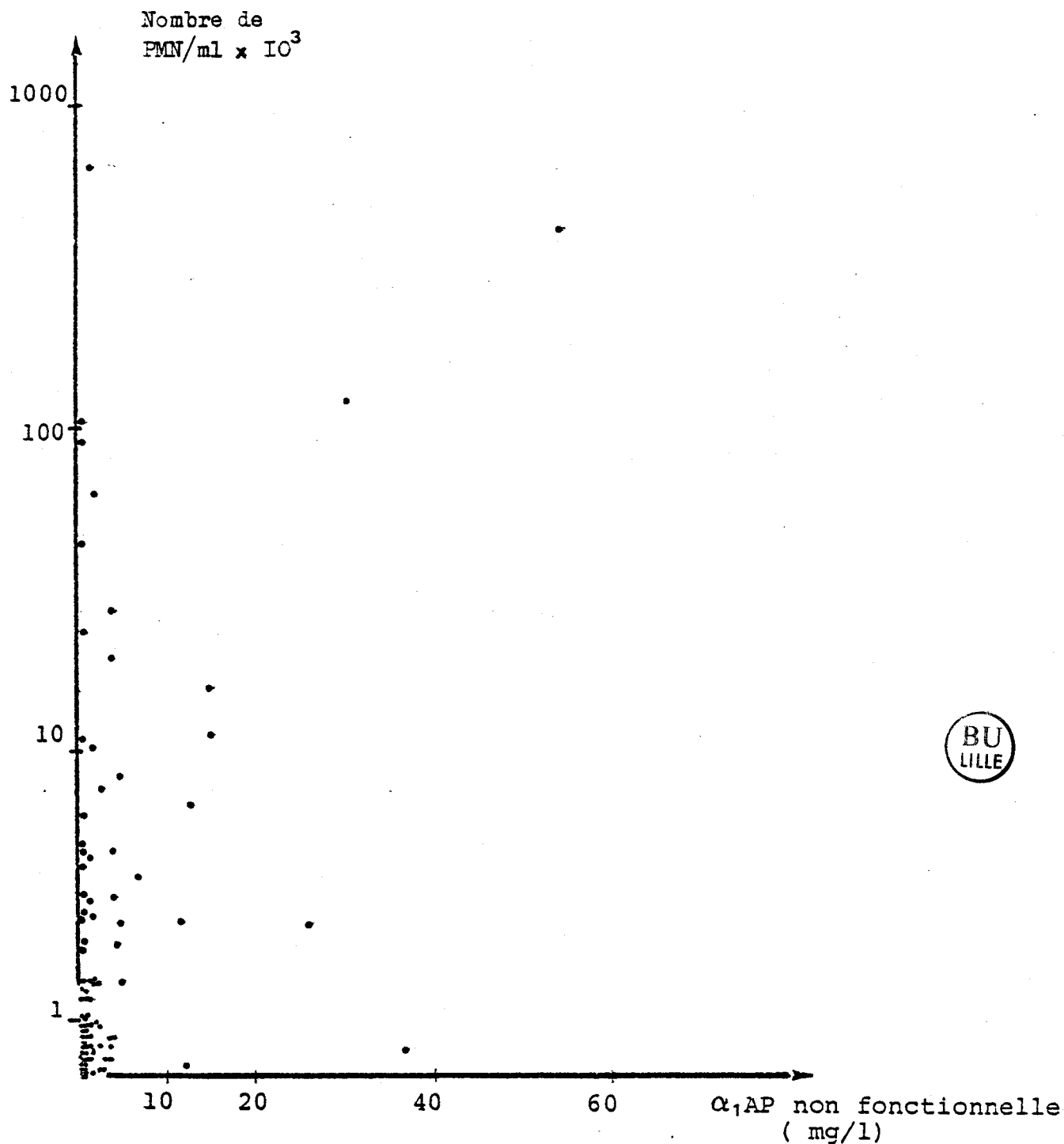


Figure 33 : Corrélation entre le nombre de polynucléaires neutrophiles (PMN) et la quantité d' α_1 AP non fonctionnelle. (α_1 AP immunoréactive - α_1 AP fonctionnelle.)

le nombre de PMN est représenté sur une échelle logarithmique

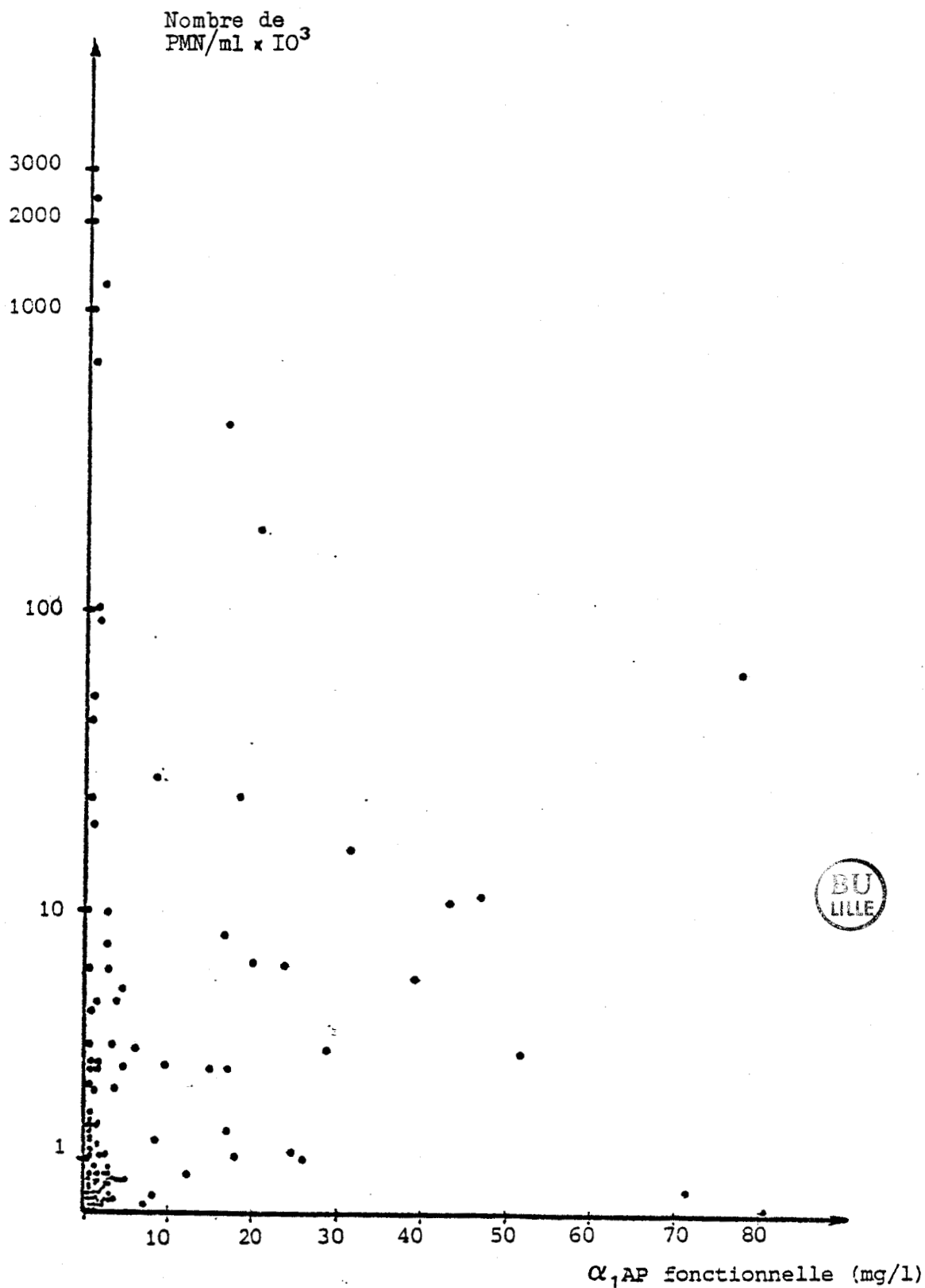


Figure 34 : Corrélation entre le nombre de polynucléaires neutrophiles (PMN) et la quantité d' α_1 AP fonctionnelle. le nombre de PMN est représenté sur une échelle logarithmique

3.3 DISCUSSION

La SA a été choisie par certains auteurs comme substance de référence afin de réduire la variabilité dans les résultats du dosage de l' α_1 AP des LBA. Ce choix est fondé sur le fait que la SA et l' α_1 AP sont des protéines de taille voisine qui, toutes deux, parviennent au poumon essentiellement par diffusion.

Effectivement, la variabilité des concentrations d' α_1 AP est réduite quand celles-ci sont exprimées en se référant à la SA (68); certaines difficultés peuvent être rencontrées cependant. Ainsi, FICK et coll (22) ont signalé, chez les patients atteints de mucoviscidose, une diminution de la concentration de la SA due, sans doute, à une destruction sous l'action de diverses protéases. Dans ces conditions, la référence aux protéines totales a été proposée. Celle-ci présente, de plus, l'avantage d'être réalisable dans de bonnes conditions en utilisant la méthode de BRADFORD (12).

Les résultats que nous avons obtenus montrent, en tout cas, que le choix de la référence influence largement les résultats des dosages de l' α_1 AP et que la variabilité de ces derniers est fortement diminuée quand on se réfère aux protéines totales.

Exprimées ainsi, les concentrations d' α_1 AP sont, cependant, très variables dans l'ensemble de la population de LBA. A notre connaissance, il n'existe pas d'autre étude réalisée sur un groupe de sujets atteints d'affections aussi diverses. Il est donc difficile d'interpréter ces résultats dans leur ensemble.

Les résultats du dosage de l' α_1 AP totale pour les LBA de 3 sujets sains (15, 19 et 31 μ g/mg de PT) sont en bon accord avec ceux trouvés par d'autres auteurs.

NIEDERMAN et coll (56) ont déterminé la concentration en α_1 AP totale de 25 LBA d'individus normaux; les résultats obtenus s'échelonnent entre 0 et 53 $\mu\text{g}/\text{mg}$.

De même, FICK et coll (22) ont trouvé pour 4 témoins une moyenne de 27 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de PT.

Tandis que BELL et coll (8) ont obtenu 35 ± 3 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de PT pour une population de 23 sujets volontaires, en bonne santé, non fumeurs. Cette valeur n'est pas sensiblement différente dans un groupe de 23 sujets fumeurs.

STONE et coll (73) ont trouvé pour 16 sujets sains, non fumeurs, 41 ± 4 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de PT, et, pour 21 fumeurs 39 ± 5 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de PT.

