



HAL
open science

Étude de la réactivité d'anticorps vis-à-vis de leurs antigènes adsorbés à une interface solide/solution - Aspects dynamiques de processus interfaciaux

Philippe Huetz

► **To cite this version:**

Philippe Huetz. Étude de la réactivité d'anticorps vis-à-vis de leurs antigènes adsorbés à une interface solide/solution - Aspects dynamiques de processus interfaciaux. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Louis Pasteur de Strasbourg, 1994. Français. NNT: . tel-03398620

HAL Id: tel-03398620

<https://hal.science/tel-03398620>

Submitted on 23 Oct 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Thèse

présentée à

l'UNIVERSITE LOUIS PASTEUR DE STRASBOURG

pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université Louis Pasteur

par

Philippe HUETZ

Etude de la réactivité d'anticorps vis-à-vis de leurs antigènes adsorbés
à une interface solide/solution -
Aspects dynamiques de processus interfaciaux

Soutenue le 22 Décembre 1994 devant la Commission d'Examen

MM.	A. SCHMITT	Président
	W. NORDE	Examineur
	B. SEBILLE	”
	P. SCHAAF	”
	J.-C. VOEGEL	”

A mes parents

A mon frère et mes soeurs

A ma famille

A la mémoire d'un ami

REMERCIEMENTS

Ce travail a été effectué entre 1991 et 1994 à l'Institut Charles Sadron et au Centre de Recherches Odontologiques (INSERM-CJF92/04), à Strasbourg.

Je tiens à exprimer ma très profonde reconnaissance à Monsieur le Professeur Adrien SCHMITT, Président de l'Université Louis Pasteur de Strasbourg, qui m'a orienté vers cette équipe, a défendu ma cause pour l'obtention d'une bourse MRT, et qui a bien voulu me faire le grand honneur de présider le jury de cette thèse.

Je remercie vivement Monsieur le Professeur Maurice LEIZE, Doyen de la Faculté de Chirurgie Dentaire de Strasbourg, de m'avoir soutenu financièrement au cours de cette dernière année de thèse, ce qui m'a permis de mener ce travail à terme dans les meilleures conditions.

Je remercie Monsieur le Professeur Willem NORDE, de l'Université de Wageningen (Pays-Bas), ainsi que Monsieur le Professeur Bernard SEBILLE, de l'Université de Paris XII, pour leur aimable participation au jury de cette thèse en qualité de rapporteurs.

Je tiens à exprimer ma profonde et respectueuse gratitude à Monsieur le Professeur Pierre SCHAAF et Monsieur le Docteur Jean-Claude VOEGEL, qui ont co-dirigé mon travail. Je les remercie de m'avoir accueilli au sein de leur groupe, de la confiance qu'ils m'ont accordée ainsi que de leur grande disponibilité. Ils ont su me guider à travers les nombreux écueils de cette thèse et me faire partager leur engouement pour la recherche.

Je remercie Madame le Docteur Elizabeth K. Mann de m'avoir initié à la technique de réflectométrie et pour ses relectures rigoureuses de nos manuscrits.

Je voudrais exprimer ma très grande reconnaissance à Monsieur le Docteur Bernard SENGER, car à travers les discussions fructueuses que nous avons eues, il m'a enseigné plus de discernement et d'esprit critique. Ses conseils et ses corrections toujours judicieux, de même que ses qualités d'écoute, me furent d'un grand soutien.

Je tiens à remercier Monsieur le Docteur Philippe DEJARDIN, Directeur de Recherches au CNRS, qui a toujours été d'une extrême gentillesse et m'a toujours soutenu dans mon travail.

Je remercie Monsieur le Docteur Youssef HAIKEL, Maître de Conférences à la Faculté de Chirurgie Dentaire de Strasbourg, de son soutien moral et son amitié. J'ai pu grâce à lui enseigner dans le cadre des cours du CES Biomatériaux, ce qui a constitué pour moi une expérience des plus enrichissantes.

Mes remerciements s'adressent aussi à Monsieur le Docteur Serge BEHR, qui m'a patiemment initié à la technique du marquage radioactif et aux méthodes informatiques, à Monsieur Gilbert MAENNEL pour son aide technique et son soutien constant, à Mesdames les Docteurs Monique FREUND et Catherine RAVANA, du Centre Régional de Transfusion Sanguine de Strasbourg, ainsi qu'à Madame le Docteur Brigitte MIRAS, pour leur aimable collaboration à mon travail concernant la purification des anticorps, à mon cousin Patrice HUETZ, qui a activement participé à l'optimisation du matériel et l'amélioration de programmes informatiques, à Madame le Docteur Nada SCHATZ pour la réalisation de tests ELISA et l'analyse d'échantillons protéiques par HPLC, à Messieurs les Docteurs Christian

PICHOT et Abdelhamid ELAÏSSARI, de l'Ecole Normale Supérieure de Lyon (CNRS-Biomérieux), pour leur accueil dans leur laboratoire et m'avoir enseigné une technique de couplage de protéines sur des billes de latex, à Messieurs les Docteurs Michel HOLLER et Aydin OCAKTAN pour leurs approches de méthodes de couplage ligand-protéine, et à Monsieur Francis NIES pour ses nombreux services informatiques.

J'aimerais enfin témoigner ma profonde amitié et ma sincère reconnaissance à tous ceux qui, à l'Institut Charles Sadron et au Centre de Recherches Odontologiques, m'ont soutenu dans les moments de découragement et m'ont aidé dans mon travail: Françoise, Philippe, Pascal, Anne, Raed, Javier, Vincent, Ben, Patrice, Joëlle, Anne-Lise, Joseph, Nathalie, Hélène et tous les autres.

"Par la foi, nous comprenons que les mondes ont été formés par une parole de Dieu, de sorte que ce que l'on voit provient de ce qui n'est pas apparent".

La Bible, épître aux Hébreux.

"Je ne crois pas au principe d'incertitude: l'incertitude n'est pas de la science, elle est seulement la distance qui nous sépare encore de la vérité. Mais nous parviendrons à l'ultime réponse, parce que le réel est l'expression d'un ordre rationnel d'une grande beauté".

Albert Einstein.

"Ne vous laissez pas atteindre par le scepticisme dénigrant et stérile, ne vous laissez pas décourager par les tristesses de certaines heures... Vivez dans la paix sereine des laboratoires et des bibliothèques... jusqu'au moment où vous aurez peut-être cet immense bonheur de penser que vous avez contribué en quelque chose au progrès et au bien de l'humanité".

Louis Pasteur.

TABLE DES MATIERES

Introduction générale	9
Chapitre I. Caractéristiques physicochimiques, structure et fonction du fibrinogène et des immunoglobulines G	12
INTRODUCTION	13
I. ASPECTS GENERAUX.	14
I. 1. Solubilité des protéines.	14
I. 2. Présence de sucres.	14
II. LES IMMUNOGLOBULINES G.	15
Différences entre les IgG humaines et les IgG de lapin	19
III. LE FIBRINOGENE.	20
IV. DONNEES PHYSICOCHIMIQUES SUR LES MOLECULES DE FIBRINOGENE ET D'IMMUNOGLOBULINE G HUMAINES.	22
V. LA LIAISON ANTIGENE-ANTICORPS.	25
V. 1. Forces impliquées.	25
1) <u>Les forces électrostatiques</u>	25
2) <u>Les liaisons hydrogène</u>	26
3) <u>Les interactions hydrophobes</u>	
4) <u>Les forces de Van de Waals</u>	26
V. 2. Affinité et avidité.	26
V. 3. La réaction croisée.	27
Chapitre II. Adsorption sur une surface de silice: aspects structuraux et propriétés	28
INTRODUCTION	29
I. INFLUENCE DE L'IODE 125 SUR LES PROPRIETES D'ADSORPTION D'UNE PROTEINE.	29
II. LA SURFACE: STRUCTURE DU VERRE.	30
III. QUELQUES REMARQUES GENERALES CONCERNANT L'ADSORPTION.	32
CONCLUSION	33
Chapitre III. Matériels et méthodes	34
INTRODUCTION	35
I. DENATURATION.	35
1. Détergents.	35
2. Forces mécaniques.	36
3. Le froid, la congélation/décongélation, la déshydratation.	36
4. Les radiations.	37
II. LA REFLECTOMETRIE A ANGLE VARIABLE.	38
1. Principe de la méthode.	38
2. Montage.	39
3. Détermination de la concentration surfacique.	41
III. LA TECHNIQUE DE RADIOMARQUAGE.	41
1. L'iode 125 : caractéristiques.	41
Problème lié à la sonde	42
2. Iodation.	43
2.1. La réaction.	43
2.2. Méthode expérimentale.	44

2.3. La résine.	45
2.4. Le monochlorure d'iode.	45
2.5. Le tampon glycine.	46
2.6. Calcul du rapport ^{125}I /protéine et rendement de marquage.	46
3. Tube de silice.	47
3.1. Montage expérimental.	47
3.2. Passivation de la surface interne du tube de verre.	49
3.3. Calibration du tube de silice et calcul de la concentration surfacique des protéines adsorbées.	49
4. Calibration et linéarité des appareils de mesure.	50
4.1. Calibration du Cosynus 62.	50
4.2. Linéarité du signal mesuré sur le tube de silice.	51
4.3. Calibration du compteur γ .	51
4.4. Linéarité du compteur γ .	53
IV. PREPARATION DE L'ACIDE SULFOCHROMIQUE.	55
V. METHODE DE NETTOYAGE DES SURFACES AU HELLMANEX.	56
VI. PREPARATION DU TAMPON PBS ET DES SOLUTIONS DE FIBRINOGENE ET D'IGG.	58
1. Tampon PBS.	58
2. Solutions protéiques.	58
3. Force ionique : PBS, Fibrinogène, IgG.	59
VII. SOLUTIONS D'ANTICORPS DE LAPIN : PURIFICATION ET CARACTERISTIQUES.	61
1. Anti-fibrinogène (anti-Fib).	61
2. Anti-IgG.	62
VIII. IMMUNOPRECIPITATION EN PHASE LIQUIDE.	64
1. Principe de la méthode.	64
2. Procédure expérimentale.	66
Chapitre IV. Réactivité d'anticorps vis-à-vis d'antigènes adsorbés sur une surface solide	68
INTRODUCTION	69
(I). REACTIVITY OF ANTIBODIES ON ANTIGENS ADSORBED ON SOLID SURFACES	70
Experimental methods and materials	71
Results and discussion	75
Layer Structure Determination by Scanning Angle Reflectometry (SAR).	75
The IgG/IgY System.	75
The IgG/anti-IgG System.	75
The Fib/anti-Fib System.	76
Radiotracer Experiments.	77
Isotherms of Human Fibrinogen and γ IgG.	77
Study of the Fib/anti-Fib Reaction.	79
Conclusion	84
Literature Cited	85
II. ANALYSE DE LA REACTIVITE DES ANTICORPS ANTI-FIB ₂ ET ANTI-FIB ₃ : IMMUNOPRECIPITATION EN MILIEU LIQUIDE (TEST DE FARR).	86
1. Solution d'anti-Fib ₂ .	86
2. Solution d'anti-Fib ₃ .	88
3. Conclusion.	90

III. ALTERNATIVES AU PROBLEME DU MARQUAGE PAR LA METHODE DE McFARLANE.	90
1. Marquage par le réactif de Bolton-Hunter.	90
2. Marquage par la chloramine-T.	91
3. Marquage par la peroxidase.	91
4. Préparation de conjugués IgG-Enzyme.	91
5. Utilisation du système avidine-biotine.	91
6. Couplage avec une protéine A ou G.	92
7. Couplage covalent de l'IgG avec une autre protéine ou un peptide.	92
8. Méthode utilisant un anion cyanohydridoborate.	92
9. Utilisation d'un sel de pyridinium.	93
Chapitre V. Réactivité d'anticorps vis-à-vis d'antigènes adsorbés par échange avec une protéine préadsorbée	94
INTRODUCTION	95
I. EXPERIENCES REALISEES PAR LA TECHNIQUE DE MARQUAGE RADIOACTIF.	95
Réactivité des molécules d'anti-Fib sur les molécules de Fib échangées.	96
II. EXPERIENCES REALISEES A L'AIDE DE LA TECHNIQUE DE REFLECTOMETRIE.	99
Chapitre VI. Etude cinétique de l'échange hétérogène IgG/fibrinogène	106
INTRODUCTION	107
EXCHANGE KINETICS FOR A HETEROGENEOUS PROTEIN SYSTEM ON A SOLID SURFACE.	108
Introduction	108
Materials and methods	109
Results and discussion	115
IgG isotherm.	115
Desorption and exchange kinetics.	116
Fixed Fib and exchanged IgG amounts at a given time.	125
Conclusion	127
Conclusion générale	128
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	131
BIBLIOGRAPHIE	136

Introduction générale

Les protéines s'adsorbent aux interfaces solides par deux mécanismes distincts: soit par adsorption directe à partir du volume de la solution en contact avec la surface, soit par échange avec des protéines préalablement adsorbées. Le degré de dénaturation des protéines adsorbées sur des biomatériaux est un problème d'importance cruciale, et il n'est toujours pas établi que les protéines préservent leur activité biologique après adsorption. Dans cette optique, il est important de préciser si le mécanisme d'échange (comparativement au processus d'adsorption) induit une dénaturation, dont la conséquence serait notamment une perte de l'activité biologique. Nous avons à cette fin utilisé la réaction antigène/anticorps comme une sonde de la réactivité vis-à-vis de molécules adsorbées directement ou par échange.

CONTENU DU MEMOIRE:

Avant d'aborder la description de notre travail de recherche couvert par le présent mémoire, nous présentons dans les trois premiers chapitres différents aspects liés aux protéines utilisées, à la structure de l'adsorbant et aux techniques employées. Ainsi dans le **chapitre I**, nous rassemblons un certain nombre de caractéristiques physicochimiques du fibrinogène et des immunoglobulines G. Nous détaillons leur structure, leur fonction, ainsi que la nature de la liaison antigène/anticorps.

Le **chapitre II** insiste sur la structure de la surface étudiée (silice), et résume certaines propriétés importantes concernant l'adsorption, la désorption et l'échange. Nous discutons également de l'influence possible du traceur radioactif sur ces propriétés.

Nous présentons dans le **chapitre III** la liste de toutes les techniques et méthodes expérimentales utilisées. Nous avons mis un accent particulier sur les causes possibles pouvant intervenir dans la dénaturation protéique. Ce chapitre a été rédigé à dessein dans le souci du détail, afin qu'au sein de notre laboratoire, les utilisateurs futurs de cette technologie puissent tirer profit de nos mises au point.

Le travail de thèse proprement dit se résume en trois parties principales: (i) l'étude de la réactivité d'anticorps vis-à-vis de leurs antigènes, lorsque ces derniers sont adsorbés directement sur une surface solide, (ii) l'étude de la réactivité des mêmes systèmes antigène/anticorps, lorsque l'antigène est adsorbé par un processus d'échange avec une couche protéique préadsorbée, et (iii) une analyse dynamique et quantitative du processus d'échange hétérogène IgG/Fibrinogène.

Réactivité après adsorption directe des antigènes (Chapitre IV).

Nous avons dans un premier temps évalué la réactivité antigène/anticorps après adsorption de l'antigène sur une surface de silice. Trois systèmes ont été étudiés: (i) des anticorps d'oeufs de poule (IgY) dirigés contre des immunoglobulines humaines (IgG), (ii) des anticorps de lapin (anti-IgG) dirigés contre des IgG, et (iii) des anticorps de lapin (anti-Fib) dirigés contre du fibrinogène humain (Fib), les anticorps étant polyclonaux dans tous les cas. Deux approches complémentaires ont été employées: la réflectométrie à balayage angulaire et une méthode utilisant l'iode 125 comme traceur radioactif des protéines.

Par la technique du radiomarquage, nous avons principalement concentré notre attention sur l'étude du comportement du système Fib/anti-Fib. Nous avons ainsi déterminé les rapports molaires de réactivité pour trois différentes solutions d'anti-Fib. Ces résultats ont mis en évidence un problème lié au radiomarquage lui-même, effet que nous avons confirmé par des tests d'immunoprécipitation en milieu liquide. Nous avons également déterminé les isothermes d'adsorption du Fib et des IgG sur la surface de silice nue, dans les mêmes conditions hydrodynamiques sous lesquelles nous avons testé la réaction immunologique.

Réactivité après échange des antigènes sur une couche protéique préadsorbée (Chapitre V).

Dans un deuxième volet, la réaction antigène/anticorps a été étudiée après échange des molécules d'antigène sur une couche protéique préadsorbée, à saturation (dans le plateau de l'isotherme) ou non. Une quantification des phénomènes qui n'interviennent pas directement dans le signal induit par la réaction immunologique a dû être effectuée. Ainsi, et ceci est le cas lorsque l'antigène est adsorbé sur la surface nue, il peut y avoir adsorption des anticorps soit directement sur la surface, soit par échange. De plus, une réaction croisée avec les molécules de la première couche peut se produire. Nous avons principalement étudié la réaction Fib/anti-Fib après échange du Fib sur des IgG, par radiomarquage et par réflectométrie. En relation avec le travail d'E. Lutanie (LUTA92), nous présentons également un résultat concernant la réaction IgG/anti-IgG après échange des IgG avec de l'albumine.

