

Aspects qualitatifs des protéines du liquide amniotique au cours du dernier trimestre d'aménorrhée chez la femme gestante à Cotonou, Bénin

S.A. Akpona¹, N. Bere¹, J. De Souza², E. Alihonou², Th. De Vonne Lebreton³, H. Mouray³, H.J. Parra⁴

¹Laboratoire de Biochimie (UER de Biochimie), FSS/UNB, B.P. 188, Cotonou, Bénin

²Clinique Universitaire de Gynécologie et d'Obstétrique, CNHU, B.P. 386, Cotonou, Bénin

³Laboratoire des Protéines Plasmatiques, UER de Médecine, Université François Rabelais, Tours, France

⁴Institut Pasteur de Lille, Lille, France et Laboratoire National de Santé Publique, Brazzaville, Congo

ABSTRACT

Qualitative aspects of amniotic fluid proteins during the last trimester of pregnancy in Cotonou, Bénin

An amniotic fluid immunoelectrophoresis using a total amniotic antibody immunoadsorbed with normal human and pregnant women sera is presented. This antibody is able to reveal 4 or 5 antigenic components. These findings confirm the idea of a possible local synthesis activity of proteins by the amniochorial structures. The origin of such antigenic components is to be determined in order to point out their possible role during pregnancy

RESUME

Un immunosérum anti - liquide amniotique total a été "immuno-équisé" contre un mélange de sérums humains normaux et de sérums de femmes enceintes. Une immunoelectrophorèse du liquide amniotique contre cet anticorps permet de mettre en évidence 4 à 5 arcs de précipitation correspondant à des antigènes propres à ce liquide biologique. Ce résultat semble confirmer l'hypothèse d'une synthèse locale de protéines au niveau des structures amniochoriales. La détermination ultérieure de l'origine de ces antigènes permettra certainement d'entrevoir leurs rôles physiopathologiques probables au cours de la grossesse.

INTRODUCTION

Les membranes amniotiques sont perméables à de nombreuses substances parmi lesquelles des électrolytes, le glucose, l'urée, la créatinine, et certaines protéines de poids moléculaire inférieur à 150 Kd. Par ailleurs, la membrane amnio-choriale de même que la caduque seraient le lieu d'activité de synthèse de substance comme la prolactine et les lipides parmi lesquels les triglycérides, l'ester de cholestérol et l'acide arachidonique. Enfin on retrouverait, au niveau de ces membranes des activités enzymatiques et de transfert de substances, surtout dans l'amnio-chorion qui constitue la plus grande surface métabolique au contact du liquide amniotique (1, 2). Ainsi le liquide amniotique (LA) est un transudat materno - foetal riche en protéines du plasma maternel essentiellement.

Comparer les protéines du sérum humain normal (NHS) à ceux de ce liquide biologique afin de déterminer laquelle ou lesquelles lui sont spécifiques comme c'est le cas pour d'autres liquides biologiques (3) est le but de la présente étude.

MATERIEL ET METHODE D'ETUDE

Le matériel de départ est un mélange de liquides

amniotiques (LA) réalisé à partir des prélèvements provenant de la Clinique Universitaire de Gynécologie et d'Obstétrique (CUGO) du Centre National Hospitalier et Universitaire de Cotonou. Ce liquide est prélevé après la 34^{ème} semaine d'aménorrhée par amniocentèse sans échoguidage (4, 5, 6, 7). Il s'agit, chez la totalité des femmes prélevées, de grossesses normales sans pathologie maternelle associée, l'amniocentèse ayant été indiquée pour déterminer la maturité foetale devant une imprécision de terme et/ou une souffrance foetale in utero (6).

L'immunosérum anti-liquide amniotique polyvalent est obtenu après immunisation de chèvres de race lagunaire selon un protocole décrit précédemment (8). Une précipitation au sulfate d'ammonium à 50% de saturation, suivie d'une dialyse exhaustive contre du NaCl 0,15 M, permet d'avoir l'anticorps concentré.