Les valeurs que nous avons obtenues, dans nos 3 LBA de référence, sont un peu plus faibles que celles données par les deux derniers groupes d'auteurs.

Les pourcentages d'activité de l' α_1 AP des LBA que nous avons étudiés sont très variables. Dans certains cas, des valeurs supérieures à 100 % ont été trouvées. Des résultats analogues ont été obtenus par GADEK (26), CARP (14) et plus récemment par ABBOUD (1). Après inhibition de l' α_1 AP par un anticorps spécifique, une activité résiduelle est détectable, mais elle reste généralement faible; ce fait n'a été retrouvé ni par CARP (14), ni dans les sécrétions bronchiques, par MORRISON (55). Cette observation pourrait être expliquée par la présence d'inhibiteur(s) différent(s) de l' α_1 AP dans certains LBA.

La présence éventuelle dans les sécrétions bronchiques de l' α_2 M susceptible d'inhiber l'action de l'élastase pancréatique sur le Suc-(Ala)₃-pNA a été évoquée par STOCKLEY (72). Celle-ci ne pourrait, cependant, représenter, dans ce milieu, qu'une très faible part (< 5 %) de l'activité inhibitrice potentielle de l' α_1 AP. Il semble qu'il en est de même dans le LBA. Le fait que l'activité inhibitrice indépendante de l' α_1 AP

ne dépende pas de la concentration en protéines du LBA ne milite pas en faveur de la présence de l' α_2 M, qui devrait être surtout retrouvée quand la diffusion des protéines du sérum est augmentée en raison d'une altération de la perméabilité de la paroi alvéolocapillaire.

De plus, après inhibition immunologique de l'activité de l' α_1 AP d'un échantillon de sérum dilué, l'activité résiduelle qui doit être représentée essentiellement par l' α_2 M est voisine de 6 % de l'activité de l' α_1 AP présente dans l'échantillon natif. La quantité d' α_2 M présente dans le LBA étant proportionnellement beaucoup plus faible que dans le sérum, celle-ci ne pourrait expliquer à elle seule, la présence de l'activité inhibitrice non inhibée par l'anticorps anti α_1 AP.

Il est donc possible qu'intervienne un inhibiteur différent, tel que celui dénommé BSI-E par HOCHSTRASSER (37).

Si la quantité d' α_1 AP immunologiquement réactive, exprimée en fonction des protéines totales, et présente dans les LBA, se répartit également de part et d'autre de la zone de valeurs habituellement rencontrées chez les sujets sains (20-30 μ g/mg), il n'en est pas de même pour l'activité inhibitrice de cette dernière qui paraît inférieure à ces valeurs de référence dans plus de la moitié des échantillons. Il se pourrait donc que dans la population étudiée, le niveau de protection de l'épithélium alvéolaire contre les protéases et surtout contre l'élastase leucocytaire soit insuffisant.

Il est intéressant de constater que cette diminution de l'activité de l' α_1 AP s'explique essentiellement par une inactivation de l'inhibiteur (fig.35), puisque le pourcentage de l'activité de l' α_1 AP paraît assez bien corrélé avec la concentration de cet inhibiteur rapportée à celle des protéines totales.

Il est évident aussi que la présence d'une activité inhibitrice supérieure à 30 μ g/mg peut s'accompagner de celle d'une quantité notable d' α_1 AP inactive.

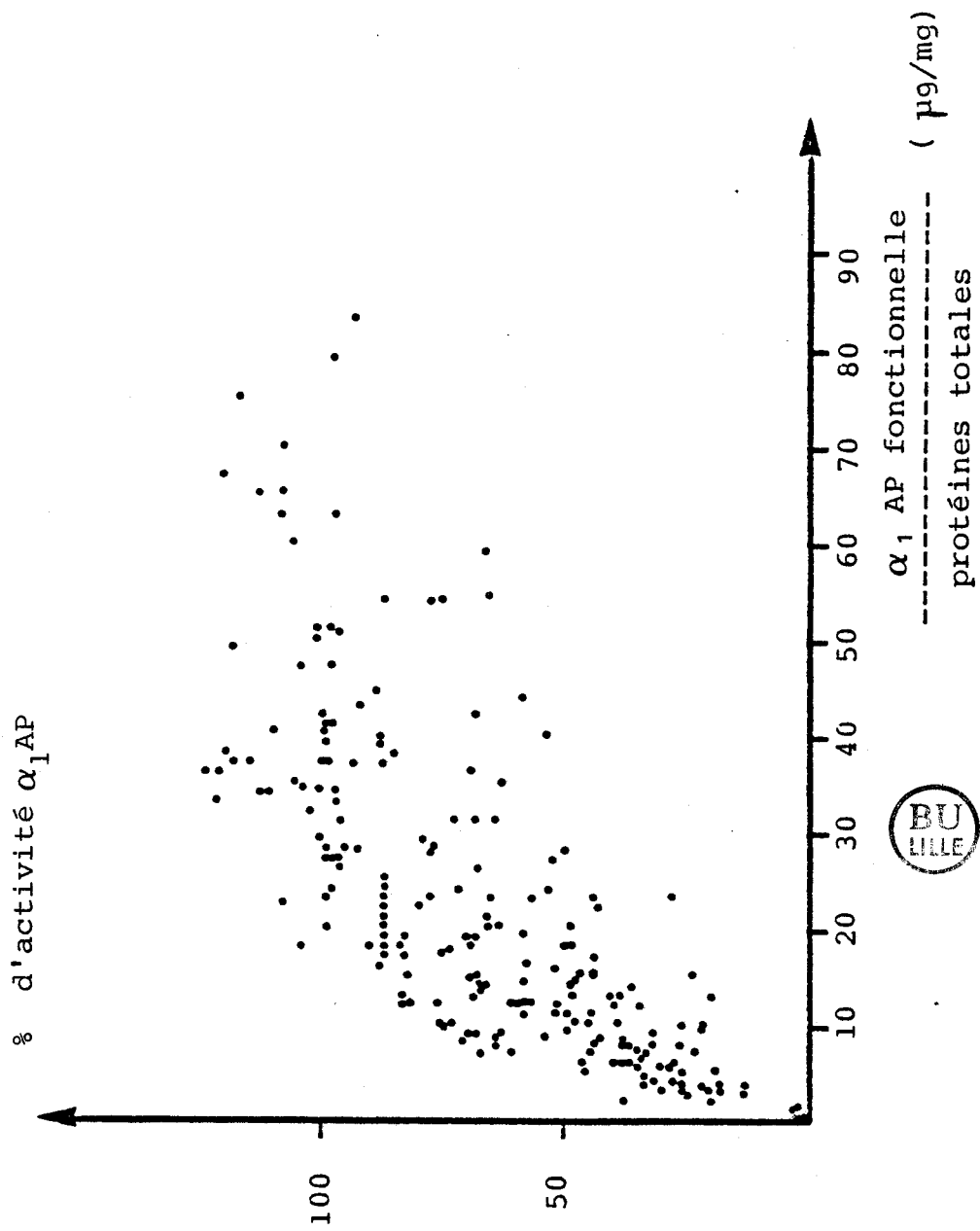


Figure 35 : Corrélation entre le % d'activité de l' α_1 AP (α_1 AP fonctionnelle / α_1 AP totale) et le rapport α_1 AP fonctionnelle / protéines totales.

La concentration d' α_1 AP dosée immunologiquement est inférieure à 1 mg/l dans 23 % des LBA. L'activité inhibitrice de cet inhibiteur est souvent très faible dans ce milieu. Elle est inférieure à 1 mg/l pour 49 % des échantillons. Il est donc certain que les méthodologies que nous avons utilisées ont une précision et une sensibilité insuffisantes pour permettre d'évaluer avec sécurité la concentration de l' α_1 AP de ces échantillons.

La concentration d' α_1 AP non fonctionnelle peut être évaluée approximativement par différence entre la quantité de cet inhibiteur dosée immunologiquement et celle mesurée par son activité vis-à-vis de l'élastase pancréatique de Porc. Que cette inactivation de l' α_1 AP soit due à une protéolyse qui semble fréquemment retrouvée (69), ou à une oxydation, celle-ci pourrait résulter, en grande partie, de l'action des polynuc-léaires neutrophiles capables de libérer tant des protéases neutres, et en particulier, de l'élastase, que des agents oxydants (18).

L'évaluation de ces formes non fonctionnelles de l' α_1 AP pourrait donc représenter un marqueur de l'activité des neutrophiles qui sont impliqués dans le développement de la fibrose pulmonaire. Nous n'avons cependant pas trouvé de relation entre le nombre de cellules neutrophiles et la quantité d' α_1 AP non fonctionnelle présente dans l'ensemble des LBA que nous avons testés. Ceci pourrait être expliqué par la présence d'autres mécanismes d'inactivation de l' α_1 AP (protéases d'origine macrophagique ou bactérienne) ou par un degré d'activation métabolique variable des neutrophiles présents au niveau alvéolaire.

L'étude qui a été engagée a porté sur un échantillon de LBA obtenu dans une population très hétérogène de patients. Ceux-ci ont été regroupés en fonction du diagnostic clinique afin de mieux cerner les variations éventuelles du métabolisme de l' α_1 AP dans chaque type d'affection.

4 ETUDE PARTICULIERE DES LBA

Les lavages bronchoavéolaires ont été essentiellement réalisés chez des patients atteints de pneumopathies interstitielles. Les résultats seront étudiés successivement dans les principaux groupes constitués à partir du diagnostic clinique (fig.36).

4.1 SARCOIDOSE

La concentration d' α_1 AP fonctionnelle, exprimée par mg de protéines totales, est très variable chez les 30 sujets atteints de sarcoïdose. Cependant, pour 60 % d'entre eux, elle est inférieure à 20 μ g/mg. Le dosage immunologique ne montre un tel résultat, inférieur à 20 μ g/mg, que pour le tiers des patients. Effectivement, de l' α_1 AP non fonctionnelle est assez fréquemment présente en quantité notable. Celle-ci peut être retrouvée en l'absence d'une quantité importante de neutrophiles, qui sont connus pour être présents surtout dans les formes évoluées de cette affection (62). Sa présence témoigne ainsi de l'existence d'une agression, très probablement protéolytique, au niveau de l'alvéole pulmonaire chez certains patients.

Le degré d'évolutivité de la sarcoïdose peut être apprécié par l'étude de l'alvéolite lymphocytaire, et par la scintigraphie au gallium (42). Il serait intéressant d'étudier dans le même but, les variations de concentration de cette forme inactive de l' α_1 AP.

La dispersion des résultats obtenus dans ce groupe pourrait être expliquée par la diversité des degrés de l'alvéolite, reflétée par la proportion de lymphocytes retrouvés parmi les cellules du LBA.