Etude cinétique de l'échange hétérogène (Chapitre VI).

La dernière partie de ce travail de thèse aborde certains aspects des processus interfaciaux sous l'angle cinétique. Le système expérimental consiste en un tube de silice permettant de suivre *in situ* les variations de concentration protéique interfaciale en fonction du temps. Ce montage autorise ainsi, à l'aide de la technique de marquage à l'iode 125, une étude dynamique des phénomènes d'adsorption, de désorption ou d'échange. Notre travail a consisté en une approche du mécanisme de l'échange hétérogène IgG/Fib. Des expériences réalisées à la fois sur des temps courts (quelques heures) et des temps longs (plusieurs jours) nous ont permis de comparer les phénomènes de désorption (couche d'IgG en présence de solvant pur) et d'échange (au contact d'une solution de Fib), ainsi que de déterminer l'ordre de la réaction d'échange, par rapport aux molécules adsorbées et en solution.

Chapitre I

Caractéristiques physicochimiques,

structure et fonction

du fibrinogène et des immunoglobulines G

INTRODUCTION

Les molécules dont les propriétés d'adsorption et de réactivité ont été étudiées au cours de ce travail sont le fibrinogène humain et des immunoglobulines G humaines et de lapin. Le but de ce chapitre est de recenser les données physicochimiques, de structure et les fonctions principales de ces molécules, nécessaires à l'entreprise d'une telle étude et à la compréhension des phénomènes mis en jeu.

Cette revue ne se veut pas exhaustive, mais utile au biophysicien car ces données sont très souvent éparpillées dans la littérature.

Dans un premier temps, la solubilité de ces protéines est analysée, ainsi que la présence de sucres liés de façon covalente.

La structure du fibrinogène et des immunoglobulines G (IgG), ainsi que les principales différences entre IgG humaines et IgG de lapin, ont été abordées de façon approfondie, afin de pouvoir relier les données macroscopiques aux propriétés structurales.

Les principaux paramètres physicochimiques sont présentés dans un tableau, et leur signification a été sommairement résumée.

Enfin, nous avons détaillé la nature de la liaison antigène/anticorps, les forces entrant en jeu dans cette interaction, ainsi que certaines notions importantes à connaître, telles que l'affinité, l'avidité ou la réaction croisée.

L'immunoglobuline G (IgG) est une protéine globulaire, ou sphéroprotéine, tandis que le fibrinogène est une protéine se situant entre les types fibreux, ou scléroprotéines, et globulaires.

I. ASPECTS GENERAUX.

I. 1. Solubilité des protéines.

Certaines protéines sont solubles dans l'eau pure (albumines). D'autres comme les globulines ne se dissolvent qu'en présence de sels neutres ou encore lorsque le milieu est légèrement acide ou faiblement alcalin (exemple: NaCl 5%). Enfin les scléroprotéines sont insolubles même dans ces diverses conditions (WEIL90). Le fibrinogène possède une forme allongée, mais comme les protéines globulaires, est soluble dans les solutions aqueuses de sels. La méthode de dissolution des IgG et du fibrinogène est décrite dans le chapitre III: « Matériels et méthodes ».

Les électrolytes (sels neutres) interviennent en fonction de leur concentration et de la charge des ions, c'est-à-dire de la force ionique. A faible force ionique, on observe un effet dissolvant tandis qu'à force ionique élevée au contraire il y a relargage, c'est-à-dire précipitation des molécules protéiques (WEIL90). Des indications précises concernant la force ionique du milieu dans lequel nous avons travaillé sont données dans le § « Force ionique: PBS, Fibrinogène, IgG » du chapitre III.

La solubilité d'une protéine est minimale au voisinage de son pH isoélectrique. Cet aspect est corrélé avec le fait que l'adsorption, pour un système protéine/matériau donné, est optimale à ce point isoélectrique (p.i.e.). Cette propriété peut s'expliquer par l'influence de l'ensemble des interactions électrostatiques: en effet, la charge nette d'une protéine contribue fortement à sa stabilité conformationnelle, et celle-ci est maximale au p.i.e., où les charges négatives et positives se compensent. Des études sur les quantités adsorbées au plateau des isothermes en fonction du pH révèlent que les propriétés de la protéine jouent un rôle plus déterminant que celles du substrat, car quelles que soient la charge ou la nature de l'adsorbant, les courbes passent toujours par un maximum près du p.i.e. L'énergie libre d'adsorption contient donc des contributions de la protéine elle-même, en plus des termes d'interaction protéine-substrat (LYKL84).

I. 2. Présence de sucres.

Dans le sang, pratiquement toutes les protéines, sauf la sérumalbumine, sont des glycoprotéines. Il a été démontré que les groupements glycaniques (ou osidiques) jouent un rôle important dans les mécanismes suivants: (i) maintien de la structure de la protéine dans une conformation biologiquement active, par des liaisons glycanne-glycanne ou glycanne-protéine (liaisons hydrogène, ioniques, interactions hydrophobes), (ii) protection de la chaîne peptidique vis-à-vis de l'attaque par des enzymes protéolytiques, (iii) diminution du pouvoir antigénique des protéines par masquage des épitopes, (iv) intervention dans les phénomènes cellulaires de reconnaissance (adhérence). Ces sucres sont fixés par des liaisons N- ou O-glycosidiques par condensation entre la fonction réductrice du sucre et l'amide de l'asparagine ou l'hydroxyle d'une sérine ou thréonine (WEIL90). Une incidence possible de la présence de ces sucres pourrait être de favoriser l'adsorption de ces glycoprotéines sur une surface solide.

Pour les IgG (cf structure p. 17) comme pour le fibrinogène (p. 21), le contenu en sucres est de 2 à 3% de la masse totale moléculaire. Le tableau I détaille leur composition.

TABLEAU I

COMPOSITION EN SUCRES DU FIBRINOGENE ET DES IGG

	%		Moles / mole	
	Fibrinogène	IgG	Fibrinogène	IgG
Hexose (Galactose/mannose)	1.0 (≈1:2)	1.10 (≈1:2)	21	10
Acetylhexosamine	0.9	1.30	14	9
Acide sialique	0.6	0.30	7	1.6
Fucose	0	0.20	0	2
Total CHO	2.5	2.9		

IgG: HEIM64, Fibrinogène: DOOL80.

II. LES IMMUNOGLOBULINES G.

Les IgG sont les principales immunoglobulines produites lors de la réponse secondaire (≈ 80 % du total). Dans un sérum normal, il existe plus de 10^8 molécules différentes d'immunoglobulines. En fait, l'organisme peut synthétiser une IgG pour chaque déterminant antigénique (ou presque) existant dans la nature.

Les IgG diffusent plus rapidement que les autres immunoglobulines dans les espaces extravasculaires du corps où, en tant qu'espèce prédominante, elles constituent le principal arsenal de neutralisation des toxines bactériennes et de fixation des microorganismes, favorisant ainsi leur phagocytose (activation du complément) (ROIT90).

Il existe 4 sous-classes d'IgG: les IgG₁, IgG₂, IgG₃ et IgG₄ (cf Tableau II). Ces 4 sous-classes sont synthétisées à la même vitesse dans l'organisme, mais les IgG₃ ont une demi-vie beaucoup plus faible, car leur zone charnière (à l'angle des fragments Fab, cf légende de la Figure A, p.18) étant plus longue, elles sont plus sensibles à la protéolyse.

TABLEAU II

CARACTERISTIQUES DES SOUS-CLASSES DES IGG (ROIT90)

Sous-classe	Concentration dans le sérum (mg/ml)	Chaîne H	Coefficient de sédimentation moyen	Masse moléculaire (Kd)	Masse chaîne H (Kd)
IgG ₁	9	γ ₁	7S	146	51
IgG ₂	3	γ ₂	7S	146	51
IgG ₃	1	γ ₃	7S	170	60
IgG ₄	0.5	γ ₄	7S	146	51

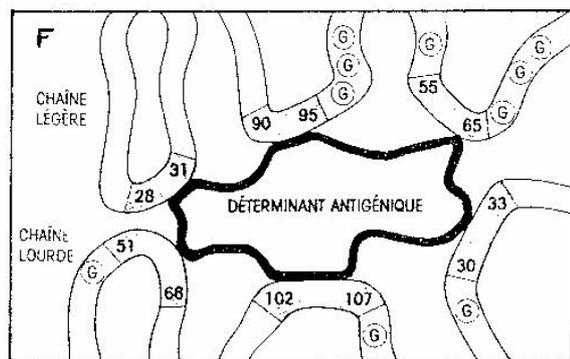
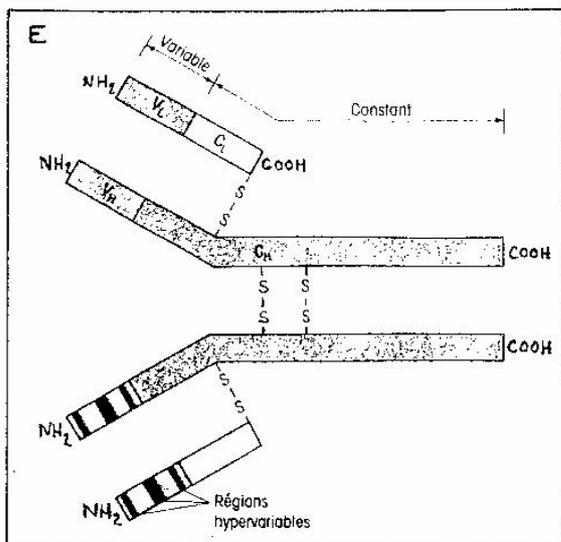
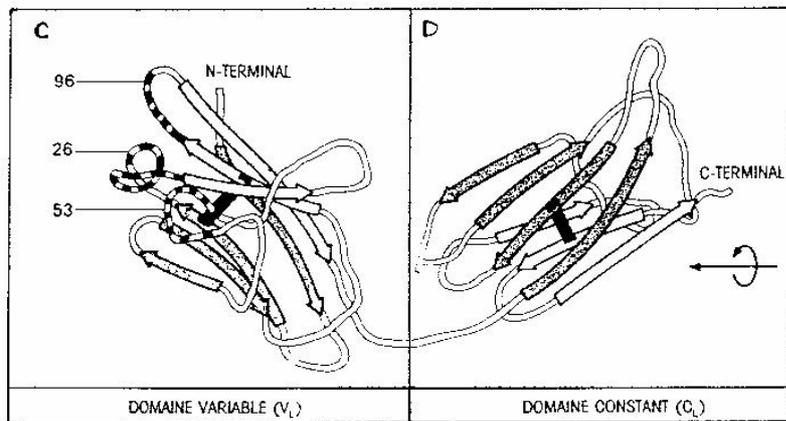
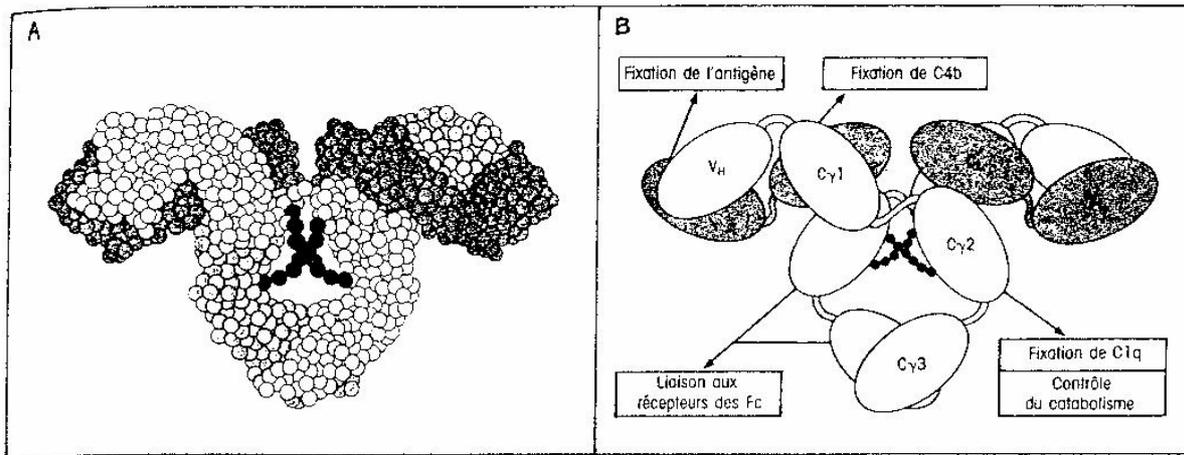
Les IgG sont constituées d'une seule unité térapeptidique, association de 2 chaînes lourdes identiques (de type γ) et de 2 chaînes légères identiques (de type κ ou λ). Leur formule moléculaire est soit γ₂κ₂ ou γ₂λ₂. Les chaînes sont liées entre elles par des ponts disulfure

intercaténaire (cf Figure E p.18). La valence des IgG est 2 (2 sites de fixation d'un antigène), et pour une molécule d'IgG donnée, chaque bras est identique et peut reconnaître le même épitope antigénique (même spécificité de reconnaissance).

La zone des régions hypervariables de l'anticorps qui établit des contacts avec l'antigène s'appelle le paratope, et la zone de l'antigène qui est en contact avec le paratope est nommée épitope (ou déterminant antigénique).

Les régions N-terminales des chaînes lourdes et légères (cf Figures C, E et F p.18) ont une structure primaire variable alors que le reste de ces chaînes est relativement constant. Chaque chaîne se replie en domaines globulaires (cf Figure B p.18). La région variable fixe l'antigène: les 3 boucles hypervariables présentes sur les chaînes lourdes ainsi que les 3 autres présentes sur les chaînes légères forment le site de liaison de l'antigène (cf Figure F p.18).

Les domaines de la région constante de la chaîne lourde (région Fc notamment) sont responsables des fonctions biologiques telles que fixation du complément et adhésion aux macrophages via les récepteurs Fc (Rfc).



Figures A et B: Dispositions, interactions et propriétés biologiques des différents domaines d'une IgG. **A:** Modèle d'IgG construit par ordinateur. L'une des chaînes lourdes est en blanc, l'autre en gris clair et les deux chaînes légères sont en gris foncé. Les sucres liés aux domaines C γ 2 sont en noir, au centre. La structure de cette IgG a été déterminée par Silverton *et al* (SILV77) et la modélisation a été réalisée grâce au système de R.J. Feldmann au NIH (USA). **B:** Schéma, fondé sur le modèle précédent, montrant la localisation des fonctions biologiques ainsi que les interactions hydrophobes entre les différents domaines opposés (d'après A. Feinstein). Le cadre général de ces interactions est très conservé (génétiquement parlant), ce qui est essentiel si les domaines V_H et V_L doivent s'associer pour former la grande variété de spécificités anticorps. Les deux régions hydrophobes des domaines CH₂ (C γ 2) qui fixent le complément, sont partiellement masquées par des sucres et restent donc indépendantes. Il s'ensuit la formation d'une région charnière extrêmement flexible, permettant à la fois une grande variation de l'angle des fragments Fab et leur rotation autour de cette région charnière. Ainsi, le site de fixation d'une IgG peut s'adapter immédiatement à des variations spatiales dans la présentation de l'épitope. Les domaines combinés C γ 2 et C γ 3 se lient aux récepteurs des Fc des cellules phagocytaires, des cellules NK et du trophoblaste syncytial placentaire (ce qui permet le passage des IgG de la mère au fœtus), ainsi qu'à la protéine A de staphylocoque (purification des IgG par chromatographie d'affinité).

Figure CD: Schéma de base des repliements des domaines variables (**C**) et constants (**D**) d'une chaîne légère (d'après l'étude cristallographique d'une protéine de Bence-Jones (SCHI73)). Pour chaque domaine, la chaîne polypeptidique s'organise en deux plans: l'un comprend 4 segments organisés en feuillet β antiparallèle (flèches gris foncé) et l'autre 3 (flèches blanches). La barre noire représente un pont disulfure intracaténaire. Cette structure est caractéristique de tous les domaines immunoglobuline. La localisation des boucles hypervariables est indiquée par une ligne pointillée. Ces boucles sont très proches les unes des autres, et constituent la contribution de la chaîne légère au site de fixation de l'antigène (cf **fig. F**). Un résidu numéroté est représenté pour chaque région hypervariable. Pour avoir un fragment Fab (« antigen binding »), il faut imaginer un segment V_H-C_H identique au V_L-C_L du diagramme, lui faire effectuer une rotation de 180° autour de l'axe de la flèche (à droite de la **fig. D**), et le poser au-dessus du fragment V_L-C_L (A. Feinstein).