Une partie de cet immunosérum subit un "immuno-épuiement" selon le schéma que voici: on réalise un mélange anticorps-sérum de femme enceinte 5: 1 (V/V) (le sérum de femme enceinte est un mélange d'échantillons de sang prélevés au 1^{er}, 2^{ème} et 3^{ème} trimestre de la grossesse), en présence de 100µl de polyéthylène glycol (PEG) 6000 à 5% dans l'eau. Après incubation pendant une heure à 37°C, l'ensemble est laissé à +4°C pendant une nuit. Une centrifugation à 4000 rpm pendant 20 mn permet d'obtenir un

surnageant susceptible de ne contenir que les immunoglobulines anticorps dirigées contre les "protéines propres" au LA ou du moins absent dans le sérum de femme enceinte (SFE) et/ou dans le sérum humain normal (NHS). Ce surnageant concentré subit une purification supplémentaire par passage sur une colonne de DEAE Sephadex A50 (1,6x35 cm) équilibrée en tampon acétate 100 mM pH 6,5 azide de sodium 0,01% qui permet d'avoir les immunoglobulines anticorps dans le premier pic de fractions non retenues par le gel (9).

Avec les différents anticorps ainsi disponibles (anticorps polyvalent anti protéines totales humaines, anti-LA polyvalent et anti-LA "immuno-épuisé"), nous avons réalisé une immunodiffusion selon la méthode d'OUCHTERLONY, une immunoelectrophorèse selon GRABAR et WILLIAMS (10), et une immunoelectrophorèse bidimensionnelle. Toutes les techniques électrophorétiques ont été réalisées dans un système de cuve non réfrigérée avec un courant de 200 volts sans dépasser 20 mA par plaque de 8x8 cm. Le système tampon est du Tris-Véronal-Lactate de calcium dans les proportions de (44,3:22,4:0,533 w/w). Le conservateur utilisé est de l'azide de sodium à 0,65g/l. La quantité d'anticorps incorporée dans le gel de deuxième dimension est comprise entre 30 et 50µl par ml de gel refroidi entre 45 et 50°C.

RESULTATS

Une électrophorèse haute résolution (HRE) (figure I) compare le profil protéique du LA à celui du sérum de femme enceinte. La double diffusion d'OUCHTERLONY en utilisant l'anti-LA "immuno-épuisé" contre le même liquide permet de révéler trois arcs de précipitation. La spécificité de ces arcs est attestée par le même test qui montre que cet anticorps ne réagit ni contre le SFE ni contre le NHS. Par ailleurs, ce résultat prouve aussi que la méthode d'épuisement utilisée a bien permis de précipiter la presque totalité des protéines du sérum humain normal à l'exclusion de celles propre au LA.

L'immunoelectrophorèse (figure II) confirme ces résultats; elle permet de révéler 4 arcs de précipitation lorsque le LA réagit contre son anticorps polyvalent "immuno-épuisé". Ce résultat montre la supériorité, du point de vue de la sensibilité, de cette technique par rapport à celle de l'immunodiffusion d'OUCHTERLONY. Ainsi, après épuisement exhaustif, on identifie deux arcs de mobilité alpha 2, un arc en position bêta et un dernier arc de mobilité gamma.

L'anti-LA polyvalent réagit contre au moins 18 antigènes humains et contre une quinzaine de protéines du transudat materno-foetal (figures III et IV). Après "immuno-épuisement" on révèle, dans nos conditions, cinq arcs de précipitation assez nettement identifiables (figure V) par comparaison à ceux obtenus dans les figures n° II e III.

DISCUSSION

Les protéines retrouvées dans le liquide amniotique

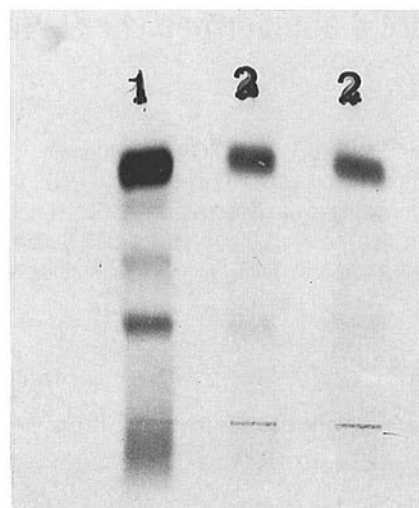


Figure I
Electrophorèse Haute Résolution (HRE) en gel d'agarose à 0,8%.
1: 2 µl de sérum de femme enceinte (SFE). 2: 2 µl de LA concentré de 15 fois.