4.2 PNEUMOPATHIES D'HYPERSENSIBILITE

La réponse immunologique déclenchée par l'inhalation de poussières organiques se traduit par une alvéolite lymphocytaire, et la formation d'immun-complexes qui sont impliqués dans le mécanisme de cette affection.

5 LBA appartenant à ce groupe ont été analysés; dans 4 cas, les patients sont atteints d'une maladie des éleveurs d'oiseaux.

Rapportée aux protéines totales, la concentration d' α_1 AP dosée immunologiquement se trouve à des valeurs proches de 20 μ g/mg, et le pourcentage d'activité de cette dernière se situe entre 60 et 100 % .

Ce résultat pourrait témoigner d'un équilibre de la balance protéases-antiprotéases relativement préservé pour l'ensemble de ces patients.

4.3 FIBROSE

La quantité de protéines présente dans les 12 LBA de sujets atteints de fibrose est généralement faible. Les concentrations d' α_1 -antiprotéase mesurées sont donc elles aussi basses, voisines de 1 à 2 mg/l, et donc proches du seuil de sensibilité de la méthode utilisée, ce qui ne permet pas d'apprécier avec certitude la quantité exacte d' α_1 AP non fonctionnelle.

Les concentrations d' α_1 AP immunologiquement fonctionnelle, exprimées en se référant aux protéines totales, ne paraissent pas très différentes de celles retrouvées en cas de sarcoïdose. Cependant, des valeurs inférieures à 20 μ g/mg sont retrouvées chez 9 patients pour l' α_1 AP fonctionnelle.

GADEK et coll (23), étudiant un groupe de 19 patients atteints de fibrose pulmonaire idiopathique, ne retrouvent pas de déficit important de l'activité de l' α_1 AP.

Le rôle de l'élastase dans la pathogénie de l'affection est discuté (18). Celui d'une collagénase est au contraire établi .

4.4 PNEUMOCONIOSE

Les 14 LBA étudiés proviennent de sujets atteints de silicose (7 patients) et d'asbestose (7 autres patients).

Cette fois encore, les concentrations mesurées sont très faibles

puisque la concentration moyenne des protéines totales est voisine de 70 mg/l.

La concentration d' α_1 AP fonctionnelle est inférieure à 20 μ g/mg dans 10 échantillons, et la présence d' α_1 AP non fonctionnelle paraît certaine dans quelques LBA.

Ce fait pourrait être rapproché de l'implication des neutrophiles dans le mécanisme des lésions pulmonaires induites chez l'animal par des fibres d'amiante (49), ou par des particules de silice (4).

4.5 CONNECTIVITE

Les atteintes pulmonaires sont fréquentes au cours de maladies du collagène. Les désordres immunitaires, et notamment la présence d'immun-complexes, sont impliqués dans ces lésions, qui peuvent conduire à une fibrose interstitielle comme au cours des sclérodermies. Les modalités évolutives sont, cependant, très diverses. La présence de neutrophiles et l'augmentation de la concentration des IgG du LBA témoignent du processus inflammatoire lors des fibroses dues à la sclérodermie (63).

Les 9 patients étudiés sont très divers par le diagnostic comme par les résultats de l'étude des LBA: formule cytologique et étude biochimique. Fréquemment, l'activité de l' α_1 AP est inférieure à 20 μ g/mg, en raison de la présence de sa forme non fonctionnelle le plus souvent.

Un patient atteint de sclérodermie a subi 4 lavages à intervalles de 6 mois. Dans les 2 derniers échantillons de LBA, la formule cytologique est altérée avec présence de 12 % de neutrophiles, tandis que l' α_1 AP fonctionnelle est proche de 10 μ g/mg de protéines totales.

4.6 POU MON IRRADIE

L'irradiation pulmonaire peut conduire, elle aussi, à une fibrose dans un délai de 6 à 12 mois. Le LBA prélevé dans un délai maximal de 3 mois après l'irradiation, montre une augmentation de la concentration des protéines par altération de la perméabilité alvéolocapillaire, ainsi qu'une alvéolite lymphocytaire et la présence de collagénase et d'autres protéases (17).

Les 13 LBA que nous avons étudiés ne montrent pas la même élévation de la concentration des protéines, qui se situe en moyenne à 169 mg/l. 6 échantillons présentent une concentration d' χ_1 AP fonctionnelle inférieure à 20 μ g/mg, et ceci s'explique alors par un pourcentage faible (compris entre 20 et 45 %) pour l'activité de l'inhibiteur. Celui-ci pourrait être expliqué par la présence des protéases précédemment signalées.

4.7 PNEUMOPATHIES INFECTIEUSES

Classiquement, les concentrations d' χ_1 AP dosée immunologiquement s'élèvent dans le LBA au cours des pneumopathies infectieuses aiguës; ce qui peut s'expliquer par l'augmentation de la diffusion de l'inhibiteur à partir du sérum, en raison de l'inflammation alvéolaire, et par l'accroissement de la synthèse de cette protéine de la phase aiguë. Cependant, l'activité inhibitrice de l' χ_1 AP est souvent faible ou nulle, ce qui peut s'expliquer par la présence de protéines d'origine bactérienne ou par l'activité des neutrophiles présents en grand nombre. Dans ces conditions, une activité élastolytique peut être mise en évidence dans le LBA (3). Des constatations similaires ont été faites au niveau des sécrétions bronchiques (71). Dans ce cas, l'évolution clinique des malades peut être corrélée avec l'état purulent de ces sécrétions.

Les 14 LBA que nous avons étudiés ne présentent pas de désordres aussi évidents, puisque à 2 exceptions près (55 et 91,5 %), le pourcentage de neutrophiles est inférieur à 10 % . Dans ces conditions, la concentration

d' α_1 AP dosée immunologiquement est supérieure à 20 $\mu\text{g}/\text{mg}$ dans 11 échantillons, mais ne dépasse jamais 55 $\mu\text{g}/\text{mg}$. La quantité d' α_1 AP non fonctionnelle est rarement élevée. La seule exception concerne le patient présentant 91,5 % de neutrophiles, pour lequel l' α_1 AP est active à 23 % . Un deuxième lavage réalisé chez ce malade un mois plus tard montre la normalisation à la fois du nombre de neutrophiles, redescendu à 2,5 % et de l'activité de l' α_1 AP remontée à 87 % .

4.8 DETRESSE RESPIRATOIRE DE L'ADULTE

Deux malades ont été étudiés. L'un présente un syndrome de Mendelson et a bénéficié de 3 lavages successifs. L'autre a fait l'objet de 2 lavages à 3 jours d'intervalle.

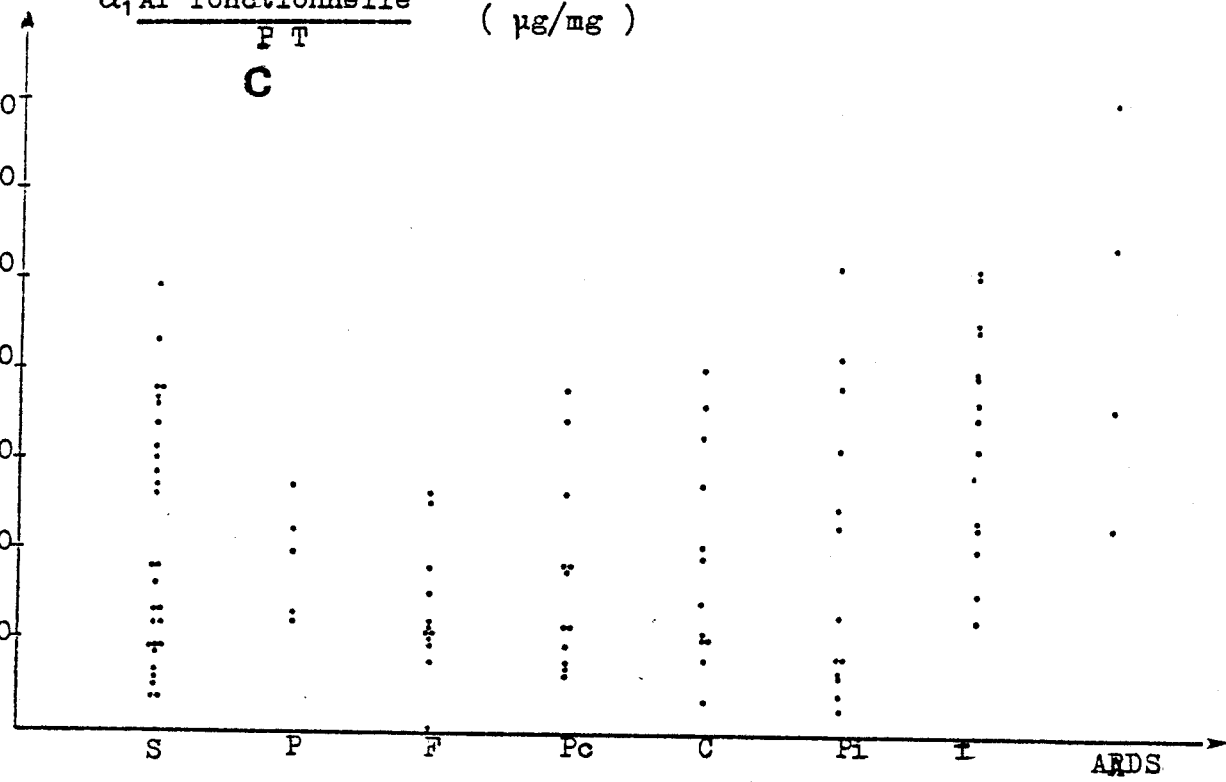
Dans les 2 cas les protéines totales, très élevées au départ, se normalisent ensuite. Rapportée aux protéines totales, la concentration d' α_1 AP fonctionnelle est toujours supérieure à 20 $\mu\text{g}/\text{mg}$ (moyenne 52 $\mu\text{g}/\text{mg}$) De même, le pourcentage d'activité est généralement proche de 100 % .

Ce résultat peut paraître surprenant, dans la mesure où il a été possible de mettre en évidence à la fois une activité élastolytique libre, la présence d' α_1 AP inactivée (sans doute par oxydation essentiellement) et un afflux de neutrophiles dans le syndrome de détresse respiratoire de l'adulte. Peut-on supposer que la discordance entre les résultats puisse s'expliquer par la différence des circonstances de déclenchement de ces affections (16,48), ou des conditions d'obtention des LBA.