Figure E: Variabilité de la séquence d'acides aminés dans une molécule d'anticorps. Domaines variables: en noir, hypervariable; en gris, variable. Domaines constants: en blanc, relativement constant; en gris, constant. Les lettres V et C sont utilisées pour désigner respectivement les régions variables et constantes, V_L et C_L sont les noms génériques utilisés pour les chaînes légères (« Light ») et V_H et C_H pour les chaînes lourdes (« Heavy »). Les deux chaînes lourdes sont identiques, ainsi que les deux chaînes légères. On voit qu'il y a 4 ponts disulfures intercaténaire dans la molécule.

Figure F: Représentation bidimensionnelle d'un site de fixation de l'antigène. Ce site est formé ici par simple opposition des boucles contenant les régions hypervariables (en gris clair) des chaînes lourdes et légères. Les chiffres se réfèrent à la numérotation des acides aminés. Les résidus glycine (G) sont invariablement présents aux positions indiquées quelle que soit l'immunoglobuline considérée. Elles permettent à la chaîne peptidique de se replier et de former ensuite les feuillet β . Wu et Kabat ont suggéré que la flexibilité de l'angle de liaison de cet aminoacide contribue à la formation du site de liaison. Dans le cadre de cette hypothèse, la plus grande proportion de glycines invariantes dans la chaîne légère pourrait signifier que la fixation grossière de l'antigène est assurée par la chaîne lourde et la « modulation » par la chaîne légère (ROIT90). Avec l'aimable autorisation des Editions Pradel, Paris.

Différences entre les IgG humaines et les IgG de lapin :

Le Tableau III nous permet de comparer la séquence en acides aminés des IgG de lapin à celle des IgG humaines (cf Tableau V p. 23).

TABLEAU III
COMPOSITION EN ACIDES AMINÉS DES IGG DE LAPIN
(g de résidu aminoacide pour 100 g de protéine)

Acide aminé	% en masse	Acide aminé	% en masse
Lysine	5.76	Alanine	3.71
Histidine	1.73	Valine	8.36
Arginine	4.42	Méthionine	1.13
Acide aspartique	8.08	Isoleucine	3.49
Threonine	10.37	Leucine	6.73
Serine	8.32	Tyrosine	6.17
Acide glutamique	11.05	Phénylalanine	4.15
Proline	6.79	Cystine	2.63
Glycine	3.98	Tryptophane	2.90

D'après Crumpton et Wilkinson (CRUM63).

On voit que les différences sont variables selon les résidus et peuvent atteindre 30 ou 40 %. Il y a également d'énormes différences concernant les acides aminés N-terminaux entre IgG humaines et de lapin:

TABLEAU IV
ACIDES AMINÉS N-TERMINAUX DES IGG (mole/mole)

Aminoacide	Ala	Asp	Glu	Leu	Ser	Val	Thr	Total
lapin	1.0	0.3	-	-	0.1	-	-	1.4
homme	-	1.0	1.2	-	0.1	-	-	2.3

D'après Press et Porter (PRES66).

La diversité de ces acides aminés N-terminaux, certains présents en quantité fractionnelle, montre la complexité chimique de chaque préparation d'IgG.

Les sucres sont présents dans des proportions sensiblement identiques pour les deux espèces (PRES66).

Les expériences d'adsorption sur une surface de silice que nous avons réalisées n'indiquent pas de différence notable dans les quantités adsorbées d'IgG humaines ou de lapin (concentrations et conditions expérimentales identiques).

III. LE FIBRINOGENE.

La coagulation représente le passage de l'état liquide à l'état de gel, lié à la constitution d'un caillot. Ce changement d'état physique est dû à la transformation sous l'action de la thrombine du fibrinogène (facteur I), soluble dans le sang, en fibrine insoluble. Celle-ci, organisée en réseau, constitue l'armature du caillot.

Le fibrinogène est une glycoprotéine plasmatique synthétisée dans le foie. Il peut interagir avec d'autres protéines et s'adsorbe tant sur les parois naturelles des vaisseaux sanguins que sur les surfaces artificielles (ROWL66, BRAS79). Il joue également un rôle important dans l'adhésion des plaquettes sanguines (PACK69).

La structure du fibrinogène a fait l'objet de nombreuses controverses. Par exemple, les paramètres calculés en considérant l'ellipsoïde hydrodynamique équivalent ont conduit à la longueur surestimée de 50-60 nm. Les résultats les plus récents de microscopie électronique présentent le fibrinogène comme un bâtonnet de 9 nm de large et 45 nm de long (FOWL79, TELF80, ESTI80). Les concentrations interfaciales de molécules couchées (« side-on ») ou debout (« end-on ») peuvent aisément être calculées à partir des surfaces projetées données dans le Tableau V (p. 23).

Toujours par microscopie électronique, et en tenant compte de certaines données physicochimiques, Hall et Slayter (HALL59) ont montré que le fibrinogène a une structure trinodulaire (Figure G):

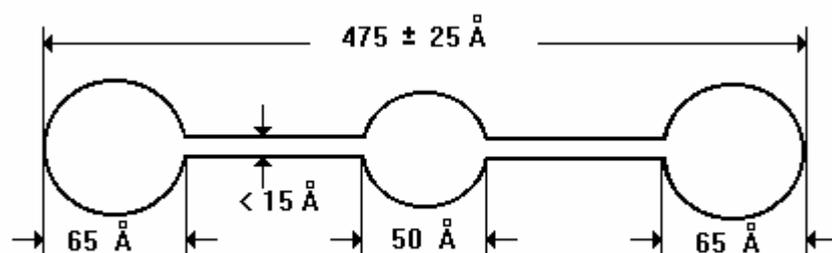


Figure G: Modèle de la molécule de fibrinogène selon Hall et Slayter.

Ce modèle a été confirmé en 1974 par des résultats de calorimétrie différentielle (DONO74): une dénaturation indépendante se produit à 60°C pour les nodules terminaux et à 100°C pour le nodule central.

Doolittle a publié la structure et les dimensions précises du fibrinogène à lesquelles nous nous référons dans ce travail (DOOL81). La figure H (p.21) en est une représentation schématique.

Le fibrinogène est un dimère constitué de deux ensembles identiques de 3 chaînes α , β et γ , enroulées sur elles-mêmes en une super-hélice. La chaîne α comprend 610 acides aminés, la chaîne β 461 et la chaîne γ 411. Ces chaînes sont liées entre elles par 29 ponts disulfure, dont 3 relient les deux monomères identiques de la molécule. Les 26 autres sont organisés en « anneaux disulfure », chaque anneau étant composé de 3 ponts disulfure. Ces anneaux délimitent les parties hélicoïdales de la molécule.

Il y a donc 3 types de domaines: nodules (à l'apparence de pelotes statistiques pour les deux nodules terminaux), triple hélices et chaînes libres, à savoir l'extrémité des chaînes α , hydrophiles, qui « flottent » dans l'environnement aqueux.

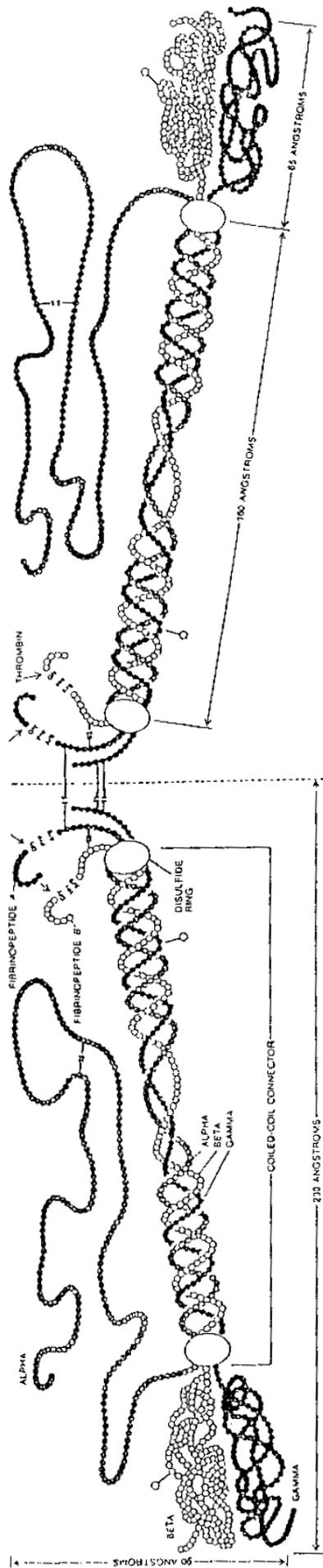


FIGURE H : STRUCTURE DE LA MOLÉCULE DE FIBRINOGENE .

Les composants CHO (carbohydrates) comprennent de l'acide sialique lié à l'asparagine, des sucres neutres et de l'hexoseamine.

IV. DONNEES PHYSICOCHIMIQUES SUR LES MOLECULES DE FIBRINOGENE ET D'IMMUNOGLOBULINE G HUMAINES.

Le tableau V présente des données physicochimiques essentielles du fibrinogène et des immunoglobulines G. Il est suivi des références qui lui sont propres et de quelques remarques et définitions qui permettront d'éclaircir sa compréhension.

Remarque: concernant le fibrinogène, des informations supplémentaires peuvent être tirées de deux thèses (SUSC66 et CAPE68).

TABLEAU V
DONNEES PHYSICOCHIMIQUES SUR LE FIBRINOGENE ET LES IGG

Quantité dans le [] normal (mg%(w/w))	Fibrinogène humain [plasma] 200-600 (moyenne: 290) (1a)	γ-Ig G humaine [serum] 900-1500 (2a)																																																																																																																																				
Paramètres physiques:																																																																																																																																						
$s_{20,w} \cdot 10^{-13}$ cm/sec . dyne	7.7-7.9, 7.63 (1k, 1b)	6.6, 7.2 (2b, 2c)																																																																																																																																				
$D_{20,w} \cdot 10^{-7}$ cm ² /sec	1.97, 2.0 (1b, 1k)	4.0 (2d)																																																																																																																																				
$\theta_{20,w}$ sec ⁻¹	40000 (1k)																																																																																																																																					
v_{p20}	0.71-0.72, 0.723 (1k, 1c)	0.739 (2b)																																																																																																																																				
Masse moléculaire (Kd)	330-340, 341 (1k, 1b)	150-161 (2b, 2d, 2e, 2l)																																																																																																																																				
f/f_0	2.34 (1d)	1.38 (2b)																																																																																																																																				
η	0.23, 0.25 (1d, 1k)	0.060 (2b, 2f)																																																																																																																																				
Mobilité électrophorétique (cm ² V ⁻¹ s ⁻¹)	2.1 (1e)	1.2 (2g)																																																																																																																																				
pI	5.8 (1f)	5.8, 7.3 (2e)																																																																																																																																				
$E_{280\text{ nm}}$	13.6 (1g) , 15.5 (1i)	13.6 (2i) , 13.8 (1g)																																																																																																																																				
dn/dc, ml/g	0.18, 0.197 (1m, 1k)	≈ 0.18 (1m)																																																																																																																																				
n principaux (n ₁ , n ₂ , n ₃)	1.64, 1.69, 1.69 (1k)																																																																																																																																					
Dimensions, nm ³	45x9x6 (1l)	23.5x4.4x4.4 (2k)																																																																																																																																				
Surface projetée (side-on, end-on), nm ²	337, 56	81, 15																																																																																																																																				
Analyse chimique:																																																																																																																																						
Composition en acides aminés:	<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left;">Résidu: (*)</th> <th style="text-align: center;">%</th> <th style="text-align: center;">Moles/mole de protéine</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>Lys</td><td style="text-align: center;">8.06</td><td style="text-align: center;">214</td></tr> <tr><td>His</td><td style="text-align: center;">2.30</td><td style="text-align: center;">57</td></tr> <tr><td>AmideNH₃</td><td style="text-align: center;">1.41</td><td style="text-align: center;">30</td></tr> <tr><td>Arg</td><td style="text-align: center;">7.00</td><td style="text-align: center;">153</td></tr> <tr><td>Asp</td><td style="text-align: center;">11.30</td><td style="text-align: center;">336</td></tr> <tr><td>Thr</td><td style="text-align: center;">5.18</td><td style="text-align: center;">175</td></tr> <tr><td>Ser</td><td style="text-align: center;">5.80</td><td style="text-align: center;">230</td></tr> <tr><td>Glu</td><td style="text-align: center;">12.70</td><td style="text-align: center;">336</td></tr> <tr><td>Pro</td><td style="text-align: center;">4.80</td><td style="text-align: center;">169</td></tr> <tr><td>Gly</td><td style="text-align: center;">4.33</td><td style="text-align: center;">236</td></tr> <tr><td>Ala</td><td style="text-align: center;">2.96</td><td style="text-align: center;">142</td></tr> <tr><td>½ Cystine</td><td style="text-align: center;">2.30</td><td style="text-align: center;">77</td></tr> <tr><td>Val</td><td style="text-align: center;">3.47</td><td style="text-align: center;">119</td></tr> <tr><td>Met</td><td style="text-align: center;">2.28</td><td style="text-align: center;">59</td></tr> <tr><td>Iso</td><td style="text-align: center;">4.15</td><td style="text-align: center;">125</td></tr> <tr><td>Leu</td><td style="text-align: center;">6.13</td><td style="text-align: center;">184</td></tr> <tr><td>Tyr</td><td style="text-align: center;">4.95</td><td style="text-align: center;">104</td></tr> <tr><td>Phe</td><td style="text-align: center;">2.94</td><td style="text-align: center;">95</td></tr> <tr><td>Try</td><td style="text-align: center;">3.00</td><td style="text-align: center;">55</td></tr> <tr><td>total peptide</td><td style="text-align: center;">95.06</td><td style="text-align: center;">2896</td></tr> <tr><td>azote %</td><td style="text-align: center;">16.7</td><td></td></tr> </tbody> </table>	Résidu: (*)	%	Moles/mole de protéine	Lys	8.06	214	His	2.30	57	AmideNH ₃	1.41	30	Arg	7.00	153	Asp	11.30	336	Thr	5.18	175	Ser	5.80	230	Glu	12.70	336	Pro	4.80	169	Gly	4.33	236	Ala	2.96	142	½ Cystine	2.30	77	Val	3.47	119	Met	2.28	59	Iso	4.15	125	Leu	6.13	184	Tyr	4.95	104	Phe	2.94	95	Try	3.00	55	total peptide	95.06	2896	azote %	16.7		<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left;">(**)</th> <th style="text-align: center;">%</th> <th style="text-align: center;">Moles/mole de protéine</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td></td><td style="text-align: center;">6.96</td><td style="text-align: center;">87</td></tr> <tr><td></td><td style="text-align: center;">2.28</td><td style="text-align: center;">27</td></tr> <tr><td></td><td style="text-align: center;">1.46</td><td style="text-align: center;">146</td></tr> <tr><td></td><td style="text-align: center;">4.02</td><td style="text-align: center;">41</td></tr> <tr><td></td><td style="text-align: center;">7.69</td><td style="text-align: center;">107</td></tr> <tr><td></td><td style="text-align: center;">7.18</td><td style="text-align: center;">114</td></tr> <tr><td></td><td style="text-align: center;">9.69</td><td style="text-align: center;">178</td></tr> <tr><td></td><td style="text-align: center;">11.26</td><td style="text-align: center;">140</td></tr> <tr><td></td><td style="text-align: center;">6.05</td><td style="text-align: center;">100</td></tr> <tr><td></td><td style="text-align: center;">3.35</td><td style="text-align: center;">94</td></tr> <tr><td></td><td style="text-align: center;">3.18</td><td style="text-align: center;">72</td></tr> <tr><td></td><td style="text-align: center;">2.20</td><td style="text-align: center;">34</td></tr> <tr><td></td><td style="text-align: center;">8.10</td><td style="text-align: center;">131</td></tr> <tr><td></td><td style="text-align: center;">0.85</td><td style="text-align: center;">10</td></tr> <tr><td></td><td style="text-align: center;">2.14</td><td style="text-align: center;">30</td></tr> <tr><td></td><td style="text-align: center;">7.21</td><td style="text-align: center;">102</td></tr> <tr><td></td><td style="text-align: center;">5.97</td><td style="text-align: center;">62</td></tr> <tr><td></td><td style="text-align: center;">4.29</td><td style="text-align: center;">47</td></tr> <tr><td></td><td style="text-align: center;">3.83</td><td style="text-align: center;">33</td></tr> <tr><td></td><td style="text-align: center;">97.71</td><td style="text-align: center;">1555</td></tr> <tr><td></td><td style="text-align: center;">16.0</td><td></td></tr> </tbody> </table>	(**)	%	Moles/mole de protéine		6.96	87		2.28	27		1.46	146		4.02	41		7.69	107		7.18	114		9.69	178		11.26	140		6.05	100		3.35	94		3.18	72		2.20	34		8.10	131		0.85	10		2.14	30		7.21	102		5.97	62		4.29	47		3.83	33		97.71	1555		16.0	
Résidu: (*)	%	Moles/mole de protéine																																																																																																																																				
Lys	8.06	214																																																																																																																																				
His	2.30	57																																																																																																																																				
AmideNH ₃	1.41	30																																																																																																																																				
Arg	7.00	153																																																																																																																																				
Asp	11.30	336																																																																																																																																				
Thr	5.18	175																																																																																																																																				
Ser	5.80	230																																																																																																																																				
Glu	12.70	336																																																																																																																																				
Pro	4.80	169																																																																																																																																				
Gly	4.33	236																																																																																																																																				
Ala	2.96	142																																																																																																																																				
½ Cystine	2.30	77																																																																																																																																				
Val	3.47	119																																																																																																																																				
Met	2.28	59																																																																																																																																				
Iso	4.15	125																																																																																																																																				
Leu	6.13	184																																																																																																																																				
Tyr	4.95	104																																																																																																																																				
Phe	2.94	95																																																																																																																																				
Try	3.00	55																																																																																																																																				
total peptide	95.06	2896																																																																																																																																				
azote %	16.7																																																																																																																																					
(**)	%	Moles/mole de protéine																																																																																																																																				
	6.96	87																																																																																																																																				
	2.28	27																																																																																																																																				
	1.46	146																																																																																																																																				
	4.02	41																																																																																																																																				
	7.69	107																																																																																																																																				
	7.18	114																																																																																																																																				
	9.69	178																																																																																																																																				
	11.26	140																																																																																																																																				
	6.05	100																																																																																																																																				
	3.35	94																																																																																																																																				
	3.18	72																																																																																																																																				
	2.20	34																																																																																																																																				
	8.10	131																																																																																																																																				
	0.85	10																																																																																																																																				
	2.14	30																																																																																																																																				
	7.21	102																																																																																																																																				
	5.97	62																																																																																																																																				
	4.29	47																																																																																																																																				
	3.83	33																																																																																																																																				
	97.71	1555																																																																																																																																				
	16.0																																																																																																																																					

Calculé d'après les données de (*) Brand *et al* (1h) et (**) Heimburger *et al* (2h).