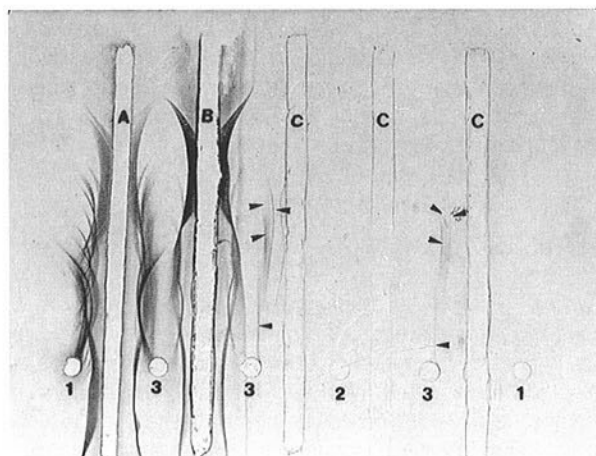


Figure II
Immunoelectrophorèse en gel d'agarose à 0,8%. 1: 5 µl de sérum humain normal (NHS). 2: 5 µl de sérum de femme enceinte (SFE). 3: 5 µl de LA concentré. A: Anti - NHS polyvalent. B: Anti - LA polyvalent. C: Anti - LA "Immuno-épuisé"

sont d'origine essentiellement maternelle. Leur passage dans ce milieu est transmembranaire, au niveau de la membrane amnio-choriale dont la structure poreuse autorise de tels transferts (2, 11). Cependant, selon SUTCLIFFE et al. cité par SORENSSEN (12), ces membranes participent à la production de la protéinamnie dans une proportion d'au moins 3%.

Nous avons mis en évidence au moins cinq constituants antigéniques appartenant uniquement au liquide amniotique et que l'on ne retrouve pas dans le plasma humain. Ici le qualificatif de "protéines non plasmatiques"

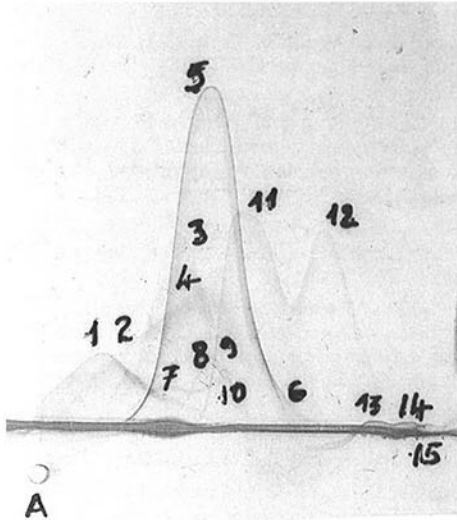


Figure III
Immunoélectrophorèse bidimensionnelle de 5 µl de LA. Deuxième dimension contre 15 µl/ml d'anti - LA polyvalent. Les différents arcs identifiés sont numérotés de 1 à 15