α_1 AP fonctionnelle ($\mu\text{g}/\text{mg}$)

P T

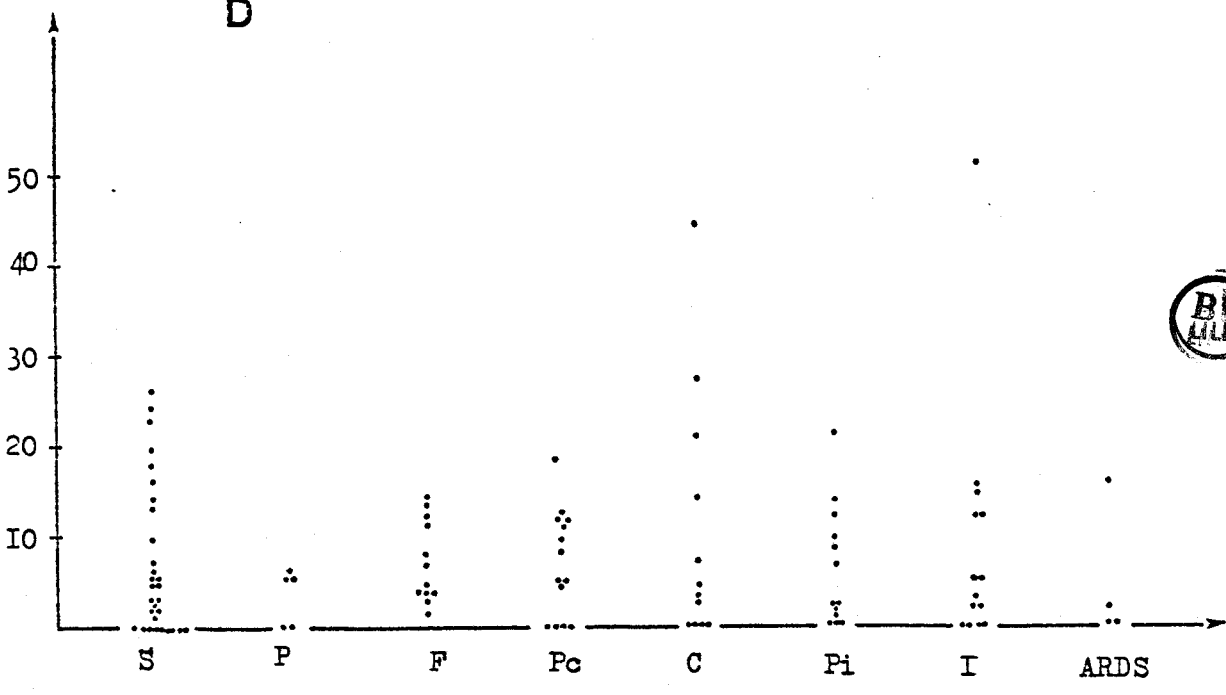
C



α_1 AP nonfonctionnelle ($\mu\text{g}/\text{mg}$)

PT

D



s = sarcidose; P = pneumopathies d'hypersensibilité; F = fibrose; Pc = Pneumoconiose.
c = connectivite; P_i = poumon irradié; I_i = pneumopathies infectieuses;
ARDS = détresse respiratoire de l'adulte.

C O N C L U S I O N

La survenue d'emphysèmes chez les sujets déficients en α_1 AP a attiré l'attention sur le rôle de cette protéine au niveau de l'appareil respiratoire. Malgré les résultats obtenus, de nombreuses incertitudes demeurent. Celles-ci ne seront résolues que par la mise au point de nouvelles méthodes d'exploration de la fonction de cet inhibiteur.

Dans ce but, nous avons mis au point des techniques fiables, permettant le dosage immunologique et la détermination de l'activité de l' α_1 AP présente dans le LBA. Celles-ci ont été appliquées à l'étude d'un ensemble important d'échantillons provenant de patients atteints d'affections très diverses.

Les résultats obtenus montrent que, dans de nombreux cas, l'activité de l' α_1 AP semble inférieure à celle habituellement rencontrée chez les sujets normaux.

Ce fait s'explique généralement par la présence d' α_1 AP non fonctionnelle, qui pourrait ainsi apparaître comme un nouveau marqueur de l'évolutivité des pneumopathies interstitielles notamment, des sarcoïdoses et des fibroses.

L'intérêt de ce nouveau paramètre pourrait être réellement établi par une étude de longue durée permettant d'interpréter les résultats obtenus en fonction de l'évolution clinique des patients. Celle-ci serait facilitée par une amélioration de la sensibilité des méthodes utilisées.

A P P E N D I C E T E C H N I Q U E .



1 DOSAGE IMMUNOLOGIQUE DE L' α_1 AP EN IMMUNONEPHELEMETRIE-LASER	124
1.1 Les solutions utilisées	124
a - Tampon	124
b - Standard	124
c - Anticorps	125
1.2 L'appareil	125
1.3 Protocole opératoire	125
2 DOSAGE IMMUNOLOGIQUE DE LA SA EN INL	126
2.1 Les solutions utilisées	126
a - Standard	126
b - Anticorps	126
2.2 Protocole opératoire	126
3 DOSAGE IMMUNOLOGIQUE DE L' α_1 AP PAR ELETROIMMUNODIFFUSION	127
3.1 Réactifs	127
3.2 Mode opératoire	128
4 IMMUNOELECTROPHORESE BIDIMENSIONNELLE	129
4.1 Mode opératoire	129
a - 1 ^{ère} dimension	129
b - 2 ^{ème} dimension	129
5 ELECTROPHORESE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE ALCALIN A 10 %	130
5.1 Les solutions utilisées pour la préparation des gels	130

5.2 Appareillage	131
5.3 Préparation du gel de séparation à 10 % d'acrylamide	132
5.4 Préparation du gel de concentration	132
5.5 Préparation et dépôt de l'échantillon à étudier	132
5.6 Coloration et décoloration des gels	133
6 DOSAGE DE LA FRACTION FONCTIONNELLE DE L'α_1AP	134
6.1 Les solution utilisées	134
a - Tampon	134
b - Solution d'enzyme	134
c - Solution de substrat	135
d - Standard	135
6.2 Réglage de l'appareil	136
6.3 Mode opératoire	136
a - Composition du carroussel	136
b - Détail des opérations	136
6.4 Calcul de l'activité inhibitrice	137
7 DOSAGE DES PROTEINES TOTALES DES LBA	
Méthode automatique sur ABA 100	139
7.1 Principe	139
7.2 Les réactifs	139
7.3 Réglage de l'ABA 100	140

1. DOSAGE IMMUNOLOGIQUE DE L' α_1 -ANTIPROTEASE EN IMMUNONEPHELEMETRIE-LASER

1.1 LES SOLUTIONS UTILISEES

a- Tampon

Nous avons utilisé un tampon PBS 10mM, pH 7,4 contenant du PEG et du Tween 20 (57). La composition est la suivante:

- Phosphate disodique ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$) ----- 1,18 g
- Phosphate monosodique (NaH_2PO_4) ----- 0,233 g
- Polyéthylène glycol (PEG 6000 Serva) ----- 40 g
- Tween 20 ----- (Merck) ----- 2 g
- NaCl ----- 9 g
- Eau distillée ----- q.s.p 1000 ml

Ajuster à pH 7,4

b- Standard

Un sérum standard Hyland (A) titrant 1,23 g/l d' α_1 AP, est dilué dans du NaCl 0,14 M au 1/75^{ème}, puis filtré sur filtre Nucléopore 0,4 μm (Serlabo Paris). Cette dilution contient 16,4 mg/l d' α_1 AP; elle est répartie en fractions de 4 ml dans des tubes à hémolyse, et stockée à -20° C. Une gamme étalon est réalisée à partir de cette dilution dans les conditions décrites dans le tableau suivant:

solution d'antigène au 1/75 ^{ème} (ml)	0,04	0,05	0,10	0,20	0,40	0,60	0,80	1
sérum physiologique (ml)	0,96	0,95	0,90	0,80	0,60	0,40	0,20	0
concentration en α_1 AP (mg/l)	0,65	0,82	1,64	3,28	6,56	9,84	13,12	16,4

Une gamme étalon peut être utilisée pour plusieurs séries de dosage; les différentes dilutions sont stables pendant au moins 15 jours, conservées à +4 ° C.

c- Anticorps

La dilution de l'immun-sérum anti χ_1 AP Hyland au 1/8^{ème} est effectuée avec le tampon PBS en incorporant lentement le tampon à l'immun-sérum, tout en agitant sur agitateur magnétique. L'immun-sérum est filtré, avant utilisation, sur filtre Nucléopore 0,4 μ m.

1.2 L'APPAREIL

Le néphélémètre-laser Hyland PDQ TM est utilisé selon les indications du fabricant.

1.3 PROTOCOLE OPERATOIRE

Les tubes correspondant à la gamme étalon et aux dosages sont préparés parallèlement, selon les mêmes modalités. Leur composition est la suivante:

	Blanc Sérum	Blanc Anticorps	Témoin Ag	Dosage
Tampon PBS	1 ml	-	1ml	-
IS au 1/8 ^{ème}	-	1 ml	-	1 ml
NaCl 0,14 M	50 μ l	50 μ l	-	-
Ag	-	-	50 μ l	50 μ l

Tous les tubes, en verre à usage unique, sont placés sur un portoir Hyland permettant leur repérage (gamme et échantillons). Ceux-ci sont agités simultanément pour bien mélanger les réactifs, après recouvrement du portoir avec du parafilm. Toute particule de poussière étant susceptible de

produire une certaine dispersion de la lumière, la verrerie et les tubes doivent être parfaitement propres.

La lecture de tous les tubes est effectuée au bout d'une heure d'incubation. L'intensité de la lumière dispersée, exprimée en RLS, est traduite graphiquement en concentration.

2 DOSAGE IMMUNOLOGIQUE DE LA SERUM ALBUMINE EN INL

Le protocole utilisé est identique à celui proposé pour le dosage de $1' \alpha_1$ AP.

2.1 LES SOLUTIONS UTILISEES

a- Standard

La gamme étalon (30,3 à 303 mg/l) est préparée à partir d'une dilution au $1/50^{e}$ du standard Hyland (B), titrant 15,18 g/l de SA, dans du NaCl 0,14 M.

b- Anticorps

L'immun-sérum spécifique Hyland est dilué au 1/2 avec le tampon PBS, décrit plus haut, puis filtré sur filtre Nucléopore 0,4 μ m.

2.2 PROTOCOLE OPERATOIRE

10 μ l d'antigène sont mélangés à 1 ml d'immun-sérum (dosage) ou de tampon PBS (blanc), de la même manière que pour $1' \alpha_1$ AP. Le RLS est mesuré après une heure d'incubation. Il est traduit graphiquement en concentration.