Pour les IgG humaines, des données comparables sont obtenues sur la séquence par Crumpton et Wilkinson (2j).

$s_{20,w} \cdot 10^{-13}$ =coefficient de sédimentation, en unités Svedberg, rapporté à l'eau à 20°C, c'est-à-dire extrapolé à concentration zéro (pas d'interactions entre les protéines); $D_{20,w} \cdot 10^{-7}$ (=unités de Fick) =coefficient de diffusion translationnel, rapporté à l'eau à 20°C; $\theta_{20,w}$ =coefficient de diffusion rotationnel (20°C); v_{p20} =volume spécifique partiel de la protéine (ml/g, 20°C); f/f_0 =rapport de friction; η =viscosité intrinsèque (100 ml/g); pI =point isoélectrique; $E_{280\text{ nm}}$ =coefficient d'extinction molaire à 280 nm; dn/dc =gradient de l'indice de réfraction, à 436nm; n =indices de réfraction, à 544nm.

Références (tableau V):

1a: SCHO62, **1b:** CASP54, **1c:** McME52, **1d:** SHUL53, **1e:** SCHU59, **1f:** SHEP54, **1g:** SCHÖ55, **1h:** BRAN44, **1i:** DOOL80, **1j:** SCHU58, **1k:** SCHE57, **1l:** DOOL81, **1m:** DeFE78.

2a: SCHU60, **2b:** ONCL47, **2c:** PUTN52, **2d:** COHNe50, **2e:** PHEL60, **2f:** SCHU55, **2g:** COHNm50, **2h:** HEIM64, **2i:** JOHN82, **2j:** CRUM63, **2k:** QUAS89, **2l:** VERP92.

a) Dans l'analyse chimique, les résidus « AmideNH₃ » sont les asparagines (Asn) et les glutamines (Gln), possédant un groupement « guanidinium ».

b) E₂₈₀: il s'agit du E 1%, c'est-à-dire l'absorbance (à 280 nm) d'une solution à 10 mg/ml.

c) Comme il apparaît dans le tableau V, certaines données de la littérature peuvent légèrement varier d'un auteur à l'autre. Les E₂₈₀ de 15.5 (*Ii*) pour le fibrinogène, et de 13.8 (*Ig*) pour les IgG humaines, sont les valeurs qui ont été choisies pour le calcul des concentrations tout au long de ce travail. Ces déterminations sont en fait très dépendantes du degré de purification de la préparation protéique (variable d'une méthode de purification à l'autre), ainsi que de la nature des différents anticorps et de leurs proportions respectives dans le cas d'une solution d'anticorps polyclonaux (ce qui est lié à la réaction immunitaire elle-même). Ainsi, des valeurs précises devraient être déterminées lors de chaque purification.

d) La mobilité électrophorétique a été déterminée à pH 8.6, dans le barbital, à force ionique I=0.1. On voit que les IgG migrent plus lentement que le fibrinogène dans un champ électrique, ce qui peut être dû à un rapport charge par unité de masse plus faible ou à un effet hydrodynamique lié à la forme des molécules.

Nous pouvons rappeler que la mobilité μ est déterminée par électrophorèse libre ou de frontière. μ (généralement en cm²V⁻¹s⁻¹) est donnée par le rapport de la vitesse de migration de la macromolécule ou d'un ion (v) à la force du champ électrique (E), avec une correction en milieu ionique: $\mu = \mu_0 / (1 + Ar\sqrt{I})$, où μ_0 est la mobilité dans l'eau pure: $\mu_0 = v/E$, A une constante dépendant du solvant et de la température ($A = 0.35 \cdot 10^8$ dans l'eau à 5°C), r le rayon de l'ion solvaté et I la force ionique.

e) Par centrifugation d'une solution protéique, quand la frontière de sédimentation des protéines migre à une vitesse constante, la force centrifuge permet de contre-balancer exactement les résistances de friction du solvant. Le coefficient de sédimentation ($s_{20,w} \cdot 10^{-13}$) est donné par l'équation: $s = (dx/dt) / (\omega^2 x)$, où x est la distance à l'axe de rotation, ω la vitesse angulaire en radians par seconde et t le temps en secondes. Les protéines ont des coefficients de sédimentation situés dans un intervalle compris entre 1 et 200S (unités Svedberg). Les paramètres qui affectent s sont le poids moléculaire, le coefficient de friction (qui renseigne sur la forme de la molécule), le volume spécifique de la protéine et la concentration de soluté. Dans un but de comparaison, la valeur de s est corrigée en la ramenant à celle que l'on déterminerait dans l'eau à 20°C.

f) Le volume spécifique partiel (vp_{20}) correspond à l'augmentation de volume produite quand 1g de soluté sec est ajouté à un volume infiniment grand de solvant; pour la plupart des protéines dans l'eau, il est d'environ 0.74 cm³g⁻¹. On voit que les IgG « gonflent » un peu plus que le fibrinogène.

g) f/f_0 est le rapport entre le coefficient de friction $f = 6\pi\eta a$, η étant la viscosité et a le rayon de la particule hydratée considérée comme étant sphérique, et $f_0 = 6\pi\eta c$, où $c = (xy^2)^{1/3}$ ou $(x^2y)^{1/3}$ selon le type d'ellipsoïde, x étant le demi grand-axe et y le demi petit-axe de la molécule à dimensions ellipsoïdales. Ce rapport permet d'apprécier la plus ou moins grande

sphéricité de la molécule. Les valeurs montrent que le fibrinogène a une forme beaucoup plus allongée que les IgG.

h) La viscosité intrinsèque η a la dimension de l'inverse d'une concentration et correspond à la limite lorsque la concentration c des molécules tend vers zéro, de l'expression $[(\eta_s/\eta^*)-1]/c$, où η_s est la viscosité du soluté et η^* celle du solvant pur.

i) La surface projetée a été calculée en approximant la forme de l'IgG à un ellipsoïde (side-on: $S=\pi ab$, end-on: $S=\pi a^2$, a étant le demi-petit axe et b le demi-grand axe de l'ellipse) et celle du fibrinogène à un rectangle. Pour ce dernier, la largeur a été moyennée à 7.5 nm.

j) dn/dc est le gradient (incrément) d'indice de réfraction de la protéine dissoute dans sa solution tampon. De Feijter *et al.* (1m) ont montré que cet incrément reste constant aux hautes concentrations existant au sein des couches interfaciales de protéines adsorbées. De plus, cela ne varie que très peu avec le type de protéine. C'est pourquoi, pour le calcul des quantités adsorbées en réflectométrie, nous avons choisi aussi bien pour le fibrinogène que pour les IgG la valeur moyenne dn/dc de $0.18 \text{ cm}^3/\text{g}$ (à 25°C).

k) Le coefficient de diffusion rotationnel θ est défini par la relation $\theta = kTJ / (6\eta_0 V_e)$, avec k : constante de Boltzmann, T : température absolue, J : fonction du rapport demi-grand axe sur demi-petit axe de l'ellipsoïde hydrodynamique, η_0 : viscosité du solvant pur, V_e : volume de l'ellipsoïde hydrodynamique (SCHE61).

V. LA LIAISON ANTIGÈNE-ANTICORPS.

L'effet de variations de la structure chimique d'haptènes (petites molécules antigéniques chimiquement bien caractérisées) sur leur aptitude à être reconnus par un anticorps donné a pu être étudié. Il s'avère que la configuration globale de l'haptène semble encore plus importante que sa nature chimique, c'est-à-dire que c'est la forme du nuage électronique entourant l'haptène dans l'espace qui détermine sa reconnaissance. Cette idée est en accord avec la nature de l'interaction antigène-anticorps dont on sait qu'elle n'implique pas de liaison covalente et qui, comme la liaison enzyme-substrat, est réversible.

Cette complémentarité spatiale entre paratope et épitope qui permet la reconnaissance de l'antigène par l'anticorps, a été élégamment confirmée par analyse cristallographique aux rayons X de l'interaction entre le lysozyme et un fragment Fab d'un anticorps monoclonal anti-lysozyme, révélant des régions de contacts très étroites (AMIT86). Bien que certains des résidus impliqués soient suffisamment éloignés pour permettre la présence de molécules d'eau, celle-ci est le plus fréquemment exclue, ce qui a d'importantes conséquences sur la solidité de la liaison antigène-anticorps.

V. 1. Forces impliquées.

Les forces qui lient l'antigène à l'anticorps ne sont pas différentes des interactions dites non spécifiques entre deux protéines (ou macromolécules) quelconques, comme par exemple l'albumine et la transferrine humaines. Quatre types de liaisons intermoléculaires, de même nature que celles existant entre une protéine adsorbée et son substrat, jouent un rôle particulièrement important:

1) Les forces électrostatiques: elles sont dues à l'attraction existant entre les groupements ioniques de charge opposée présents sur les chaînes latérales de deux protéines, par exemple entre un groupement amine ionisé ($-\text{NH}_3^+$) d'une lysine et le groupement carboxyle ($-\text{COO}^-$) d'un acide glutamique. La force d'attraction (F) est inversement proportionnelle au carré de la distance (d) entre les deux charges: $F \propto 1/(\epsilon d^2)$, où ϵ est la constante diélectrique du milieu. La constante diélectrique de l'eau étant très élevée (≈ 80), F

augmente considérablement quand l'espace qui sépare les résidus chargés est suffisamment étroit pour exclure les molécules d'eau. Les contre-ions présents dans la solution peuvent écranter les charges de la protéine, la conséquence possible étant le maintien à distance de deux groupements de charge opposée, ou au contraire l'établissement d'une interaction entre deux groupements de même charge, via un contre-ion.

2) Les liaisons hydrogène: la formation de liaisons hydrogène réversibles entre de groupements hydrophiles tels que OH, NH₂ et COOH dépend de la proximité des molécules. Là encore, bien que les liaisons hydrogènes soient relativement faibles (elles sont de nature essentiellement électrostatique), l'exclusion des molécules d'eau entre les résidus accroît de façon importante l'énergie de liaison en réduisant fortement la constante diélectrique.

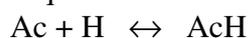
3) Les interactions hydrophobes: des groupements hydrophobes apolaires, tels ceux des chaînes latérales de la valine, de la leucine ou de la phénylalanine, ont tendance à s'associer dans un environnement aqueux, conduisant à une augmentation de l'entropie de l'eau à leur voisinage. On estime que plus de 50 % de la force globale de la liaison anticorps-anticorps provient d'interactions hydrophobes.

4) Les forces de Van de Waals: ces forces dépendent de l'interaction des nuages électroniques externes des deux molécules. Ce sont des interactions entre dipôles (permanents ou induits) et elles varient en $1/d^6$.

Ce dernier point illustre une propriété essentielle commune à ces quatre types de forces: elles n'atteignent des valeurs significatives que si les deux molécules sont en contact étroit, et ceci d'autant plus que les molécules d'eau se trouvent exclues de la région d'interaction. Les formes complémentaires des nuages électroniques du site de liaison de l'anticorps et du déterminant antigénique permettent l'association étroite des deux molécules, si bien que la distance intermoléculaire devient minimale et que les forces d'interaction non spécifiques peuvent prendre place et stabiliser le complexe. Par contre, quand les nuages électroniques des deux molécules se recouvrent, des forces de répulsion puissantes apparaissent, et il faut dépenser de l'énergie pour déplacer les résidus concernés de leur position d'équilibre.

V. 2. Affinité et avidité.

L'association entre un haptène H (ou un épitope) et l'anticorps correspondant est caractérisée par la constante d'équilibre K de la réaction:



qui, d'après la loi d'action de masse, s'écrit:

$$K = [AcH] / ([Ac] [H])$$

où [Ac] est la concentration de sites de liaison anticorps libres, [H] la concentration d'haptène (ou d'épitope) libre, et [AcH] celle du complexe. Si $[H]_{1/2}$ est la concentration d'haptène ou épitope libre pour laquelle la moitié de la totalité des sites de liaison de l'anticorps sont occupés, on a: $[AcH] = [Ac]$, et la constante d'affinité: $K = 1/[H]_{1/2}$.

La valeur de K dépend de la différence d'énergie libre (ΔG) entre la forme libre de l'antigène et de l'anticorps et de la forme liée, selon l'équation:

$$\Delta G = - RT \ln K$$

où R est la constante des gaz parfaits et T la température absolue. Une certaine énergie peut être requise pour déformer suffisamment l'antigène natif afin que ses résidus entrent en contact et établissent des liaisons fortes, ou parce qu'un résidu donné provoque une répulsion stérique s'il reste dans sa position première.

Grâce à une méthode de dialyse par exemple, on peut calculer K à l'aide de la loi d'action de masse, et pour une interaction à haute affinité de type haptène-anticorps, K peut atteindre la valeur de 10^{11} l/mol. Cette affinité varie énormément dans un immunosérum d'un

anticorps à l'autre (pour un même déterminant antigénique), et dépend de la précision de l'ajustement, des changements de conformation rendus nécessaires par le recouvrement des nuages électroniques, et de la localisation des groupements chargés et hydrophobes.

L'affinité rend compte de la liaison d'un anticorps à un haptène monovalent ou à un déterminant antigénique simple. Cependant, on a affaire le plus souvent à l'interaction d'un immunsérum (ou sérum d'un individu immunisé) et d'un antigène multivalent. On emploie alors le terme d'avidité pour décrire cette association:



Ag étant l'antigène. Les paramètres qui déterminent l'antigénicité sont complexes du fait de l'hétérogénéité à la fois des anticorps d'un sérum donné et des déterminants eux-mêmes. De plus, un facteur supplémentaire intervient: la multivalence de la plupart des antigènes est à l'origine d'un effet « bonus ». En effet, la liaison de 2 molécules d'antigène (ou deux sites épitopiques) par un anticorps est toujours plus forte que la somme arithmétique des liaisons individuelles mises en jeu, et plus n et m sont grands, plus l'interaction de chaque anticorps avec ses sites de reconnaissance propres est forte.

Chacune des liaisons d'anticorps notés 1 et 2 à leurs déterminants respectifs peut être traduite par le changement d'énergie libre observé lors de l'établissement de la liaison épitope-paratope, caractérisée par la constante d'affinité correspondante, soit:

$$\Delta G_1 = -RT \ln K_1 \text{ et } \Delta G_2 = -RT \ln K_2$$

Le changement d'énergie libre global, ce à quoi correspond la constante d'avidité (K_{av}) lors de la fixation conjointe des deux anticorps s'écrit:

$$\Delta G = \Delta G_1 + \Delta G_2 = -RT \ln K_1 - RT \ln K_2 = -RT \ln (K_1 \cdot K_2)$$

et puisque $\Delta G = -RT \ln K_{av}$,

$$K_{av} = K_1 \cdot K_2.$$

L'augmentation considérable de la valeur de la constante d'équilibre obtenue en multipliant les deux affinités mises en jeu est à l'origine de l'effet bonus. Plus il y a de valences retenant l'antigène, moins il y a de chances pour que la dissociation d'une liaison particulière entraîne la séparation de l'antigène et de l'anticorps (ROIT90).