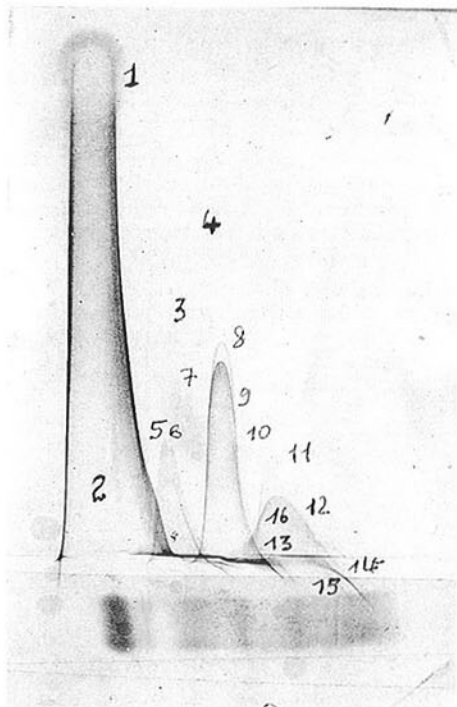


Figure IV
Immunoélectrophorèse bidimensionnelle de NHS (2 µl) en première dimension; le gel de deuxième dimension contient 25 µl d'anti- NHS polyvalent. Les différents arcs de précipitation identifiés sont numérotés de 1 à 15; certains arcs, très flous du fait de la redissolution partielle du précipité Ag/Ac, n'ont pas pu être numérotés

veut dire que ces antigènes ne sont décelables ni dans le sérum humain normal, ni dans celui de la femme enceinte.

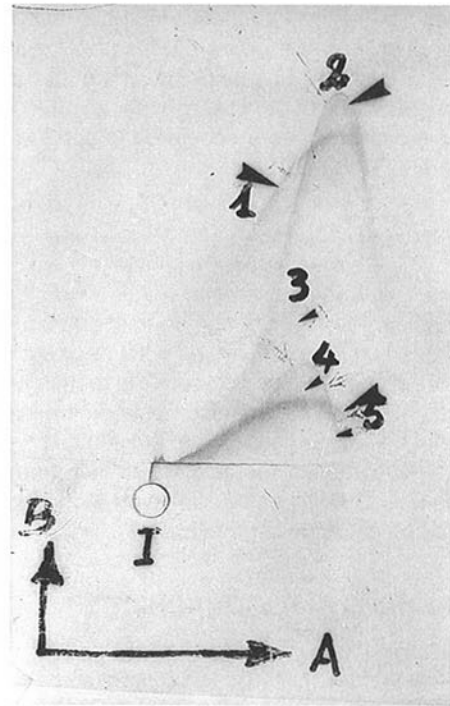


FIGURE V
Immunoélectrophorèse bidimensionnelle de LA concentré 15 fois (10 µl) en première dimension; le gel de seconde dimension contient 30 µl/ml d'anti - LA "immuno-épuisé" Les arcs de précipitation identifiés sont numérotés de 1 à 5

Dans nos conditions de travail, le LA utilisé a été concentré au moins 15 fois. En effet, des anticorps contre certains composants faiblement présents dans le plasma pourraient de ce fait persister après un épuisement alors considéré comme étant exhaustif. Cependant, la technique de l'immunoélectrophorèse de double dimension est une méthode dont la sensibilité est assez grande pour permettre la mise en évidence d'antigènes plasmatiques (3) même sous forme de traces.

Les antigènes en position bêta et gamma peuvent être respectivement comparés à une "bêta trace" et une "gamma trace". Ils proviendraient probablement du tractus urinaire du fœtus. Ces protéines n'auraient alors aucune communauté antigénique avec leurs homologues du plasma (14, 15). Les deux arcs de mobilité alpha 2, très voisins l'un de l'autre, restent très difficiles à situer du point de vue de leur origine. Une recherche de communauté antigénique avec les protéines d'autres organes ou milieux biologiques fœtaux est indispensable pour permettre la détermination de cette origine (1, 16, 17). Cette démarche peut, par ailleurs, permettre d'entrevoir le rôle physiologique et/ou pathologique de chacun de ces constituants du LA. Quelque soit le cas, il n'est pas exclu que l'un ou l'autre de ces constituants antigéniques soit le fait d'une synthèse locale au niveau de la membrane amniotique où une certaine activité de synthèse a été décrite (2, 12). Toutes ces observations doivent être considérées avec beaucoup de réserve car ce travail mérite d'être poursuivi.

Il serait utile de procéder à la purification de chacun de ces antigènes aux fins de caractérisation physicochimique et d'études physiologiques. Ces études pourraient déboucher sur la mise en évidence d'un marqueur protéique sensible et utilisable pour le diagnostic et/ou le suivi des pathologies rencontrées au cours de la période gravidopuerpérale (16, 17, 18).