3 DOSAGE IMMUNOLOGIQUE DE L' α_1 AP PAR ELECTROIMMUNODIFFUSION

L'électroimmunodiffusion (EID) est pratiquée selon la technique proposée par LAURELL (46). Elle est fondée sur la précipitation spécifique de l'antigène dans un gel d'agarose contenant l'anticorps correspondant. Cette précipitation se produit au point d'équivalence : elle est indépendante du champ électrique. Elle est alors mise en évidence par coloration du complexe Ag-Ac .

3.1 REACTIFS

- Tampon véronal 0,02 M, pH 8,6

Véronal sodé -----	20,6 g
Véronal acide -----	3,5 g
Eau distillée -----	q.s.p 5000 ml

- Solution d'agarose

Agarose (Indubiose A) -----	1 g
Tampon véronal 0,02 M, pH 8,6 --	q.s.p 100 ml

Après dissolution au bain-marie bouillant, la solution est répartie par fractions de 15 ml dans des tubes à essais bouchés. Au moment de l'emploi, le tube est chauffé à 55 ° C pour liquifier l'agarose.

- Solution de coloration

Bleu de Coomassie R 250 -----	5 g
Ethanol à 95° -----	450 ml
Acide acétique -----	100 ml
Eau distillée -----	450 ml

- Solution de décoloration

Acide acétique	-----	400 ml
Méthanol	-----	1800 ml
Eau distillée	-----	1800 ml

3.2 MODE OPERATOIRE

Les plaques de verre utilisées (11 x 9 cm) sont préalablement trempées dans le Mucapur, pendant une nuit. Après rinçage abondant à l'eau distillée et séchage à l'étuve, elles sont prêtes à l'emploi.

Le gel d'agarose, préalablement porté à 55 °C et contenant 40 µl d'immun-sérum, est coulé sur la plaque de verre, maintenue bien plane grâce à une planche à niveau. Après solidification, on effectue le nombre de trous nécessaires. La gélose est aspirée grâce à un vide léger.

La plaque, ainsi préparée, est disposée dans la cuve et reliée au tampon grâce à des ponts de papier Whatman n°1. Les dépôts de 5 µl d'échantillon à analyser sont faits sous une légère tension (environ 5 V). L'électrophorèse est effectuée sous une tension de 15 V pendant une nuit. Quand la migration est terminée, la plaque est retirée de la cuve, très abondamment lavée avec de l'eau distillée, puis recouverte d'une feuille de papier filtre et écrasée pendant 20 mn pour éliminer le maximum d'immun-sérum en excès. La plaque subit ensuite un bain dans le sérum physiologique pendant 30 mn puis dans l'eau distillée pendant 15 mn.

Elle est ensuite séchée sous courant d'air chaud, après avoir été protégée par un papier filtre. La feuille de papier est alors enlevée en l'humidifiant légèrement. La plaque est colorée par le réactif au Bleu de Coomassie pendant 15 mn puis décolorée grâce à des bains successifs dans la solution décolorante.

4 IMMUNOELECTROPHORESE BIDIMENSIONNELLE

Dans un premier temps, les protéines à étudier sont séparées par électrophorèse en gel d'agarose, à pH 8,6. Après migration, la bande d'agarose est découpée puis transférée sur une autre plaque; on coule alors l'agarose contenant l'immun-sérum spécifique. On applique un courant électrique perpendiculaire au premier champ.

4.1 MODE OPERATOIRE

a- 1^{re} dimension

- sur une plaque (11 x 9 cm), on coule 15 ml d'agarose à 55 ° C.
- après solidification, on réalise les fentes ou les trous.
- les dépôts sont faits simultanément dans chaque trou, et la plaque disposée dans le bac d'électrophorèse rempli de tampon véronal neuf
- refroidir la cuve
- positionner les ponts de papier Whatman N° 1
- mettre 3 épaisseurs (papier 9 cm x 6 cm)
- électrophorèse : 1 heure à 100 V (aux extrémités).

L'électrophorèse est suivie grâce à un témoin de bleu de bromophénol déposé entre les trous.

b- 2^{me} dimension

- découper la bande d'agarose.
- la transférer sur une plaque 10 x 10 cm.
- couler sur le reste de la plaque 12 ml d'agarose à 55 ° C contenant l'immun-sérum.
- le tampon utilisé est le même que précédemment.
- placer les plaques dans les cuves.
- mettre les ponts de papier (2 épaisseurs).

- laisser migrer toute la nuit (à 15 V).
- les cuves sont constamment refroidies durant la migration.
- la coloration et la décoloration sont identiques (voir EID)

5 ELECTROPHORESE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE ALCALIN A 10 %

L'électrophorèse est pratiquée selon la technique proposée par KERCKAERT (43). Le support est constitué de 2 gels superposés.

- le gel inférieur de séparation à 10 %
- le gel supérieur de concentration

5.1 SOLUTIONS UTILISEES POUR LA PREPARATION DES GELS

- Tampon d'électrophorèse, pH 8,9

Tris -----	4	g	
Glycine -----	19,2	g	
Eau distillée -----	q.s.p	2	l

Le tampon est dilué au 1/3 au moment de l'emploi

- Solution d'acrylamide

Acrylamide -----	48	g	
Méthylène bisacrylamide -----	1,28	g	
Eau distillée -----	q.s.p	100	ml

- Solution A : tampon de séparation pH 8,9

Tris -----	36,3	g	
Eau distillée -----	q.s.p	100	ml

Ajuster à pH 8,9 avec HCl pur. Compléter à 100 ml avec de l'eau distillée et vérifier le pH.

- Solution B : tampon de dépôt pH 6,8

Tris -----	5,7 g
Eau distillée -----	environ 50 ml

Ajuster à pH 6,8 avec HCl pur. Compléter à 100 ml avec de l'eau distillée et vérifier le pH.

- Solution de persulfate d'ammonium

Persulfate d'ammonium -----	300 mg
Eau distillée -----	q.s.p 50 ml

Cette solution, peu stable, est conservée en flacon brun et renouvelée chaque semaine.

Toutes ces solutions sont conservées à + 4 ° C.

- Solution colorante pour le dépôt

Bleu de bromophénol -----	10 mg
Eau distillée -----	10 ml

- Solution échantillon (pour le dépôt)

Solution B -----	1,5 ml
Glycérol -----	2 ml
Solution colorante -----	0,5 ml

5.2 APPAREILLAGE

L'appareil utilisé pour l'électrophorèse est la cuve décrite par KERCKAERT (43). Le gel est coulé entre 2 plaques de verre (10 x 15 cm), séparées par 2 câles de 10 cm de long, 1 cm de large et 0,8 mm d'épaisseur.

Les plaques, ainsi assemblées, sont glissées dans un sac de plastique, soudé à la chaleur, dont la hauteur est à peu près double de celle des plaques.

5.3 PREPARATION DU GEL DE SEPARATION A 10 % D'ACRYLAMIDE

Solution A -----	5 ml
Solution d'acrylamide -----	4 ml
Eau distillée -----	10,6 ml
Temed -----	10 μ l
Solution de persulfate d'ammonium ----	0,2 ml
Solution de riboflavine -----	0,2 ml

Couler la solution de gel entre les 2 plaques jusqu'à environ 1 cm du bord supérieur. Ajouter un peu d'isobutanol saturé d'eau. Laisser polymériser.

Après polymérisation, éliminer l'isobutanol. Rincer plusieurs fois à l'eau distillée et sécher. Le gel supérieur peut alors être coulé.

5.4 PREPARATION DU GEL DE CONCENTRATION

Solution B -----	1,25 ml
Solution d'acrylamide -----	1 ml
Eau distillée -----	6,6 ml
Temed -----	5 μ l
Solution de persulfate d'ammonium ---	0,2 ml
Solution de riboflavine -----	0,3 ml

Placer le peigne après avoir coulé la solution de gel et laisser polymériser.

5.5 PREPARATION ET DEPOT DE L'ECHANTILLON A ETUDIER

- A 50 μ l de solution protéique, on ajoute 50 μ l de solution échantillon.
- Mélanger au Vortex.
- Les solutions des fractions à étudier sont déposées dans chacun des puits .
- La migration est effectuée pendant 2 h 30 mn à 20 mA.

5.6 COLORATION ET DECOLORATION DES GELS

Démouler le gel et le placer dans la solution de coloration pendant une nuit. Cette solution a la composition suivante :

Bleu de Coomassie G 250	-----	10 ml
(à 0,25 % dans H ₂ O)		
Acide trichloroacétique	-----	100 ml
(à 12,5 % dans H ₂ O)		

Décoloration par diffusion pendant 48 h dans une solution d'acide acétique à 5 % qu'on change de temps à autre.

6 DOSAGE DE LA FRACTION FONCTIONNELLE DE L' α_1 AP
Méthode automatique sur ABA 100

L'activité anti-élastasique de l' α_1 AP est déterminée à l'aide d'un analyseur automatique ABA 100 (Abbott Bichromatic Analyzer, Abbott Diagnostics, South Pasadena, California, 91030).

6.1 LES SOLUTIONS UTILISEES

a- Tampon

Nous avons utilisé un tampon Tris-HCl 0,2 M dont la composition est la suivante :

Tris ----- 24,228 g
Eau distillée ----- q.s.p 1 litre

On ajuste à pH 8,0 par une solution d'HCl. Ce tampon est conservé à + 4 ° C.

b- Solution d'enzyme

Une solution-stock d'élastase pancréatique de Porc (Choay) contenant 2,3 mg d'enzyme dans 10 ml de tampon Tris 0,2 M, pH 8,0 est préparée. La concentration est vérifiée à l'aide d'un spectrophotomètre à 280 nm.

ϵ , coefficient d'absorption molaire étant égal à 52000 M⁻¹ cm⁻¹, la concentration en enzyme de la solution peut donc être calculée d'après la formule suivante :

$$\text{Elastase} = \frac{\text{DO à 280 nm}}{52000} = \frac{0,365}{52000} = 7,02 \cdot 10^{-6} \text{ M}$$

Cette solution est conservée à + 4 ° C, et diluée extemporanément 200 fois dans le même tampon.

c- Solution de substrat

Le substrat N-Succinyl-(L-alanyl)₃-p-nitroanilide (Choay) solubilisé dans la N-méthylpyrrolidone (NMP).