V. 3. La réaction croisée.

Lors de la réponse immunitaire, des populations complexes de molécules d'anticorps sont formées avec des sites de reconnaissance variés. Certains anticorps ne sont pas totalement spécifiques de l'antigène immunisant, mais sont capables de se lier également à des antigènes possédant des régions de structure homologue ou voisine de celle des épitopes de la molécule immunogène: il y a alors réactivité croisée. Ainsi, chaque anticorps réagit non seulement avec l'antigène qui a provoqué sa production, mais aussi avec des molécules qui n'ont parfois que de faibles ressemblances structurales.

Parce qu'ils sont dirigés contre des épitopes précis, les anticorps monoclonaux sont en général très spécifiques, dans la mesure où ils ne présentent que de faibles réactions croisées avec d'autres antigènes. Ceci est moins vrai avec les anticorps polyclonaux que nous avons utilisés au cours de ce travail et, par exemple dans l'appréciation de la réaction de molécules d'anti-fibrinogène sur du fibrinogène après échange de ce dernier avec des IgG préadsorbées, nous avons vérifié (réflectométrie, test ELISA) la possibilité d'une réaction croisée entre l'anti-fibrinogène et les IgG. Ce problème sera discuté dans le chapitre V.

Chapitre II

Adsorption sur une surface de silice :

aspects structuraux et propriétés

INTRODUCTION

Malgré de nombreux travaux, la compréhension des mécanismes moléculaires de l'adsorption, de l'échange ou de la réaction de molécules protéiques sur une surface reste très imparfaite. Quelques lois générales ont pu être établies, mais celles-ci ne traduisent souvent que qualitativement les données expérimentales. Ce problème est notamment lié aux nombreux paramètres, souvent difficiles à contrôler, tels que la température, l'état des protéines (cf chapitre III) ou celui de la surface de contact, et aux variations intrinsèques dues aux techniques de mesure.

Dans ce chapitre, nous présentons les propriétés d'adsorption de protéines sur une surface, susceptibles d'apporter quelques éclaircissements sur certains aspects de notre étude.

Une discussion introductive sur l'influence du traceur radioactif sur les propriétés d'adsorption nous permet d'entrevoir la complexité du phénomène étudié.

Nous décrivons ensuite la structure du verre et les interactions à l'origine de la liaison protéine/surface. Le substrat « verre » ne présente pas un intérêt spécial du point de vue de la biologie: le choix de cette surface modèle est dicté par des considérations « instrumentales », mais aucune surface non biologique n'est à priori plus représentative qu'une autre.

Enfin, quelques remarques générales mettent en exergue certains aspects importants des phénomènes d'adsorption, de désorption et d'échange.

I. INFLUENCE DE L'IODE 125 SUR LES PROPRIETES D'ADSORPTION D'UNE PROTEINE.

Les protéines étudiées dans le cadre des expériences sur un tube de silice ont été marquées par couplage covalent avec l'isotope 125 de l'iode. La technique de marquage radioactif utilisée est décrite dans le chapitre III: « Matériels et méthodes ».

Cette méthode présente l'avantage de pouvoir suivre en temps réel et mesurer l'adsorption de faibles quantités de protéines, et ceci de façon assez précise, ainsi que de pouvoir marquer sélectivement l'une ou l'autre protéine dans un mélange. Cependant, certaines indications semblent montrer que les caractéristiques d'adsorption (GRAN77, VdSC78) et l'agrégation protéique ou la structure (HURW79, WALT79) peuvent être altérées par marquage à l'iode.

Une expérience réalisée par Grant *et al.* démontre qu'une protéine, en l'occurrence de l'albumine humaine (HSA), marquée à l'iode 125, ne montre pas d'adsorption préférentielle sur de la silice, qui serait due à la présence de l'iode incorporé dans la molécule et son interaction avec le support. Ceci n'est pas le cas sur une surface de platine par exemple, la différence de quantités adsorbées étant là très marquée (GRAN77).

Cette constatation doit cependant être modulée par l'hypothèse qu'une protéine donnée pourrait présenter à la surface un domaine qui aurait plus d'affinité pour elle qu'un autre (un domaine polaire vis-à-vis d'une surface hydrophile par exemple, favorisant l'établissement de liaisons hydrogène, ou apolaire vis-à-vis d'une surface hydrophobe, favorisant les interactions hydrophobes). Ainsi, un atome d'iode fixé sur un domaine non affine pour la surface aurait moins d'influence sur les propriétés d'adsorption de la protéine en question. Le problème est cependant plus complexe, car une protéine peut s'adsorber par le biais de différents domaines, de façon plus ou moins lâche pour chacun d'eux, induisant ainsi un état d'adsorption de degré de réversibilité variable. Il est donc très difficile d'extrapoler les résultats obtenus avec une protéine sur un support donné à d'autres protéines, car celles-ci établiront des interactions très probablement différentes avec ce support.

Dans le même ordre d'idées, Kurrat *et al.* ont montré que sur le système HSA/SiTiO₂, il n'y a pas d'interconversion possible sur la surface de la forme adsorbée réversiblement vers la forme adsorbée irréversiblement, ces deux états empruntant des chemins distincts pour l'adsorption/désorption, ce qui doit correspondre à un contact par le biais d'acides aminés différents (KURR94). L'iode pourrait ainsi avoir une influence sur les constantes cinétiques d'adsorption et/ou de désorption des états réversible et/ou irréversible d'une protéine. Une telle étude pourrait donc être faussée par l'utilisation de la technique invasive pour une protéine du marquage radioactif.

Cependant, Schmitt *et al.* ont montré par des études sur le fibrinogène que les propriétés d'adsorption sur différents films polyélectrolytiques recouvrant un tube de verre (dans des conditions d'adsorption statiques) n'étaient pas modifiées lorsque statistiquement moins d'un atome d'iode était présent par molécule (SCHM83). De plus, l'altération physicochimique ou biologique du fibrinogène est très faible lorsque cette condition est respectée (LY74).

II. LA SURFACE: STRUCTURE DU VERRE.

Le verre courant a une composition très voisine de celle indiquée au Tableau I.

TABLEAU I
COMPOSITION MASSIQUE MOYENNE DU VERRE (INDUSTRIEL)

silice (SiO ₂)	68 à 74
alumine (Al ₂ O ₃)	0.3 à 3
oxyde de sodium (Na ₂ O)	12 à 16
oxyde de potassium (K ₂ O)	0 à 1
chaux (CaO)	7 à 14
magnésie (MgO)	0 à 4.5

Le verre sur lequel les protéines sont adsorbées est un verre silicaté. La structure chimique de la silice pure obéit à une loi simple: chaque atome de silicium est lié à quatre atomes d'oxygène, et chaque atome d'oxygène est lié à deux atomes de silicium. La longueur de la liaison Si-O est de 1.62 Å. Les deux atomes de silicium liés à un même oxygène sont placés symétriquement de part et d'autre, et les quatre liaisons Si-O émanant d'un même silicium forment entre elles des angles voisins de 110° (tétraèdre).

La déformabilité des angles des liaisons engendre des structures désordonnées, avec des lacunes plus ou moins importantes. Le verre peut se définir comme un solide isotrope dans lequel la périodicité de ses atomes constitutifs fait défaut au-delà d'une dizaine d'angströms, contrairement à la matière cristallisée qui est régulière et périodique dans les trois dimensions de l'espace, telle le quartz par exemple. Les verres silicatés sont composés d'anions

(essentiellement O^{2-}) et de cations (Si^{4+} , Al^{3+} , Ca^{2+} , K^{+} ...), comprenant des cations *formateurs* et des cations *modificateurs* du réseau vitreux. Les cations formateurs sont ceux qui participent à la formation de la "charpente" du verre (polymérisation); on compte parmi eux Si^{4+} , mais aussi Al^{3+} et Fe^{3+} . Ces cations sont ceux qui sont liés, le plus souvent, à quatre atomes d'oxygène, avec une liaison de nature partiellement covalente. Les cations modificateurs (Na^{+} , K^{+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , et certains métaux de transition), en s'intercalant entre deux tétraèdres, empêchent leur interconnexion et tendent ainsi à "briser" la charpente (dépolymérisation). Plus gros que les ions formant le réseau, ils sont liés à six atomes d'oxygène ou plus, par interaction ionique. En fonction de leur composition, les verres silicatés peuvent donc être plus ou moins polymérisés, c'est-à-dire plus ou moins riches en tétraèdres interconnectés. De cette composition et structure découlent évidemment des propriétés physico-chimiques bien définies, particulièrement au contact de la surface d'un tel verre.

Nous voyons que de nombreux ions différents peuvent affleurer à la surface et sont susceptibles d'interagir avec une protéine, en établissant des interactions de nature électrostatique. La surface du verre est hydrophile et globalement négative à pH 7, et les parties polaires de la surface d'une protéine vont s'adsorber préférentiellement (liaisons hydrogène, ioniques).

Par une étude au microscope à force atomique, nous avons montré que la surface de la paroi interne d'un échantillon de tube de silice a une rugosité de 2 nm, définissant un verre de bonne qualité. Cependant, disséminés sur la surface, des amas d'environ 20 nm de haut ont également été mis en évidence. Comme le tube est nettoyé par trempage pendant plusieurs heures, voire plusieurs jours dans de l'acide sulfochromique, on peut émettre l'hypothèse que ces amas sont des sels de chrome. Cependant, il faudrait pour le montrer réaliser une étude en microscopie électronique à balayage couplée à une analyse X. Deux observations en découlent: (i) la surface du verre est loin d'être plane à l'échelle d'une protéine (des immunoglobulines G par exemple ont une largeur de 4.4 nm), et des parties de la molécule peuvent se loger dans des interstices de la surface; (ii) des liaisons électrostatiques supplémentaires peuvent être induites par la présence de sels de chrome. Pour comparaison, l'énergie d'interaction $Mg^{++}...^{-}OOC-$ (groupement carboxylate d'un acide aspartique par exemple) est supérieure à 200 kcal/mol (dans l'eau, le méthanol), ce qui représente le double de l'énergie d'une liaison covalente. Des liaisons ioniques entre les ions bichromate et des résidus chargés positivement (exemple: la lysine ou l'arginine) ne sont donc pas à exclure et pourraient être fortes.

La silice, à l'instar des métaux, des oxydes métalliques ou des sels inorganiques, est une surface dite de "haute énergie" (supérieure à $\approx 2.4 \text{ cal/m}^2$), contrairement à la plupart des composés solides organiques, les polymères inclus, qui possèdent une surface de "faible énergie". Elle peut donc lier suffisamment de molécules adsorbées pour rendre significative la réduction de la tension de surface (γ). γ est en fait l'énergie libre (ΔG) d'excès de la surface, et une diminution de γ par le processus d'adsorption est consistante avec le fait que l'adsorption est un phénomène spontané ($\Delta G < 0$). En effet, une surface qui possède initialement une grande énergie libre peut subir la plus forte diminution d'énergie libre par adsorption (HIEM86).

LES FORCES DE VAN DER WAALS: d'autres types d'interaction interviennent telles que les forces de Van der Waals, forces attractives comprenant les forces d'orientation ou de Keesom (entre dipôles permanents), les forces d'induction ou de Debye (moment électrique induit dans le champ créé par une autre molécule sur un groupement polarisable), les forces de dispersion ou forces de London (moment dipolaire instantané dû aux mouvements des électrons par rapport au noyaux). Ces forces sont l'expression d'un potentiel de Lennard-Jones (potentiel 6-12), et les énergies d'interaction varient comme $1/r^6$, r étant la distance entre deux

molécules (de petite taille), ou $1/r^3$ si l'on considère l'interaction entre une molécule et un plan, r étant alors la distance à l'interface (ISRA74).

La somme de toute ces interactions entre une protéine et la surface du verre (plusieurs kT) démontre bien que le processus d'adsorption est généralement irréversible, ou en tout cas que les constantes de vitesse de désorption sont très inférieures aux constantes de vitesse d'adsorption, ce qui a été vérifié précédemment dans la littérature et tout au long de ce travail expérimental. Les lois de la thermodynamique ne peuvent donc que rarement être appliquées de façon rigoureuse et, comme nous le verrons dans le chapitre VI, dans les conditions de flux dans lesquelles nous avons travaillé où les molécules sont constamment entraînées par le fluide en mouvement, l'équilibre n'est jamais atteint et ces lois ne peuvent être appliquées.

III. QUELQUES REMARQUES GENERALES CONCERNANT L'ADSORPTION.

(1) L'adsorption d'une protéine est un processus complexe, et de nombreux effets influencent son affinité pour une surface donnée: l'hydrophobicité de la protéine et de l'adsorbant, la distribution (localisation) des charges (sur la protéine ou la surface adsorbante), la stabilité structurale de la protéine, le pH de la solution, la force ionique, la co-adsorption d'ions (NORD84, FRAA91), etc. Sur la base de données thermodynamiques sur l'adsorption protéique (HAYN, ARAI90, ANDR85) se fonde une théorie qualitative proposée originellement par Norde et Lyklema (NORDa-e78, NORD79). Elle indique que quatre effets jouent un rôle prépondérant dans le mécanisme général de l'adsorption: les réarrangements structuraux au sein de la molécule protéique, la déshydratation de la surface adsorbante, la redistribution des groupements chargés dans la couche interfaciale et la polarité protéine-surface (HAYN94).

(2) Une molécule protéique est plus ou moins sphérique, et aussi plus ou moins polarisable, ce qui a une incidence sur les temps de corrélation des mouvements rotationnel et latéral. A l'approche de l'interface (couche de Nernst, zone de déplétion), ce paramètre peut être important à considérer lorsque l'on étudie l'aspect cinétique de l'adsorption.

(3) La manière d'amener la protéine en contact avec la surface joue également un rôle important (SODE80). Par exemple, sur du silicone hydrophobe, la quantité de protéines adsorbées dépend de la manière par laquelle la protéine est ajoutée à la solution. Si la protéine est ajoutée par étapes à certains intervalles de temps, on arrive à des quantités adsorbées plus faibles que si la solution est ajoutée à sa concentration finale. Cet effet est généralement plus faible sur une surface (de silicone) hydrophile (LUND85, JÖNS82). En effet, une réorientation des molécules sur la surface pour permettre à celles qui arrivent de s'adsorber (et d'autant plus sur une surface hydrophobe, où les interactions sont fortes) demande plus d'énergie dans le cas d'un apport en plusieurs étapes.

(4) Comme dans la théorie HSAB (Hard and Soft Acids and Bases), on peut qualifier les protéines de « hard » ou « soft » selon leur caractère plus ou moins compact ou déformable. Ceci a une influence sur leur capacité d'étalement sur une surface en fonction du temps. Dans les deux cas, leur dénaturation (partielle ou totale) après adsorption (SODE80) est un phénomène apparemment général. Cet aspect a été confirmé par des expériences de microcalorimétrie (CALD94), de liaison d'antigènes adsorbés avec des anticorps (VROM69), ou par spectroscopie de dichroïsme circulaire, technique sensible à la teneur en hélices α ou feuillet β (McMI74, AKAI79). Par exemple, une diminution du contenu en hélice α pour le fibrinogène et la perte de la quasi-totalité de la structure en feuillet β pour les γ -globulines ont été observées après leur désorption de surfaces polymériques (SODE80), ainsi qu'une réduction de 20 à 25% du contenu en hélice α pour l'albumine sérique humaine désorbée de surfaces d'oxydes hydrophiles (NORD91). Des molécules protéiques « renaturées » peuvent également être présentes en solution après certaines expériences d'adsorption (WALT80,

ANDR86). Les protéines peuvent subir un changement de conformation pendant le processus de l'adsorption, au contact de la couche adsorbée ou après départ de la surface.

Ces conclusions sont en accord avec le fait que dans la majorité des cas, les molécules sont adsorbées de façon quasi-irréversible (McRI78, LYKL84), démontrant l'importance des liaisons qui s'établissent entre une protéine et la surface. La désorption peut en ce sens être comparée à un « décolllement » ou un « arrachement ». L'existence d'un état métastable de la couche adsorbée au contact d'un solvant a été établie pour plusieurs systèmes surface/protéine: ceci est d'autant plus vrai lorsque les surfaces sont hydrophobes (BRAS69), tandis que pour des surfaces hydrophiles, différents résultats ont été obtenus, dépendant de la nature du système ou du solvant (McRI72, CHAN81).