CONCLUSION

Après "immuno-épuisement", nous avons à identifier cinq constituants antigéniques "propres" au liquide amniotique et que l'on ne retrouve pas dans le plasma humain normal. Il est important de poursuivre la recherche sur ces antigènes avec une comparaison et la détermination des communautés antigéniques entre eux et ceux des autres milieux et/ou organes fœtaux. Ce travail permettra de déterminer leur origine et leurs rôles physiopathologiques probables au cours de la grossesse.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Bell S.C., Hales M.W., Patel S.R., Kirwna P.H., Drife J.O., Milford-Ward A. Amniotic fluid concentrations of secreted pregnancy-associated endometrial alpha 1 and alpha 2 globulin (alpha 1 and alpha 2 PEG), *British J Obstet Gynaecol* 1986; 93: 909-915.
- Codoccione X., Lecoutour R., Delecourt M., Biserte G.G. Physiologie du liquide amniotique. EMC (Paris) 1985; 6 A10: 1-17.
- Bock E. Non plasma proteins in cerebro-spinal fluid. *Scand J Immunol* 1973; 2 Suppl. 1: 119-124.
- Gautray J.P., Vielh J.P. et Huraux-Rendu C.H. Amniocentèse en fin de gestation: intérêt, appréciation du risque. *Nouv Presse Méd* 1980; 9 (13): 929-932.
- Harison R., Campbel S., Craft I. Risks of fetomaternal hemorrhage resulting from amniocentesis with an without ultrasound placental localization. *Obste Gynecol* 1975; 46(4): 386-391.
- Henrion P., Papa P. Risques de l'amniocentèse. *Concours Méd* 1981; 103 (5): 525-530.
- Vialard J., Le Marec B., Giraud J.R. Amniocentèse: technique, indications, accidents. EMC (Paris) 1985; 12 D10: 1-10.
- Akpona S.A., Kouphin E., Fatoke M. et Coll. Isolement et purification des immunoglobulines A, G et M: préparation d'immunsérums à visée diagnostique. XXIIIème J Méd Pharma; Dakar 1991.
- Harboe N., and Agnete Ingild. Immunisation, isolation of immunoglobulins, estimation of antibody titre. *Scand J Immunol* 1973; 2 suppl. 1: 161-164.
- Grabar P., Williams C.A. Méthode permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et immunologiques d'un mélange de protéins: application au sérum humain. *Biochim Biophys Acta (Amst)* 1953; 10: 193.
- Burnett D, et Dradwel A.R. The origin of plasma proteins in human amniotic fluid: the significance of alpha-1-antichymotrypsin complexe. *Biol Neonate* 1980; 37 (5.6): 302-307.
- Sorensen S. Isolation of amniotic fluid proteins of non-maternal serum origin by negative immuno-affinity chromatography. *Clin Chim Acta* 1991; 202: 199-210.
- Weeke B. Crossed immunoelectrophoresi. *Scand J Immunol* 1973; 2 Suppl. 1: 47-56.
- Axelsen N.H., Bock E., Kroll J. Comparison of antigens: the reaction of "identify". *Scand J Immunol* 1973; 2 Supl. 1: 92-94.
- Bock E., Axelsen N.H. Comparison of antigens: the reaction of partial "identity". *Scand J Immunol* 1973; 2 Suppl. 1: 95-99.
- Price K.M., Robert Silman R., Grudzinskas J.G. Isolation of fetal antigen 2 and assay standardisation. *Clin Chim Acta* 1994; 226: 83-88.
- Toby N. Fay, IAN Jacobs, Borge Teisner, Otto Poulsen et al. Two fetal antigens (FA-1 and FA2) and endometrial proteins PP12 and PP14) isolated from amniotic fluid: preliminary observations in fetal and maternal tissues. *Eur J Obstet Gynecol Reprod* 1988; 29: 73-85.
- Locckwood C.J., Bach R., Guha A., Zhou X., Miller W., and Nemerson Y. Amniotic fluid contains tissue factor, a potent initiator of coagulation. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 165: 1335-1341.