Suc-(Ala)₃-pNA ----- 58 mg
NMP ----- 1 ml

Solubiliser par chauffage au bain-marie à 60° C. La concentration est mesurée, sur une dilution au 1/5000^{cm³} de la solution ainsi préparée, à l'aide d'un spectrophotomètre réglé à 315 nm. **S**, coefficient d'absorption molaire étant égal à 14600 M⁻¹ cm⁻¹, la concentration en substrat de cette solution est calculée d'après la formule suivante :

$$\text{Substrat} = \frac{DO \text{ à } 315 \text{ nm}}{14600} \times 5000 = \frac{0,321}{14600} \times 5000 = 110 \text{ mM}$$

La solution-mère de substrat doit être conservée à l'abri de la lumière. Elle est diluée 50 fois dans le tampon Tris-HCl 0,2 M, pH 8,0 pour chaque série de dosage.

d- Standard

L'X₄AP, préparée selon (7), est utilisée comme standard. Elle est titrée vis-à-vis de l'élastase pancréatique de Porc (active à 95 %), en réalisant une courbe de titration sur différentes dilutions effectuées dans une solution de SA à 150 mg/l. La concentration exacte d'X₄AP immunoréactive par INL est déterminée sur chaque dilution de la gamme-étalon. L'activité résiduelle de l'EPP, après incubation de cette dernière en présence des différentes dilutions est mesurée à l'ABA 100.

L'extrapolation jusqu'à l'axe des abscisses de la courbe d'inhibition, exprimant le pourcentage d'activité résiduelle de l'EPP en fonction du rapport molaire I/E, permet la détermination du titre de l'X₄AP utilisée comme standard.

6.2 REGLAGE DE L'APPAREIL

Mode d'analyse	Rate
FRR	Oui
Programmation du nombre de tours	2
Sens de la réaction	Down
Temps d'analyse	5 mn
Filtre	450-415 nm
Température	30 ° C
Réglage du zéro	1500
Facteur de calibration	361
Seringues de dilution :	
- 1/11 ^e pour le 1 ^{er} tour (distribution de l'enzyme et de l'échantillon)	
- 1/51 ^e pour le 2 ^{ème} tour (distribution du substrat)	

6.3 MODE OPERATOIRE

a- Composition du carroussel

La position 1 et 2 du carroussel sont laissées vides. En position 3 et 4, les godets sont remplis de la solution de SA à 150 mg/l de même que le dernier godet, de façon à réaliser un témoin-enzyme. En 5, 6 et 7 et en avant dernière position, les godets contiennent la solution témoin d' α AP. Les autres godets contiennent les LBA à doser

b- Détail des opérations

Avant la mise en route de l'appareil, on introduit à la main 500 μ l d'eau bidistillée dans le compartiment 1 de la multicuve. Cette cuve servira de référence pour le spectrophotomètre.

On place le plateau de dilution au 1/11^{ème} garni de la solution d'enzyme: l'appareil prélève 25 μ l d'échantillon, aspire 250 μ l de la solution d'enzyme et rejette le tout dans un compartiment de la multicuve. Cette opération dure 5 mn pour un tour de carroussel.

Après ce premier tour, on arrête la rotation pendant 15 mn. Le temps de contact entre l'enzyme et l'inhibiteur est donc de 20 mn.

Pendant ces 15 mn, on met en place le plateau de dilution au 1/51^{ème} gorni de la solution de substrat. L'aiguille de prélèvement est placée cette fois en position haute, de façon à ne pas aspirer l'échantillon, mais à distribuer le substrat dans chaque cuve. Ceci est effectué à la fin de la période de préincubation.

La vitesse de la réaction est alors mesurée.

6.4 CALCUL DE L'ACTIVITE INHIBITRICE

L'introduction d'un facteur d'étalonnage dans le calculateur permet d'exprimer les résultats en unités internationales que l'on obtient à l'aide de la formule suivante :

$$UI / L = 0,5 \times \frac{E/5 \text{ mn}}{5 \text{ mn}} \times \frac{V + sv}{sv} \times \frac{1000}{FF}$$

avec :

E/5 mn	-----	variation d'extinction pendant 5 mn
sv	-----	volume d'échantillon employé, soit 0,025 ml
V + sv	-----	volume total : volume de l'échantillon + volume de réactif, soit 0,525 ml
FF	-----	facteur de filtre, il est déterminé par le fabricant pour la paranitroa- niline, est égal à 5,82 avec l'appareil utilisé pour cette étude .
1000	-----	facteur permettant de rapporter le résultat à 1 litre d'échantillon.

d'où : $UI / L = 361 \times E/5 \text{ mn}$

Avec un tel réglage, les résultats seront imprimés directement en unités d'activité inhibitrice (UI / L). Pour chaque LBA, l'activité inhibitrice s'obtient par différence avec le chiffre du témoin enzyme sans inhibiteur.

Détermination du nombre de mg/l d' α_1 AP fonctionnelle dans le LBA.

La moyenne des résultats donnés par l'appareil pour les godets contenant l'enzyme sans inhibiteur représente l'activité du témoin-enzyme. A partir de cette valeur, on calcule, pour chaque dosage le rapport :

$$\frac{\text{activité échantillon}}{\text{activité témoin enzyme}} \times 100$$

correspondant au pourcentage d'activité résiduelle. Par différence avec 100 % , on obtient le pourcentage d'inhibition A.

La quantité d'enzyme active mise en jeu dans 250 μ l de solution à $33,36 \cdot 10^{-9}$ M est :

$$\frac{33,36 \cdot 10^{-9} \times 0,250}{1000} = 8,34 \cdot 10^{-12}$$

Le nombre de moles d'élastase inhibée est :

$$8,34 \cdot 10^{-12} \times \frac{A}{100} = 8,34 \cdot 10^{-14} \times A \text{ mole}$$

L'inhibition α_1 AP-élastase s'effectuant mole à mole, $8,34 \cdot 10^{-14} \times A$ mole représente aussi la quantité d' α_1 AP présente dans 25 μ l de LBA. La quantité d' α_1 AP dans 1 litre de LBA :

$$\frac{8,34 \cdot 10^{-14} \times 10^6}{25} = 3,33 \cdot 10^{-9} \times A \text{ mole}$$

en mg (PM 54.000) :

$$3,33 \cdot 10^{-9} \times 54 \cdot 10^6 \times A \text{ mg d}'\alpha_1\text{AP/1 de LBA}$$
$$= 0,180 \times A \text{ mg d}'\alpha_1\text{AP/1 de LBA.}$$

7 DOSAGE DES PROTEINES TOTALES DES LBA

Méthode automatique sur ABA 100

Le dosage des protéines totales dans les LBA a été effectué à l'aide de l'analyseur automatique ABA 100, en utilisant la méthode au bleu de Coomassie G 250, selon la technique de BRADFORD (12).

7.1 PRINCIPE

En milieu phosphorique, le bleu de Coomassie (brun orangé) se complexe aux protéines de l'échantillon et devient bleu. La formation de ce complexe entraîne un changement du maximum d'absorption du colorant de 465 à 595 nm (12).

7.2 LES REACTIFS

Coomassie Brilliant Blue G 250 (Serva)	-----	10 mg
Ethanol	-----	5 ml
Acide orthophosphorique à 85 %	-----	10 ml
Eau distillée	-----	q.s.p 100 ml

La dissolution du bleu de Coomassie dans l'éthanol est difficile : elle est favorisée par un léger chauffage.

La solution de BC utilisée pour le dosage des protéines totales, ainsi préparée, est filtrée pour éliminer les particules insolubles qui pourraient rester en suspension.

On conserve cette solution dans un flacon de verre à l'abri de la lumière et à température ordinaire. Cette solution est stable pendant au moins 2 semaines (12).

-Etalons

2 solutions-mère de sérum albumine bovine à 500 mg/l et 1000mg/l ont été préparées et congelées en petites fractions. Au moment de leur utilisation, elles sont décongelées et diluées de façon à obtenir soit une gamme-étalon variant de 50 à 500 mg/l soit une gamme étalon de 500 à 1000 mg/l.

7.3 REGLAGE DE L'ABA 100

Filtre	500 / 600
Température	30 ° C
Tours de portoirs	2
Sélecteur de mode d'analyse	"END POINT"
Sens de la réaction	"DOWN"
Temps d'analyse	5 mn
Décimale	0,000

BIBLIOGRAPHIE



1. ABOUD, R.T., FERA, T., RICHTER, A., TABONA, M.Z., and JOHAL, S.
Acute effect of smoking on the functional activity of α_1 -protease inhibitor in bronchoalveolar lavage fluids.
Am. Rev. Respir. Dis. 1985, 131, 79-85.
2. ABRAMS, W.R., WEINBAUM, G., WEISSBACH, L., WEISSBACH, H., and BROD, N.
Enzymatic reduction of oxidized α_1 -proteinase inhibitor restores biological activity.
Proc. Natl. Acad. Sci. 1981, 78, 7483-7486.
3. ABRAMS, W.R., FEIN, A.M., KUCICH, U., KUEFFERS, F., YAMADA, H., KUZMOWYCZ, Y., MORGAN, L., LIFFMANN, M., GOLDBERG, S.K., and WEINBAUM, G.
Protease inhibitory function in inflammatory lung disease I. Acute Bacterial pneumonia.
Am. Rev. Resp. Dis. 1984, 129, 735-741.
4. ADAMSON, I.Y.R., and BOWDEN, D.H.
Role of polymorphonuclear leucocytes in silica-induced pulmonary fibrosis.
Am. J. Pathol. 1984, 117, 37-43.
5. ALBRECHT, G.J., HOCHSTRASSER, K., and SALIER, J.P.
Elastase inhibition by the inter- α -trypsin inhibitor and derived inhibitors of man and cattle.
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 1983, 364, 1703-1708.
6. BAUGHMAN, R.P., BOSKEN, C.H., LOUDON, R.G., HURTUBISE, P., and WESSELER, T.
Quantitation of bronchoalveolar lavage with methylene blue.
Am. Rev. Respir. Dis. 1983, 128, 266-270.
7. BAYARD, B., KERCKAERT, J.P., LAINE, A., and HAYEM, A.
Uniformity of glycans within molecular variants of α_1 -protease inhibitor with distinct affinity for concavalin A.
Eur. J. Biochem. 1982, 124, 371-376.
8. BELL, D.Y., HASEMAN, J.A., SPOCK, A., Mc LENNAN, G., and HOOK, G.E.R.
Plasma proteins of the bronchoalveolar surface of the lungs of smokers and non-smokers.
Am. Rev. Respir. Dis. 1981, 124, 72-79.
9. BIETH, J., SPIESS, B., and WERMUTH, C.G.
The synthesis and analytical use of a highly sensitive and convenient substrate of elastase.
Biochem. Med. 1974, 11, 350-357.
10. BIETH, J., COLLIN-LAPINET, G.M. and ROBERT, L.
Elastases: Structure, function and pathological role.
In: Frontiers of Matrix Biology, vol. 6, 1978, KARGER ed., pp 1 - 82.
11. BOUDIER, C., PELLETIER, A., PAULI, G., and BIETH, J.G.
The functional activity of α_1 -proteinase inhibitor in bronchoalveolar lavage fluids from healthy human smokers and non-smokers.
Clin. Chim. Acta. 1983, 132, 309-315.
12. BRADFORD, M.M.
A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.
Anal. Biochem. 1976, 72, 248-254.