(5) Une partie de notre travail a consisté à étudier le processus d'un échange hétérogène protéine/protéine sur une surface solide (Chap. VI). Plusieurs aspects peuvent jouer un rôle dans ce mécanisme, dont en particulier ceux que nous venons d'énumérer. Nous pouvons également noter l'influence des facteurs suivants: (i) le comportement des protéines au sein de la solution au-dessus de la surface, fonction de leur nature, de leur concentration et de la composition en sels du tampon utilisé. Des potentiels attractifs peuvent induire par exemple la formation de complexes non covalents dimériques ou polymériques (BEIS80). Il est connu en effet que certaines protéines sont sensibles à l'agrégation, et ceci est susceptible de se produire aussi bien en solution que par contact avec la surface (SCOT91, DATH90). Ceci peut affecter l'ordre de la réaction d'échange. (ii) Les paramètres hydrodynamiques liés à la géométrie du système étudié (exemple: tube de silice), qui sont déterminants: vitesse de cisaillement à la paroi, épaisseur de la couche de Nernst, etc (LEVE28, DEJA94). (iii) La conformation que les molécules protéiques peuvent prendre sur la surface (« side-on », « end-on »). (iv) La co-adsorption ou co-désorption d'ions, c'est-à-dire le nombre d'ions participant au processus de l'échange dans la région de contact entre la protéine et la surface adsorbante, ou entre les molécules qui s'échangent. (v) Les changements entropiques ou enthalpiques, telles l'énergie libre totale de Gibbs, ou la réorganisation des molécules d'eau entourant les groupements protéiques ou de surface interagissant. La déshydratation par exemple est entropiquement déterminante pour ce qui concerne les réarrangements conformationnels d'une protéine (NORD91).

L'échange de molécules sur la surface (participation des molécules en solution) accélère la désorption par rapport à un contact avec le solvant pur (LUND85, LUND90). Les liaisons qu'établit la protéine qui « arrive » se substituent progressivement à celles de la protéine qui amorce son départ. Si les molécules adsorbées et en solution sont de même nature, l'énergie libre totale reste inchangée après que l'échange se soit déroulé. Par contre, pour des molécules de nature différente, une énergie libre totale plus faible de la seconde molécule liée à la surface peut constituer une « driving force » thermodynamique pour le processus de l'échange.

CONCLUSION

Chaque surface, chaque protéine doivent être considérées dans les interrelations qui peuvent exister entre elles comme des entités inséparables, sans oublier l'importance du milieu au sein duquel ces forces s'établissent (sels, pH du solvant...), des interactions préexistantes entre les molécules dans le soluté (dépendant de la concentration, de la température, agrégation possible...), et l'influence de la technique d'étude utilisée (marquage par exemple).

Chapitre III

Matériels et méthodes

INTRODUCTION

Ce chapitre a non seulement pour but de dresser une liste exhaustive de toutes les techniques et méthodes expérimentales utilisées, mais a également pour objectif de transmettre un savoir-faire et une méthodologie acquis au cours de ce travail. C'est pourquoi il a été rédigé avec un grand souci du détail. De plus, certains problèmes irrésolus ont été indiqués, et des améliorations possibles suggérées.

Dans une première partie, nous mettons l'accent sur les différentes causes possibles de dénaturation protéique qui, en amont de l'étude proprement dite, peuvent interférer sur les résultats.

Nous présentons ensuite les deux techniques d'investigation que nous avons employées pour l'étude des phénomènes d'adsorption des protéines sur une surface de silice: la réflectométrie à balayage angulaire et une technique de radiomarquage.

Cette dernière consiste en un montage permettant de suivre l'évolution d'un signal radioactif sur un tube de verre. Nous détaillons les caractéristiques de l'iode 125, le mécanisme réactionnel de l'iodation, la procédure de marquage selon la technique de McFarlane et le calcul du rendement.

Nous décrivons ensuite le montage expérimental, ainsi que la passivation du tube avec du fibrinogène, qui constitue une méthode permettant la détermination des quantités de matériel adsorbé.

Les parties suivantes traitent de la calibration et la vérification de la linéarité des appareils de mesure. Les parties IV à VI décrivent la préparation ou l'emploi des solutions de nettoyage, du tampon PBS, et des solutions de fibrinogène et d'IgG. Nous abordons également le problème de la force ionique.

La purification des solutions d'anticorps de lapin a été une étape déterminante pour leur activité vis-à-vis des antigènes correspondants. Nous mentionnons dans la partie VII les différentes étapes d'obtention de ces solutions, ainsi que les résultats de certains tests.

Enfin, nous décrivons la méthode d'immunoprécipitation en milieu liquide sur des molécules d'antigène ou d'anticorps marquées.

I. DENATURATION.

L'intégrité de la structure native d'une protéine peut être affectée par divers agents chimiques ou physiques, qu'il est important de connaître afin de prendre les précautions qui s'imposent pour la réalisation des expériences d'adsorption. Toutes les influences ne pourront être écartées; par exemple la préparation des solutions protéiques implique la mise en contact des protéines (ou du moins une partie d'entre elles) avec les parois des récipients successifs les ayant contenues: tubes Eppendorf, bechers, erlenmeyers, récipients ou seringues en polypropylène, tubulures en Téflon ..., pendant des temps plus ou moins longs, ces contacts pouvant affecter leur état. Dans un ouvrage cité dans la référence CREI89, Volkin et Klibanov rappellent l'incidence de certains traitements sur les protéines, en particulier l'effet que ceux-ci peuvent produire sur leur structure ou activité. Nous rappelons dans ce paragraphe quelques-uns de ces effets, en relation avec les méthodes expérimentales utilisées.

1. Détergents.

Le tube de silice, le prisme de la cellule de réflectométrie ou la vaisselle ont été nettoyés soit avec de l'acide sulfochromique, soit avec une solution d'un détergent nommé Hellmanex (cf plus loin dans ce chapitre). Dans les deux cas, il est très important de rincer

abondamment (avec de l'eau bidistillée) les surfaces de verre mises en contact avec ces produits, qui se fixent fortement aux parois. Un test (pour la vaisselle en particulier) permettant de constater que tout le détergent a été éliminé, consiste à observer les bulles qui se forment à la surface de l'eau de rinçage: tant que celles-ci ne disparaissent pas quasi-instantanément, il reste des traces de tensioactif qui diminuent la tension superficielle du liquide et signalent ainsi leur présence. Pour le tube ou le prisme, un rinçage à l'acide sulfurique dilué avant toute nouvelle étude est censé décrocher à la fois les protéines qui ne l'auraient pas été avec le Hellmanex et les dernières molécules du détergent lui-même.

En effet, les détergents provoquent la dénaturation des protéines en interagissant fortement avec elles, même à de faibles concentrations. Ces interactions peuvent être si fortes que la dénaturation est souvent irréversible (LAPA78). Un cas typique est celui du SDS (Sodium Dodécyl Sulfate) utilisé en électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) pour dénaturer les protéines afin de les séparer en fonction de leur masse moléculaire.

2. Forces mécaniques.

La pression, un gradient de vitesse, l'agitation ou les ultrasons sont susceptibles de dénaturer les protéines.

L'agitation peut provoquer l'inactivation des protéines. Le mécanisme semble être lié à l'augmentation de l'interface air-liquide: les protéines s'alignent à cette interface et se déplient pour maximiser l'exposition des résidus hydrophobes des acides aminés à l'air. Les protéines s'agrègent ensuite suite à cette exposition de leurs groupements hydrophobes. Ainsi pratiquement, pour les agitations très longues de solutions protéiques (dans des tubes Eppendorfs par exemple), nous remplissons les tubes au maximum, afin de limiter le contact air-liquide qui est néanmoins inévitable.

Lorsque des solutions protéiques sont injectées à travers des tubes ou des membranes à un flux élevé (lors de la filtration sur filtres Millex par exemple, lorsque la pression devient importante), la protéine peut être exposée à un gradient de forces de cisaillement (profil de vitesse raide) au voisinage de la paroi. Ce gradient peut causer des changements conformationnels dans la protéine, résultant en l'exposition de zones hydrophobes qui étaient enfouies, suivis d'agrégation. L'inactivation de la protéine est fonction à la fois du gradient de cisaillement (« shear rate ») et du temps d'exposition à cette force (CHAR78).

3. Le froid, la congélation/décongélation, la déshydratation.

Pour conserver une solution protéique le plus longtemps possible, les biochimistes préconisent la congélation à la température la plus basse possible. Cependant, pour la stabilité de la protéine il est souvent préférable de réfrigérer (4°C) que de congeler (-20 ou -60°C) (BERG74).

L'inactivation protéique par abaissement de la température peut être réversible ou irréversible. Les causes en sont (i) un affaiblissement des interactions hydrophobes, (ii) une dépendance du pH: abaisser la température à un pH donné équivaut à changer le pH à une température donnée, et ceci concerne à la fois la vitesse et l'importance de la perte de l'activité biologique de la protéine en question (BOCK78). Très souvent, un processus de dénaturation réversible conduit à une perte irréversible de l'activité due à une agrégation subséquente.

La congélation ou décongélation des solutions protéiques s'accompagne souvent de cette perte irréversible de l'activité. Si cette dernière est difficile à mettre en évidence (avec le fibrinogène ou les IgG notamment, pour des raisons évidentes de temps, un tel contrôle ne peut être fait systématiquement), il est important de répéter ces processus le moins souvent possible, et donc de préparer des aliquots à partir des solutions mères avec des volumes et concentrations ajustés aux expériences prévues.

Durant le processus de congélation, des solutés tels que protéines ou sels sont concentrés lorsque les molécules d'eau cristallisent, engendrant des changements très importants du pH et de la force ionique dans le micro-environnement de la protéine. Par exemple, le pH du tampon phosphate (celui que nous utilisons généralement) peut varier de 7 à 3.5 lors de la congélation, ce qui pourrait facilement provoquer une dénaturation acide de la protéine. De plus, concentrer les sels augmente la force ionique, et ceci peut provoquer la dissociation de protéines oligomériques ou de domaines interagissant par le biais de liaisons électrostatiques.

Un autre facteur pouvant provoquer une inactivation (ou dénaturation) irréversible concerne l'apparition de ponts disulfures par échange thiol-disulfure ou oxydation de groupements sulfhydriles. En effet, la concentration des résidus cystéine ou cystine augmentant localement lors de la congélation, de tels échanges intra ou inter-moléculaires peuvent aisément se produire si les protéines changent de conformation. De plus, les thiols peuvent facilement être oxydés à des températures réduites, car la concentration en oxygène dans un système « partiellement » gelé à -3°C est 1150 fois supérieure à celle d'une solution à 0°C (SCHW81). Cet effet de concentration peut aussi augmenter la concentration de radicaux libres O^{\bullet} .

Lors de la déshydratation (lyophilisation par exemple) de solutions protéiques, la plupart de ces arguments peuvent s'appliquer de la même manière, la concentration en eau liquide étant réduite dans les deux cas. Le fibrinogène et les IgG humaines avec lesquels nous avons travaillé sont initialement des poudres lyophilisées: on ne peut donc pas affirmer que les propriétés natives de ces molécules soient entièrement préservées, mais on peut toutefois espérer que l'effet reste globalement négligeable.

4. Les radiations.

Les effets des radiations ionisantes ou non ionisantes sur l'inactivation protéique ont été beaucoup étudiés, en particulier ceux des radiations non ionisantes utilisées dans l'industrie alimentaire comme moyen de stérilisation (SCHW81). L'utilisation de l'iode 125 pour le marquage des protéines nous soumet directement à cette problématique.

Bien que les différentes radiations ionisantes sont physiquement très hétérogènes (rayons γ , X, électrons (β^-), particules α), les types de changements chimiques qu'elles induisent sur la molécule protéique sont assez similaires.

L'inactivation protéique est due soit à l'action directe (effet des radiations sur la molécule protéique) ou indirecte (effet des produits issus de la radiolyse des molécules d'eau environnantes sur la protéine) de ces rayonnements (FLOR67). L'action directe des radiations ionisantes provoque des changements dans la structure primaire dus à la formation de radicaux, suivis de l'établissement de liaisons croisées covalentes ou de la destruction d'un certain nombre d'acides aminés. Ceci résulte en la perte de la conformation native ou en l'agrégation des molécules protéiques (YAMA77). L'action indirecte des radiations ionisantes est due à la création de produits réactifs formés au sein de la solution aqueuse. Les espèces réactives principales dans l'eau pure sont des radicaux $\bullet\text{OH}$, des électrons solvatés et H_2O_2 , mais la liste se rallonge dans un tampon.

Les protéines peuvent également être inactivées par des radiations ionisantes telles que la lumière visible ou les UV. L'oxydation photochimique par la lumière visible requiert la présence de colorants photosensibles qui absorbent l'énergie lumineuse et oxydent ensuite des groupes sensibles de la molécule tels que cystéine, tryptophane, histidine. Les radiations UV peuvent directement inactiver les protéines en endommageant les acides aminés; les résidus cystine et tryptophane sont particulièrement labiles (FLOR67). Ainsi, même une mesure de la

densité optique à 280 nm pour la détermination de la concentration n'est pas une action totalement anodine pour une protéine.

Les problèmes de dénaturation des protéines ainsi que les techniques d'analyse associées ont été abordés de façon détaillée dans un ouvrage de Jeannine Yon (YON69).

II. LA REFLECTOMETRIE A ANGLE VARIABLE.

La technique de réflectométrie à balayage angulaire est décrite dans la partie « Layer structure determination by Scanning Angle Reflectometry (SAR) » du chapitre IV. Une description plus détaillée du principe général de cette technique pourra être trouvée par ailleurs (LUTA92a), et son exposé approfondi dans la thèse de P. Schaaf (SCHA87a). C'est pourquoi nous nous contenterons ici de résumer les notions essentielles permettant d'aborder cette technique.

1. Principe de la méthode.

La réflectométrie est une technique optique donnant accès à une information structurale sur la couche protéique interfaciale adsorbée. Soient deux milieux d'indice de réfraction n_1 et n_2 séparés par une surface plane (par exemple $n_1 = 1,333$, $n_2 = 1,457$ pour le système eau/silice). Lorsqu'une onde plane arrive sur une telle surface, elle se divise en une onde réfléchie et une onde réfractée. Toutes les polarisations de cette lumière peuvent se décomposer en une somme de deux polarisations particulières, définies par un vecteur champ électrique parallèle au plan d'incidence, constituant l'onde de type "p", et un vecteur champ électrique perpendiculaire au plan d'incidence, constituant celle de type "s". Les intensités des coefficients de réflectivité relatifs à ces ondes s et p, pour une interface de type Fresnel (c'est-à-dire parfaitement plane), ont pour expression:

$$R_s = \left(\frac{n_1 \cos\theta_i - n_2 \cos\theta_t}{n_1 \cos\theta_i + n_2 \cos\theta_t} \right)^2 \quad \text{et} \quad R_p = \left(\frac{n_2 \cos\theta_i - n_1 \cos\theta_t}{n_2 \cos\theta_i + n_1 \cos\theta_t} \right)^2$$

θ_i et θ_t étant les angles que font ondes incidente et transmise avec l'interface. L'étude des variations des coefficients de réflectivité de Fresnel R_s et R_p avec l'angle d'incidence met en évidence l'existence d'un angle particulier pour lequel R_p s'annule, c'est-à-dire pour lequel aucune énergie n'est rayonnée dans la direction de l'onde réfléchie, les dipôles de l'interface vibrant perpendiculairement à cette direction. Cet angle particulier est l'angle de Brewster (θ_B), et les directions des ondes réfléchie et transmise sont alors perpendiculaires entre elles. La valeur de l'angle θ_B est donnée par la relation: $\text{tg}(\theta_B) = n_2 / n_1$.

La réflectivité à l'angle de Brewster est particulièrement sensible au profil d'indice de l'interface. En effet, si ce profil est différent de celui de Fresnel, les dipôles de l'interface n'oscilleront plus perpendiculairement à l'onde réfléchie: ils rayonneront alors de l'énergie dans la direction de cette onde, énergie qui ne proviendra que de l'interface. Ainsi, c'est autour de l'angle de Brewster que l'on peut accéder à un maximum d'informations sur la structure d'une couche adsorbée (interface protéique par exemple).

Cette technique permet de suivre l'évolution de la réflectivité des ondes de type p en fonction des paramètres d'indice (n) et d'épaisseur (L_0) de la couche adsorbée, ces deux paramètres étant mesurés indépendamment. Elle est en particulier sensible à $\Delta n \times L_0$, le

produit de la variation de l'indice par l'épaisseur, qui traduit les quantités de matière adsorbées.

2. Montage.

La Figure 1 (p.40) montre le schéma de l'appareil utilisé. Cet appareil a été développé par Philippe Déjardin et Pierre Schaaf, à l'Institut Charles Sadron, à Strasbourg. Il permet la mesure de l'intensité réfléchie pour des ondes "p" en fonction de l'angle d'incidence, autour de θ_B : c'est un réflectomètre à angle variable. Le bras portant la cellule, l'analyseur et le détecteur est microcontrôlé et piloté par ordinateur.