13. CARLSON, J., and STENFLO, J.
The biosynthesis of Rat α_1 -antitrypsin.
J. Biol. Chem. 1982, 257, 12987-12994
14. CARP, H., MILLER, F., HOIDAL J.R., and JANOFF, A.
Potential mechanism of emphysema: α_1 -proteinase inhibitor recovered from lungs of cigarette smokers contains oxidized methionine and has decreased elastase inhibitory capacity.
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 1982, 79, 2041-2045.
15. CARRELL, R.W., JEPSSON, J.O., LAURELL, C.B., BRENNAN S.O., OWEN, M.C., VAUGHAN, L., BOSWELL, D.R.
Structure and variation of human α_1 -antitrypsin.
Nature. 1982, 298, 329-333.
16. COCHRANE, C.G., SPRAGG, R., and REVAK, S.D.
Pathogenesis of the adult respiratory distress syndrome. Evidence of oxidant activity in bronchoalveolar lavage fluid.
J. Clin. Invest. 1983, 71, 754-761.
17. CORDIER, J.F., MORNEJ, J.F., LASNE, Y., GERARD, J.P., CORDIER, G., CREYSSEEL, R., and TOURAINE, R.
Bronchoalveolar lavage in radiation pneumonitis.
Bull. Eur. Physiopath. Resp. 1984, 20, 369-374.
18. CRYSTAL, R.G., BITTERMAN, P.B., RENNARD, S.I., HANCE, A.J., and KEOGH, B.A.
Interstitial lung diseases of unknown cause. Disorders characterized by chronic inflammation of the lower respiratory tract.
N. Engl. J. Med. 1984, 310, 154-166.
19. DAVIS, G.S., GIANCOLA, M.S., COSTANZA, M.C., and ZOW, R.B.
Analysis of sequential LBA samples from healthy human volunteers.
Am. Rev. Respir. Dis. 1982, 126, 611-616.
20. DELACROIX, D.L., and VAERMAN, J.P.
Influence of molecular size of IgA on its immunoassay by various techniques. III Immunonephelometry.
J. Immunol. Methods. 1982, 51, 49-55.
21. FELDING, P.
Electroimmunoassay of prealbumin in cerebrospinal fluid.
Clin. Chem. 1984, 30, n 3, 498.
22. FICK, R.B., NAEGEL, G.P., SQUIER, S.U., WOOD, R.E., GEE, J.B.L., and REYNOLDS, H.Y.
Proteins of the cystic fibrosis respiratory tract.
J. Clin. Invest. 1984, 74, 236-248.
23. GADEK, J.E., FELLS, G.A., and CRYSTAL, R.G.
Cigarette smoking induces functional antiprotease deficiency in the lower respiratory tract of humans.
Science. 1979, 206, 1315-1316.
24. GADEK, J.E., HUNNINGHAKE, G.W., FELLS, G.A., ZIMMERMAN, R.L., KEOGH, B.A., and CRYSTAL, R.G.
Evaluation of the protease-antiprotease theory of human destructive lung disease.
Bull. Eur. Physiopath. Resp. 1980, 16 (suppl), 27-40.

25. GADEK, J.E., CRYSTAL, R.G.
 α_1 -antitrypsin deficiency.
The metabolic basis of inherited diseases (eds Stanbury, J.B., Wyngaarden, J.B., Fredrickson, D.S., Goldstein, J.L., and Brown, M.S.) (Mc Graw-Hill, New York 1981, 1450-1465).
26. GADEK, J.E., FELLS, G.A., ZIMMERMAN, R.L., RENNARD, S.I., and CRYSTAL, R.G.
Antielastases of the human alveolar structures. Implications for the protease-antiprotease theory of emphysema.
J. Clin. Invest. 1981, 68, 889-898.
27. GADEK, J.E., KLEIN, H.G., HOLLAND, F.V., and CRYSTAL, R.G.
Replacement therapy of α_1 -antitrypsin deficiency.
J. Clin. Invest. 1981, 68, 1158-1165.
28. GEIGER, T., NORTHEMANN, W., SCHMELZER, E., GROSS, V., GAUTHIER, F., and HEINRICH, P.C.
Synthesis of α_1 -antitrypsin in Rat liver hepatocytes and in a cell free system.
Eur. J. Biochem. 1982, 126, 189-195.
29. GIRARD, F., TOURNIER, J.M., POLU, J.M., and SADQUL, P.
Characterization of a bronchial inhibitor in the sputum of chronic bronchitics.
Bull. Eur. Physiopath. Resp. 1980, 16 (suppl), 237-245.
30. GROSS, V., GEIGER, T., TRAN-THI, T.A., GAUTHIER, F., and HEINRICH, P.C.
Biosynthesis and secretion of α_1 -antitrypsin in primary cultures of Rat hepatocytes.
Eur. J. Biochem. 1982, 129, 317-323.
31. GROSS, V., KAISER, C., TRAN-THI, T.A., SCHMELZER, E., WITT, I., PLUMMER, T.H., and HEINRICH, P.C.
N-terminal amino-acid sequences of precursor and mature of α_1 -antitrypsin.
FEBS Lett. 1983, 151, 201-205.
32. HAYEM, A., SCHARFMAN, A., LAINE, A., LEBAS, J., et KOPACZEWSKI, A.
Composition protéique et enzymatique des liquides de lavage bronchique et broncho-alveolaire de six sujets normaux.
Bull. Eur. Physiopath. Resp. 1979, 15, 611-624.
33. HAYEM, A., SCHARFMAN, A., LAINE, A., LAFITTE, J.J., and SABLONNIERE, B.
Proteases and antiproteases in bronchoalveolar lavage.
Bull. Eur. Physiopath. Resp. 1980, 16 (suppl), 247-258.
34. HERION, P., SIBERDT, D., FRANCOU, M., URBAIN, T., and BOLLEN, A.
Monoclonal antibodies against plasma protease inhibitors : II. Production and characterization of 25 monoclonal antibodies against human α_1 -antitrypsin. Correlation between antigenic structure and functional sites.
Biosci. Rep. 1984, 4, 139-147.
35. HOCHSTRASSER, K., BRETZEL, G., FEUTH, H., HILLA, W., and LEMPART, K.
The inter- α -trypsin inhibitor as precursor of the acid-stable proteinase inhibitors in human serum and urine.
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 1976, 357, 153-162.
36. HOCHSTRASSER, K.
The acid stable proteinase inhibitors of the respiratory tract: chemistry and function.
Bull. Eur. Physiopath. Resp. 1980, 16 (suppl), 223-228.

37. HOCHSTRASSER, K., ALBRECHT, G.J., SCHONBERGER, O.L., RASCHE, B., and LEMPART, K.
An elastase specific inhibitor from human bronchial mucus. Isolation and characterization.
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 1981, 362, 1369-1375.
38. HOUHALA, I.A., PARVIAINEN, M.T., and PASTERNAK, A.
A comparison of three different methods of concentration of urinary proteins.
Clin. Chim. Acta. 1984, 142, 339-342.
39. HUNNINGHAKE, G.W., GADEK, J.E., KAWANAMI, O., FERRANS, V.J., and CRYSTAL, R.G.
Inflammatory and immune processes in the human lung in health and disease: evaluation by bronchoalveolar lavage.
Am. J. Pathol. 1979, 92, 149-198.
40. JANOFF, A., CARP, H., LEE, D.K., and DREW, R.T.
Cigarette smoke inhalation decreases α_1 -antitrypsin activity in Rat lung.
Science. 1979, 206, 1313-1314.
41. JANOFF, A.
Biochemical links between cigarette smoking and pulmonary emphysema.
J. Appl. Physiol. 1983, 55, 285-293.
42. KEOGH, B.A., HUNNINGHAKE, G.W., LINE, B.R., and CRYSTAL, R.G.
The alveolitis of pulmonary sarcoidosis. Evaluation of natural history and alveolitis-dependent changes in lung function.
Am. Rev. Resp. Dis. 1983, 128, 256-265.
43. KERCKAERT, J.P.
Highly simplified analytical or preparative slab electrophoresis.
Anal. Biochem. 1978, 84, 354-360.
44. KIDD, V.J., GOLBUS, M.S., WALLACE, R.B., ITAKURA, K., and WOO, S.L.C.
Prenatal diagnosis of α_1 -antitrypsin deficiency by direct analysis of the mutation site in the gene.
N. Engl. J. Med. 1984, 310, 639-641.
45. KUEPPERS, F., and BROMKE, B.J.
Protease inhibitors in tracheobronchial secretions.
J. Lab. Clin. Med. 1983, 101, 747-757.
46. LAURELL, C.B.
Electroimmuno assay.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 1972, 29 (suppl), 21-25.
47. LAURELL, C.B., PIERCE, J., PERSSON, U., and THULIN, E.
Purification of α_1 -antitrypsin from plasma through thiol-disulfide interchange.
Eur. J. Biochem. 1975, 57, 107-113.
48. LEE, C.T., FEIN, A.M., LIPPMANN, M., HOLTZMAN, H., KIMBEL, F., and WEINBAUM, G.
Elastolytic activity in pulmonary lavage fluid from patients with adult respiratory distress syndrome.
N. Engl. J. Med. 1981, 304, 192-196.
49. LEMAIRE, I.
Characterization of bronchoalveolar cellular response in experimental asbestosis.
Am. Rev. Resp. Dis. 1985, 131, 144-149.

50. LOW, R.B., DAVIS, G.S., GIANGOLA, M.S.
Biochemical analysis of bronchoalveolar lavage fluids of healthy human volunteer smokers and nonsmokers.
Am. Rev. Respir. Dis. 1978, 119, 863-875.
51. MANCINI, G., CARBONARA, A.O., and HEREMANS, J.F.
Immunochemical quantification of antigens by single radial immunodiffusion.
Immunochemistry. 1965, 2, 235-254.
52. Mc GUIRE, W.W., SPRAGG, R.G., COHEN, R.B., and COCHRANE, C.G.
Studies of the pathogenesis of the adult respiratory distress syndrome.
J. Clin. Invest. 1982, 89, 543-553.
53. MERRITT, T.A., COCHRANE, C.G., HOLCOMB, K., BOHL, B., HALLMAN, M., STRAYER, D., EDWARDS III, D.K., and GLUCK, L.
Elastase and α_1 proteinase inhibitor activity in tracheal aspirates during respiratory distress syndrome.
J. Clin. Invest. 1983, 72, 656-666.
54. MOROI, M., YAMASAKI, M.
Mechanism of interaction of bovine trypsin with human antitrypsin.
Biochim. Biophys. Acta. 1974, 359, 130-141.
55. MORRISON, H.M., AFFORD, S.C., and STOCKLEY, R.A.
Inhibitory capacity of α_1 -antitrypsin in lung secretions: variability and the effect of drugs.
Thorax. 1984, 39, 510-516.
56. NIEDERMAN, S., FRITTS, L.L., MERRILL, W.W., FICK, R.B., MATTHAY, A., REYNOLDS, H., and GEE, J.B.L.
Demonstration of free elastolytic metalloenzyme in human lung lavage fluid and its relationship to alpha α_1 -antitrypsin.
Am. Rev. Respir. Dis. 1984, 129, 943-947.
57. OHLSSON, K., TEGNER, H., and AKESSON, U.
Isolation and partial characterization of a low molecular weight acid-stable protease inhibitor from human bronchial secretion.
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 1977, 358, 583-589.
58. PARVIAINEN, M.T., HARMONINEN, A. and VISAKORPI, J.K.
Immunonephelometric quantification of serum vitamin D-binding globulin.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 1982, 42, 571-575.
59. PESCE, A.J., HSU, A., KORNHAUSER, C., SETHI, K., OOI, B.S., and POLLAK, V.E.
Methods for measuring the concentration of urinary proteins according to the molecular size category.
Clin. Chem. 1976, 22, 667-672.
60. REYNOLDS, H.Y., and NEWBALL, H.H.
Analysis of proteins and respiratory cells obtained from human lungs by bronchial lavage.
J. Lab. Clin. Med. 1974, 84, 559-573.
61. ROSEMBERG, S., BARR, P.J., NAJARIAN, R.C., and HALLEWELL, R.A.
Synthesis in yeast of a functional oxidation-resistant mutant of human α_1 -antitrypsin.
Nature, 1984, 312, 77-80.

62. ROTH, C., HUCHON, G.J., ARNOUX, A., STANIS, L.A.S., LEGUERN, G., MARSAC, J.H., and CHRETIEN, J.
Bronchoalveolar cells in advanced pulmonary sarcoidosis.
Am. Rev. Resp. Dis. 1981, 124, 9-12.
63. SILVER, R.M., METGALF, J.F., STANLEY, J.H., and CARWILE Le ROY, E.
Interstitial lung disease in scleroderma. Analysis by bronchoalveolar lavage.
Arthritis and Rheumatism. 1984, 27, 1254-1262.
64. STEINBUCH, M.
The inter- α -trypsin inhibitor.
Methods Enzymol. 1976, 45, 760-772.
65. STOCKLEY, R.A.
Proteolytic enzymes, their inhibitors and lung diseases.
Clin. Sci. 1983, 64, 119-126.
66. STOCKLEY, R.A., and AFFORD, S.C.
The interaction of cigarette smoke solution with α_1 -antitrypsin : effect of inhibitory capacity, electrophoretic mobility and immunological measurement.
Clin. Sci. 1983, 64, 223-230.
67. STOCKLEY, R.A., and AFFORD, S.C.
The immunological assessment of α_1 -antitrypsin with reference to its function in bronchial secretions.
Clin. Sci. 1983, 65, 373-381.
68. STOCKLEY, R.A.
Measurement of soluble proteins in lung secretions.
Thorax. 1984, 39, 241-247.
69. STOCKLEY, R.A., and AFFORD, S.C.
Qualitative studies of lung lavage α_1 -proteinase inhibitor.
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 1984, 365, 503-510.
70. STOCKLEY, R.A., and AFFORD, S.C.
The effect of leucocyte elastase on the immunoelectrophoretic behaviour of α_1 -antitrypsin.
Clin. Sci. 1984, 66, 217-224.
71. STOCKLEY, R.A., HILL, S.L., MORRISON, H.M., and STARKIE, C.M.
Elastolytic activity of sputum and its relation to purulence and to lung function in patients with bronchiectasis.
Thorax. 1984, 39, 408-413.
72. STOCKLEY, R.A., MORRISON, H.M., SMITH, T., and TETLEY, T.
Low molecular mass bronchial proteinase inhibitor and α_1 -proteinase inhibitor in sputum and bronchoalveolar lavage.
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 1984, 365, 587-595.
73. STONE, P.T., CALORE, J.D., Mc GOWAN, S.E., BERNARDO, J., SNIDER, G.L., FRANZBLAU, C.
Functional α_1 -protease inhibitor in the lower respiratory tract of cigarette smokers is not decreased.
Science. 1983, 221, 1187-1189.
74. STONE, P.J., FRANZBLAU, C., and KAGAN, H.M.
Proteolysis of insoluble elastin.
Methods Enzymol. 1982, 82, 588-605.

75. STROUD, R.M., KRIEGER, M., KOEPPE, R.E., KOSSIAKOFF, A.A. and CHAMBERS, J.L.
Structure-function relationships in serine proteases, in proteases and biological control
Rech, E., RIFKIN, D.B., and SHAW, E., eds, 1975, 13-32, cold spring Harbor.
76. TEGNER, H.
Quantitation of human granulocyte protease inhibitors in non-purulent bronchial lavage fluids.
Acta Otolaryngol. 1978, 85, 282-289.
77. TONNELL, A.B., VOISIN, C., LAFITTE, J.J., ROMON, P., et AERTS, C.
Variations des populations cellulaires recueillies par lavage broncho-alveolaire en fonction de la topographie des lesions et de l'étage exploré.
Bull. Eur. Physiopath. Resp. 1979, 15, 30 P.
78. TRAVIS, J., and FANNELL, R.
Selective removal of albumin from plasma by affinity chromatography.
Clin. Chim. Acta. 1973, 49, 49-52.
79. TRAVIS, J., and SALVESEN, G.S.
Human plasma proteinase inhibitors.
Ann. Rev. Biochem. 1983, 52, 655-709.
80. VALETTE, I., POINTIS, J., RONDEAU, Y., WANE, M., and ENGLER, R.
Is immunochemical determination of haptoglobin phenotype dependent.
Clin. Chim. Acta. 1979, 99, 1-6.
81. VAUGHAN, L., LORIER, M.A., and CARRELL, R.W.
 α_1 -Antitrypsin microheterogeneity isolation and physiological significance of isoforms.
Biochim. and Biophys. Acta. 1982, 701, 339-345.
82. VERBANAC, K.M., and HEATH, E.C.
Biosynthesis and processing of Rat α_1 -antitrypsin.
Arch. Biochem. Biophys. 1983, 223, 149-157.
83. VIRCA, G.D., METZ, G., and SCHNEBLI, H.P.
Similarities between human and Rat leucocyte elastase and cathepsin G.
Eur. J. Biochem. 1984, 144, 1-9.
84. WACHTER, E., and HOCHSTRASSER, K.
Kunitz-type proteinase inhibitors derived by limited proteolysis of the inter- α - trypsin inhibitor IV.
The amino-acid sequence of the human urinary trypsin inhibitor isolated by affinity chromatography.
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 1981, 362, 1351-1355.
85. WALSH, R.L., COLES, M.E., and GEARY, T.D.
Evaluation of two commercially available laser nephelometers and their recommended methods for measurement of serum immunoglobulins G.
Clin. Chem. 1979, 25/1, 151-156.
86. WALSH, R.L., and COLES, M.E.
Binding of IgG and other proteins to microfilters.
Clin. Chem. 1980, 26/3, 496-498.

87. WHICHER, J.Y., and BLOW, C.
Formulation of optimal conditions for an immunonephelometric assay.
Ann. Clin. Biochem. 1980, 17, 170-177.
88. WYSS, A., VIRCA, G.D., and SCHNERBLI, H.P.
Cigarette smoke components are not very effective in directly inactivating α_1 -proteinase inhibitor.
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 1984, 365, 511-516.

Cette thèse a été imprimée
par l'ASSOCIATION CORPORATIVE DES
ETUDIANTS EN MEDECINE
DE LILLE

Jamal EL YAMANI

L' α_1 -ANTIPROTEASE DES LAVAGES BRONCHO-ALVEOLAIRES :
DETERMINATION IMMUNOLOGIQUE ET ACTIVITE FONCTIONNELLE.
INTERET CLINIQUE.

RESUME :

L' α_1 -antiprotéase (α_1 AP) ou α_1 -antitrypsine joue un rôle essentiel dans la protection de l'alvéole pulmonaire. Cet inhibiteur est lui-même l'objet d'agressions diverses qui le modifient et lui font perdre son activité : complexation avec certaines sérine-protéases et notamment l'élastase leucocytaire, protéolyse ou oxydation par divers agents dont certains sont présents dans la fumée de cigarette.

Le rôle de l' α_1 AP dans les poumons ne peut donc être évalué que par la détermination conjointe de sa concentration antigénique et de son activité fonctionnelle.

Le dosage de l' α_1 AP immunoréactive dans les liquides de lavage broncho-alvéolaires (LBA) par néphélométrie-laser présente des avantages évidents de praticabilité. Cette technique est, de plus, moins sensible que l'électroimmunodiffusion à la diversité des formes moléculaires de l' α_1 AP présentes dans ce milieu. Enfin, elle est réalisée directement sur le LBA sans concentration préalable, ce qui limite les risques d'erreur.

Le dosage de l'activité inhibitrice de l'élastase pancréatique de Porc qui, dans le LBA, est essentiellement due à l' α_1 AP, a d'autre part été automatisé. La précision, l'exactitude et la sensibilité de la méthode sont ainsi nettement améliorées.

Ces techniques ont été appliquées à l'étude de 283 lavages, pratiqués chez des patients atteints de diverses pneumopathies. Dans ces échantillons le taux d' α_1 AP fonctionnelle, exprimé en se référant au taux de protéines totales est fréquemment diminué. Dans ce cas, des formes non fonctionnelles d' α_1 AP sont retrouvées, leur concentration n'est pas corrélée avec le nombre de polynucléaires neutrophiles présents dans ces LBA.

Celles-ci sont retrouvées en particulier dans certains cas de fibroses et de sarcoidoses. Leur détermination pourrait représenter un nouveau moyen permettant de prévoir l'évolutivité de ces affections.

MOTS CLEFS:

liquide de lavage broncho-alvéolaire, α_1 -antiprotéase, détermination immunologique, activité fonctionnelle, automatisation, syndromes inflammatoires.