Dans un premier temps, la cellule du réflectomètre est montée et remplie avec de l'eau bidistillée dégazée, en prenant la précaution d'éliminer toutes les bulles d'air, en particulier sur la surface à étudier. La connexion entre la cellule et les différents éléments du montage se fait par l'intermédiaire d'une tubulure en Téflon. La source de lumière est celle d'un laser He-Ne (5 mW, $\lambda = 632.8$ nm), produisant une onde polarisée quasi-linéairement. Le faisceau de lumière passe à travers un prisme de silice et se réfléchit sur la paroi interne formant l'une des faces de la cellule expérimentale. Différents réglages sont ensuite effectués: réglage de la position du prisme (plan d'incidence), vérification de la stabilité de la cellule, etc. Des courbes de réflexion de Fresnel sont réalisées à différents intervalles de temps dans le but de vérifier cette stabilité. Elles permettent également de contrôler la propreté de la surface d'étude, à savoir de vérifier, dans les limites de la sensibilité de l'appareil (environ 10 nm), qu'elle n'est pas contaminée par du matériel adsorbé. Les solutions, préparées avec du tampon filtré (sur filtre Millex-GV 0.22 μ m) et dégazé, sont introduites dans des ballons tricolis et injectées dans la cellule en les laissant s'écouler par gravité. Une bouteille posée sur une balance électronique permet de collecter le liquide et de contrôler l'écoulement.

Après avoir équilibré la surface avec du tampon PBS, l'intensité réfléchie est enregistrée à différents angles autour de θ_B : ces données constituent le signal de référence. Pour étudier la réactivité d'un système antigène/anticorps par exemple, la solution d'antigène est injectée dans la cellule durant environ 5 minutes, pour remplacer le tampon. Elle est ensuite laissée au repos et l'augmentation de la réflectivité autour de θ_B traduit l'adsorption à l'interface, qui se poursuit par diffusion. L'évolution de ce signal est suivie pendant quelques heures et la solution est ensuite déplacée par le tampon. De la même manière, la solution d'anticorps est amenée au contact de la paroi du prisme et le signal est analysé. Pour chaque temps de l'expérience, la courbe obtenue (réflectivité en fonction de l'angle autour de θ_B) est ajustée en se fondant sur un modèle simple de l'interface.

Il est important de noter que le rinçage de la solution protéique baignant la surface avec du tampon (généralement pendant 0.5 à 1 heure, toujours en laissant le liquide s'écouler par gravité) n'est pas neutre vis-à-vis de la structure de la couche adsorbée. Ceci sera discuté à la fin du § VI.3 de ce chapitre.

- L: Laser
- P: Polariseur
- C: Cellule
- A: Analyseur
- D: Détecteur

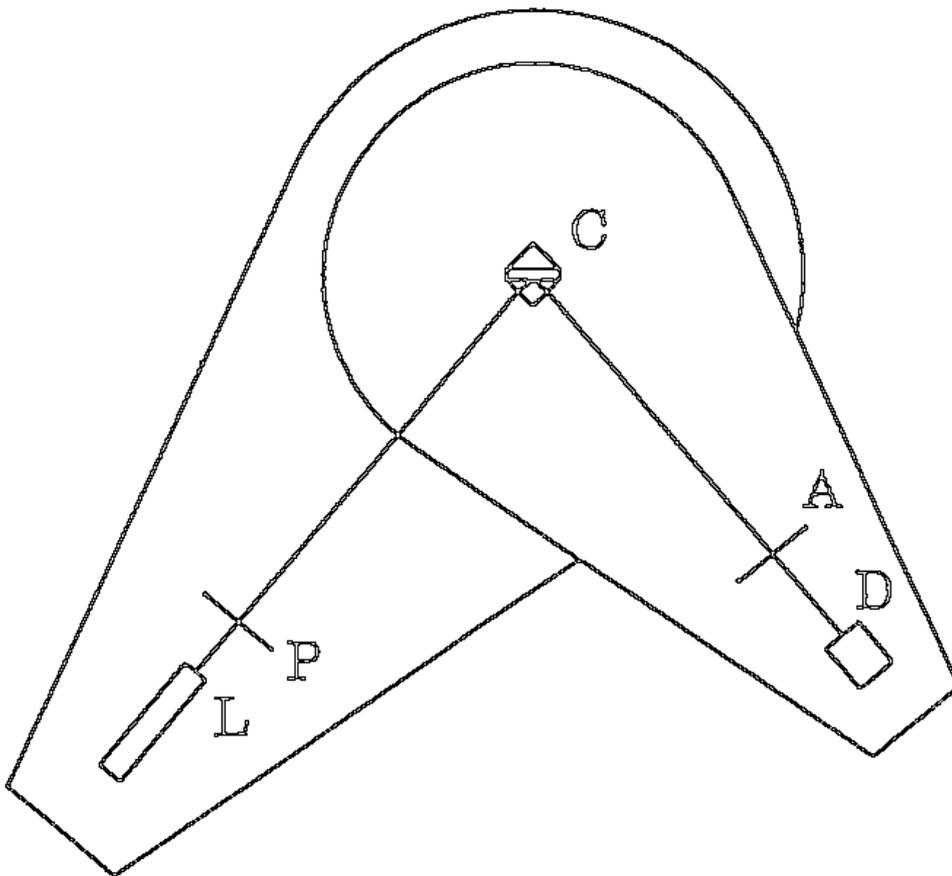


Figure 1. RÉFLECTOMÉTRIE À BALAYAGE ANGULAIRE :
schéma de l'appareil.

3. Détermination de la concentration surfacique.

Le calcul des concentrations de protéines adsorbées s'effectue en supposant un modèle de couche homogène et isotrope, définie par une épaisseur L_0 et un indice de réfraction moyen n . Les courbes de l'intensité réfléchie en fonction de l'angle autour de l'angle de Brewster sont ajustées et les paramètres calculés sur la base de ce modèle. Nous pouvons écrire que la variation de l'indice de réfraction (par rapport à celui de l'eau) est proportionnelle à la variation de la concentration en solution (Δc): $\Delta n = (dn/dc) \Delta c$, où dn/dc est le gradient de l'indice de réfraction par rapport à la concentration de la protéine en solution, que l'on suppose égal à $0.18 \text{ cm}^3/\text{g}$ à 25°C (cf chapitre I, Tableau V et la remarque correspondante). En multipliant chaque membre de cette relation par L_0 , nous obtenons l'équation suivante:

$$C_s = \Delta c L_0 = \Delta n L_0 / (dn/dc)$$

où C_s est la concentration surfacique de la protéine adsorbée.

Cette technique nous a fourni des renseignements qualitatifs sur la structure des couches protéiques adsorbées. Un inconvénient de la méthode réside cependant dans le fait que l'échange d'une molécule adsorbée par une molécule de la solution ne peut être apprécié, la densité et l'épaisseur globale restant constantes. Seul un fort écart de taille entre les deux molécules (par exemple entre de l'albumine et du fibrinogène) peut permettre de détecter le phénomène d'échange, mais pas de le quantifier. La technique de radiomarquage par contre permet de suivre les molécules individuellement, et le signal mesuré est directement relié à la quantité de protéines adsorbées, sans passer par un modèle. Les avantages et les inconvénients respectifs de ces deux techniques sont développés dans le chapitre IV.

III. LA TECHNIQUE DE RADIOMARQUAGE.

1. L'iode 125 : caractéristiques.

Les rayons γ de l'iode 125 (^{125}I) sont produits par capture électronique (100%): le noyau de ^{125}I capte un de ses propres électrons (couche 60d) en créant ainsi une lacune électronique. Celle-ci est ensuite comblée par passage d'un électron de la couche supérieure vers la couche lacunaire, avec émission d'un photon X. L'élément obtenu est le tellure, qui est véritablement l'entité radioactive de cette cascade réactionnelle: $_{53}\text{I}^{125} \rightarrow _{52}\text{Te}^* ^{125}$. L'énergie de ce rayonnement X produit est de 28 KeV. Un rayonnement β^- de 26.3 KeV accompagne le phénomène de capture électronique, par transformation d'un neutron en un proton et un électron: $n \rightarrow p + e^-$. C'est la transition du premier niveau excité du tellure à son état fondamental (spin $+3/2 \rightarrow +1/2$) qui génère le rayonnement γ d'une énergie comparable aux autres, à savoir 35.48 KeV. Ce rayonnement représente 7% de l'énergie totale de la désintégration (LEDE67).

Les solutions d' ^{125}I sont conservées à température ambiante et diluées dans une solution de NaOH pH10 (le froid et les solutions acides favorisent la volatilisation). L' ^{125}I permet de marquer les protéines sur les résidus tyrosyle et histidyle (exemple: hormones stéroïdes par monoiodation ou diiodation des Tyr). Sa période (demi-vie) est de 1441 h (60 jours). L'équation permettant de calculer la décroissance radioactive est:

$$A = A_0 \times \exp (- \Delta t \times 24 \times \text{Ln}2 / 1441)$$

avec A: activité résiduelle, A_0 : activité initiale, Δt : temps écoulé en heures.

L'influence de l'iode sur les propriétés d'adsorption d'une protéine est discutée dans le chapitre II: « Adsorption sur une surface de silice: aspects structuraux et propriétés ».

Problème lié à la sonde :

L' ^{125}I est détecté grâce à une sonde SX couplée à un détecteur NaI (TI) avec un rendement d'environ 40%. Comme nous l'avons observé, l' ^{125}I produit un rayonnement X. Or, la sonde SX utilisée détecte ces rayons X avec la même sensibilité que les rayons γ (même fenêtre énergétique). Ceci a été confirmé par le fabricant (société Quartz et Silice): ce type de sonde détecte parfaitement les rayons X du baryum (32 KeV).

Le problème pouvant surgir est lié au fait que des protéines marquées à l' ^{125}I peuvent être très rapprochées les unes des autres lorsqu'elles sont adsorbées sur la surface du tube de silice comptée par le détecteur NaI cylindrique (cf partie 3.1 de ce paragraphe pour la description du montage expérimental). Cette proximité pourrait amorcer une cascade réactionnelle induisant la production de rayons X supplémentaires: des γ ou des X ioniseraient une molécule voisine en arrachant des électrons, avec pour chaque électron arraché production d'un nouveau photon X, qui lui-même pourra arracher un électron, etc. Ces photons X vont avoir tendance à donner un signal majoré par rapport à celui obtenu à concentration interfaciale plus faible. Il est peu probable que, dans la gamme de concentrations dans laquelle nous avons travaillé (0 - 100 mg%), la concentration en solution puisse avoir un tel effet, sauf si les molécules s'agrègent entre elles dans la solution. Ce phénomène sur la surface peut difficilement être corrigé, car l'estimation de sa contribution au signal nécessiterait un autre moyen de mesure de la concentration surfacique. Par contre, une agrégation en solution devrait pouvoir être quantifiée par une mesure de turbidimétrie sur la solution mère injectée (et conservée dans les mêmes conditions expérimentales).

Une expérience réalisée à l'aide de billes de latex recouvertes d'anticorps marqués adsorbés (IgG de lapin anti-IgG humaines), et dans laquelle nous avons étudié l'adsorption de ces billes sur la surface du tube recouverte d'IgG humaines froides, semble conforter l'hypothèse d'une agrégation des billes en solution. En effet, la solution injectée restant au repos au contact du tube pendant la nuit (environ 15 heures), ne devrait induire aucune augmentation du signal, puisque la quantité totale de protéines marquées dans le volume du tube reste fixe. Or, une augmentation importante du signal a bien été observée. Cependant, le signal sur la surface après rinçage de cette solution avec du tampon est exactement celui attendu en supposant que le facteur limitant est la diffusion des billes vers la surface.

En effet, si l'on calcule le coefficient de diffusion (D) de la bille de 620 nm de diamètre en utilisant la relation de Stokes-Einstein pour une particule sphérique: $D=kT/(6\pi\eta R)$, connaissant la concentration des billes en solution (C_b), leur concentration surfacique (C_s) au bout de $t=15$ heures peut être déterminée à l'aide de la relation de Smoluchowski: $C_s=2C_b\sqrt{(Dt/\pi)}$. Dans les conditions de notre expérience, on arrive à un taux de couverture θ de 3%. L'augmentation correspondante du signal par rapport au bruit de fond (après rinçage de la solution) devrait alors être de 30 cpm, et en l'occurrence, ceci concorde de façon étonnamment précise avec le résultat effectivement obtenu.

L'augmentation du signal pendant la nuit (le signal après 15 heures moins le signal après remplissage du tube) est de 130 cpm (de 600 à 730 cpm), soit 20% d'augmentation !

Les conclusions suivantes peuvent être tirées de ces observations: (i) même si la solution avait progressé dans le tube en compensant la déplétion due à l'adsorption, l'augmentation de signal n'aurait pu excéder 30 cpm, ce qui est insuffisant pour rendre compte de celle observée; (ii) le signal étant conforme au signal attendu, il est probable qu'il n'y a pas eu d'agrégats sur la surface, d'autant plus que des amas en solution diffuseraient moins vite (D variant comme l'inverse du rayon, et la densité restant identique). Mais le taux de couverture est trop faible

pour qu'une majoration puisse être constatée à ce niveau, si tant est que cela puisse avoir une incidence sur le signal; (iii) enfin, l'explication la plus plausible de cette augmentation de 20% du signal durant 15 h pourrait être une agrégation des particules en solution, engendrant la production de rayons X en cascade. Mais cette unique expérience est évidemment insuffisante pour constituer une preuve.

Lors de cette expérience réalisée avec des billes de latex, nous avons également remarqué que la longueur efficace de comptage était anormalement faible, à savoir égale à environ 1.7 cm, alors que pour des études ne mettant en jeu que des protéines, la longueur efficace de comptage avoisinait habituellement 4 cm, toutes choses étant égales par ailleurs. Cette observation pourrait être liée à une absorption partielle du rayonnement γ par les billes.

2. Iodation.

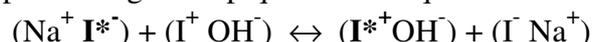
2.1. La réaction.

La réaction d'iodation d'une protéine s'effectue essentiellement au niveau des résidus tyrosyles. Mais d'autres acides aminés peuvent être affectés par cette réaction, et ceci est décrit en détail dans le chapitre IV.

La technique de marquage que nous avons utilisée consiste en la réaction de monochlorure d'iode (ICl, non radioactif) sur de l'iodure de sodium ($\text{Na}^{125}\text{I}^*$, radioactif). Cette méthode est dérivée de celle de Mac Farlane (McFA58, McFA63). La réaction s'effectue en milieu basique (pH 8.8, tampon glycine). Le monochlorure d'iode est un agent oxydant de I^- ou I_2 . En milieu basique et en solution aqueuse, il réagit avec OH^- pour former un intermédiaire réactionnel (l'acide hypoiodique IOH) très oxydant:



La constante de dissociation de IOH, $K_d = [\text{I}^+] \times [\text{OH}^-] / [\text{IOH}] = 3.2 \times 10^{-10}$ M, en solution alcaline à 25°C (GMEL31). Sa réaction sur l'iodure de sodium (transfert de deux électrons) produit le cation $^{125}\text{I}^{*+}$, par échange isotopique selon l'équation bilan:



L'iodation proprement dite s'effectue ensuite (cf Figure 2) par substitution électrophile en position ortho du groupement hydroxyle d'un résidu tyrosyle. La diiodation est favorisée lorsque le solvant est de nature non polaire, car un doublet libre de l'oxygène de l'hydroxyle pourra alors se délocaliser plus facilement vers le cycle: il y a enrichissement du cycle en électron par effet mésomère, rendant le noyau plus nucléophile (MAYB70).

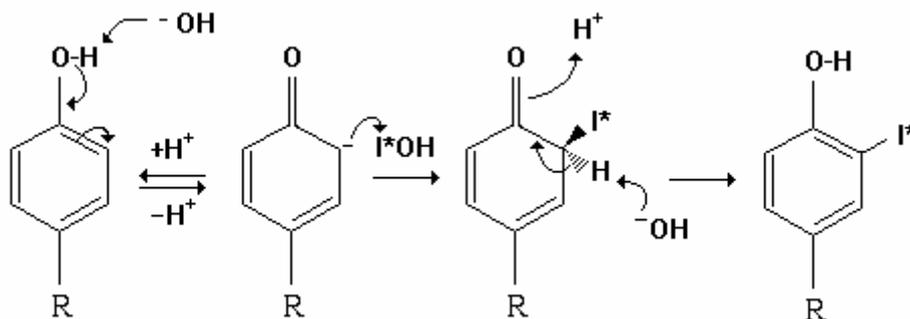


Figure 2: Les différentes étapes de l'iodation d'un résidu tyrosyle.

2.2. Méthode expérimentale.

Elle débute par la préparation d'une colonne échangeuse d'anions. La résine est introduite dans une mini-colonne réalisée avec une seringue de 5 ml, après avoir déposé un peu de laine de verre du côté de l'embout. Un volume d'environ 1 ml est laissé libre dans le haut de la seringue, afin de pouvoir effectuer le dépôt de la protéine marquée. La résine ne doit ni être trop tassée, ni comporter de trous (on tapote légèrement la seringue sur la paillasse). La résine est ensuite équilibrée avec le tampon dans lequel se trouve la protéine (filtré au préalable ou pendant l'opération sur un filtre Millex-GV 0.22 μ), pendant 10 min. environ (au minimum 3 fois le volume de la colonne). Extemporaneément, les aliquots de la protéine à marquer sont rapidement décongelés au bain-marie à 37°C, et après avoir réuni ces volumes dans un seul contenant, afin de pouvoir prélever rapidement la solution par la suite, 2 à 3 gouttes de tampon glycine sont rajoutées. Il est à remarquer ici que des tubes en polypropylène sont à préférer à des récipients en verre, afin de minimiser les pertes par adsorption sur les parois lors de transvasements répétés, qui peuvent être non négligeables avec des solutions protéiques concentrées. Dans un tube large (permettant l'accès au fond du tube de l'embout d'un pipetman de 5 ml ou d'une pipette de 10 ml) sont rajoutés successivement: 100 μ l d'une solution d'ICl à 10% dans NaCl 2M, une goutte (pipette Pasteur) de tampon glycine, et le volume nécessaire de la solution radioactive de NaI* (IMS 30, Amersham, U.K.) diluée dans NaOH pH10. Le tube est fermé avec une capsule ou un morceau de parafilm, pour empêcher l'iode de se volatiliser. Après 2,5 à 3 minutes de réaction, la protéine est ensuite rapidement ajoutée au milieu réactionnel (le pipetman de 5 ml est pour cela plus pratique et moins dangereux qu'une pipette de 10 ml munie d'une poire), et la solution est reprise deux fois, toujours avec le pipetman de 5 ml, afin de bien homogénéiser l'ensemble.

Cette étape, critique, est cependant aléatoire, car le marquage se faisant très rapidement, l'homogénéisation de NaI + ICl (un petit volume) avec des volumes de protéine (comparativement importants) variant d'un marquage à l'autre, est peu reproductible. La vitesse de la réaction est un avantage, mais la conséquence négative est l'incidence possible sur une distribution inhomogène de l'iode sur l'ensemble de la population de molécules protéiques (REGO84). De plus, les premières molécules entrant en contact avec l'iode peuvent être diiodées (bien qu'étant dans un environnement polaire), ou oxydées par ICl au point d'être détruites, tandis que les dernières pourront être monoiodées ou pas iodées du tout.

A la troisième reprise au pipetman de la solution, la protéine marquée est déposée sur la colonne, juste après le début d'assèchement de la surface, afin de ne pas diluer la protéine sur et dans la colonne. Un bécher taré aura préalablement été placé sous la colonne pour recueillir l'éluat. Lorsque toute la solution a pénétré dans la résine (pour les mêmes raisons que précédemment), le tampon d'éluion est rajouté: un volume d'au minimum deux fois celui de la colonne, soit 10 ml, est requis pour éluer toute la protéine, et le volume exact de tampon rajouté dépend de la concentration finale que l'on veut atteindre. La concentration de la protéine est déterminée par mesure de l'absorbance à 280 nm sur un échantillon dilué. L'activité de cet échantillon, moyennée par comptage de trois aliquots de 200 μ l (volumes précis déterminés par pesée sur une balance de précision Mettler), est mesurée dans un compteur γ , et l'activité spécifique de la protéine (en cpm/mg) ainsi déterminée.

Si le pH du tampon est tel que la protéine est chargée négativement, celle-ci pourra être retenue en partie par la résine (cf plus loin). Ceci a été le cas pour le fibrinogène par exemple, dans du tampon PBS 50 mM phosphate, 0.15 M NaCl, pH 7.5. Il faut alors éluer plus longtemps en faisant jouer la compétition par les sels, mais il y a à cela deux inconvénients: la solution ne peut être trop diluée en sortie de colonne, et les ions I* en excès risquent d'être déplacés. Aucune perte ne s'est produite pour les IgG dans les mêmes conditions. En fonction

du tassement de la colonne, le fibrinogène, qui est une molécule fibreuse, pourra être plus ou moins retenu, et est plus susceptible de former des agrégats à son contact puisque peu soluble.

2.3. La résine.

Il s'agit d'une résine échangeuse d'anions (Bio-Rad, AG[®] 1- X4 Resin, Catalog 140-1341), préparée par ajustement de la taille et purification d'une résine Dowex standard de même désignation. Elle est constituée de grains de polymères à base de polystyrène, obtenus par réaction du styrène avec le divinylbenzène. Un groupement triméthylammonium ou éthyldiméthylammonium (ammoniums quaternaires) y est greffé après activation préalable de la matrice par du chlorométhane en présence d'HCl, conférant à la résine son caractère d'échangeur anionique fort, c'est-à-dire dont les groupements fonctionnels sont totalement ionisés dans une large gamme de pH, possédant ainsi une capacité d'échange optimale. Elle est sous forme complexée avec du chlorure, et peut donc s'écrire: $R^{-}N(CH_3)_3 Cl^{-}$. Les anions I^{*-} (iodures radioactifs en excès) vont y être retenus par déplacement du contre-ion. Sa porosité est décrite comme étant large, ce qui suppose que les protéines peuvent passer au travers des billes et sont susceptibles d'être ralenties, plutôt que de sortir directement dans le volume mort, ce qui pourrait en partie expliquer que la récupération du fibrinogène soit plus difficile que celle des IgG. Le diamètre des billes (solvatées) est compris entre 60 et 140 mesh (106 - 205 μm), et sa densité est de 0.7 g/ml. Sa capacité totale de rétention est de 3.5 meq/g (sec) ou 1 meq/ml (résine solvatée), ce qui, vu le volume de la colonne (5 ml) et la quantité de NaI* habituellement rajoutée, est largement suffisant pour retenir les I^{*-} en excès.

Ce type de résine, habituellement utilisée lors d'un marquage pour éliminer l'iode radioactif en excès, est tout à fait efficace en ce sens; cependant, elle peut présenter quelques inconvénients liés à sa nature chimique. En effet, cette matrice est à base de polyphénols et a une forte densité de charges. Ainsi, plus la molécule protéique est grande et/ou pourvue d'une forte densité de charges négatives, plus le risque qu'elle soit retenue sur la colonne est grand. De plus, la matrice ayant un caractère hydrophobe, des interactions aspécifiques, par exemple entre cycles aromatiques, peuvent se produire. L'utilisation d'un support à base de polysaccharides ou polyacrylamides présenterait ainsi un avantage triple: (i) sa nature hydrophile réduirait les interactions aspécifiques, (ii) ces matrices sont pourvues d'une meilleure perméabilité aux polyélectrolytes et (iii), elles ont une faible densité de charges, donc retiendraient faiblement les macromolécules. Il faudrait cependant veiller à ce que le volume reste suffisant pour retenir tout l'excès d' I^{*-} .

2.4. Le monochlorure d'iode.

La solution mère de monochlorure d'iode (ICl) est très stable: elle peut être conservée pendant plusieurs années à 4°C, à l'abri de la lumière. La solution diluée à 10% utilisée pour le marquage est elle beaucoup plus photosensible, et au fur et à mesure de son utilisation, l'efficacité de marquage diminue. C'est pourquoi il est nécessaire de re préparer périodiquement (environ tous les 6 mois) une solution diluée d'ICl.

Après élution de la protéine sur la résine, il n'est pas impossible de retrouver dans l'éluat l'ion iodonium I^{+} , radioactif ou non, sous forme ICl ou IOH, provenant en partie de l'excès d'ICl de départ par rapport à NaI*, et en tout cas celui n'ayant pas réagi sur la protéine. Ceci appelle d'ailleurs la remarque suivante: IOH non marqué, en excès pour être sûr de transformer tous les I^{*-} en I^{*+} , pourra lui aussi ioder la protéine. Il y aura ainsi une certaine proportion de molécules iodées non radioactives. Mais I^{+} n'est pas stable (comme indiqué précédemment), et à la lumière (ou par ionisation d'une molécule voisine), forme un radical

I^+ , qui est susceptible d'attaquer les protéines. Cet ion iodonium pourrait être titré grâce à une électrode adéquate (Mettler).

2.5. Le tampon glycine.

La glycine possède deux pKa, correspondant à la dissociation des groupements carboxylique et amine primaire: $pK_{a1}=2.34$ et $pK_{a2}=9.6$. Nous avons utilisé pour le marquage un tampon glycine à pH 8.8, de composition: glycine 2M, NaCl 2M et $NaN_3 10^{-3}M$. Comme ce tampon est propice à la prolifération bactérienne (la glycine servant de nutriment), l'azoture de sodium, agent bactéricide, permet de le conserver plus longtemps. Néanmoins, avant chaque marquage, le tampon a été filtré sur filtre Millex-GV 0.22 μ m, et re préparé périodiquement. L'addition à la solution protéique (dans du tampon PBS à pH 7.5) de quelques gouttes de tampon glycine à pH 8.8, ainsi que d'une goutte dans le mélange réactionnel NaI + ICl avant le mélange, permet de se placer en milieu basique et d'augmenter ainsi le rendement de la réaction de substitution électrophile (I^+ est favorisé et OH^- permet également l'élimination de l'hydrogène phénolique). Le pH isoélectrique de la glycine est égal à 6 (demi-somme des pKa); donc à pH 7.5 ou 8.8, la deuxième zone tampon est impliquée, dans laquelle prédomine l'équilibre:



La relation de Henderson-Hasselbalch:

$$pH=pKa + \log ([A^-] / [AH]) \quad (\text{base conjuguée} / \text{acide conjugué})$$

permet de calculer les proportions relatives de Gly^0 et Gly^- au pH considéré. Ainsi, entre 7.5 et 8.8, la forme Gly^- varie entre 0.8 et 15.8 % de la forme Gly^0 : c'est donc la forme zwitterion qui prédomine. Cependant, celle-ci devrait être retenue sur la colonne échangeuse d'anions par le biais de son groupement carboxylate, et ne devrait donc pas se retrouver dans l'éluat contenant la protéine marquée.

2.6. Calcul du rapport ^{125}I /protéine et rendement de marquage.

Après chaque marquage, une estimation des rapports $ICl/^{125}I$, $[ICl+^{125}I]$ /protéine et ^{125}I /protéine se référant au milieu réactionnel initial, ainsi que du rendement de marquage, a été réalisée.

Le rendement de comptage peut être obtenu de deux façons différentes: (i) un calcul théorique partant de l'activité spécifique obtenue au jour du marquage: connaissant le nombre de μ moles d' ^{125}I contenue dans une mCi, on peut calculer le rapport ^{125}I /protéine obtenu après marquage ; (ii) un calcul réalisé à partir de la mesure de l'activité de la solution (mélange réactionnel contenant la protéine) juste avant son dépôt sur la résine: il faut alors rectifier la concentration de la protéine initiale par la dilution dans le milieu réactionnel, diluer cette solution suffisamment pour éviter une saturation du compteur γ (radioactivité très forte) et de façon précise par pesée, et faire le rapport de l'activité spécifique obtenue après marquage sur l'activité avant dépôt, qui est l'activité maximale théorique.

Cette méthode présente quelques désavantages, dont: 1) l'iode libre, encore très concentré, peut se volatiliser ou s'adsorber sur les parois, entraînant une surévaluation du rendement, 2) une partie de la solution de protéine marquée est perdue pour faire la mesure.

3. Tube de silice.

3.1. Montage expérimental.

Les expériences de radiomarquage ont été réalisées à l'aide d'un appareillage expérimental similaire à celui utilisé par Philippe Déjardin, à l'Institut Charles Sadron (Strasbourg). Le schéma du montage expérimental est représenté sur la Figure 3 (p.47).

Deux pousse-seringues électroniques, commandés par un programme informatique, permettent l'injection à un débit réglable (généralement 2.4 ou 4.8 ml/h), soit d'une solution tampon, soit de la solution protéique marquée ou non. L'injection peut se faire de façon séquentielle par basculement d'une vanne à trois voies. L'utilisation d'une telle vanne permet également de stabiliser le débit avant l'injection dans le tube, et de rincer la partie de tubulure en amont de cette vanne avec la solution que l'on veut injecter, réduisant ainsi le temps mort d'arrivée de la solution dans le tube. Les différentes parties du montage sont reliées par une tubulure en Téflon (PTFE: Polytétrafluoroéthylène) de diamètre interne 0.8 mm, des petites vannes permettant la connexion avec les seringues ou le tube.

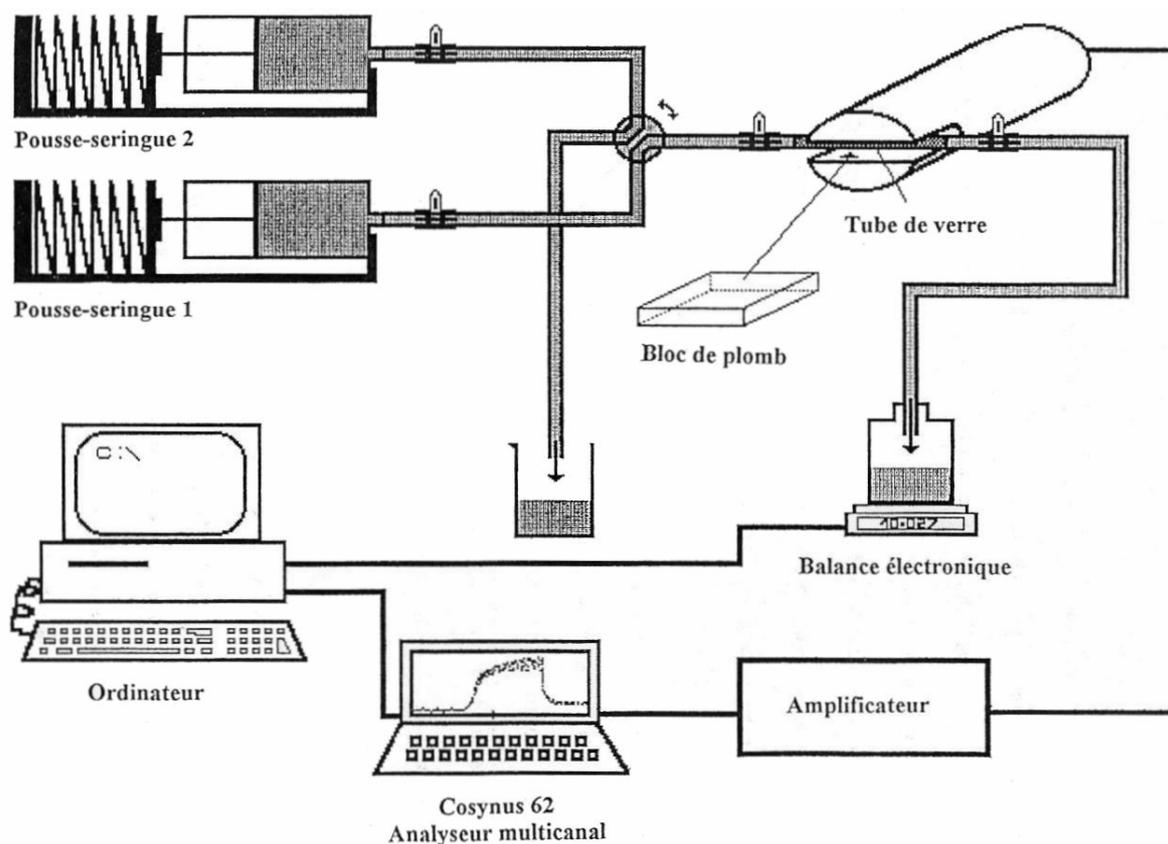


Figure 3. Schéma du montage expérimental du tube de silice.

Le tube de silice (Striegel, Strasbourg) a un diamètre constant sur sa longueur de 1.7 mm, et une longueur d'environ 10 ou 20 cm. Cette longueur peut avoir une incidence sur le signal mesuré (variation de l'épaisseur de la couche limite en fonction de la distance de la zone de mesure à l'entrée du tube). Cet aspect est discuté de façon plus approfondie dans le chapitre VI, qui aborde le problème de l'adsorption sous l'angle hydrodynamique.

Le tube de 10 cm est connecté par le biais de petites vannes trois voies en polypropylène, et se positionne dans un détecteur NaI en forme de U (comme indiqué sur la figure 3), de façon à être plaqué au fond de ce détecteur, une plaque de plomb en recouvrant l'entrée. Un « effet de bord » (radioactivité en amont et en aval des bords du détecteur) limite ainsi la résolution du signal observé. Le tube ainsi disposé dépasse les bords du détecteur d'environ 1 cm de chaque côté.

Le tube de 20 cm, muni d'embouts métalliques à pas de vis, est connecté par le biais d'embouts en polypropylène. Il a permis l'utilisation d'un détecteur NaI cylindrique, positionné verticalement, entourant entièrement le tube parcourant le cylindre à sa base. Le tube en Téflon est directement en contact avec le tube de verre, les protéines ne voient donc pas d'interface liquide-métal. Les effets de bord ont été limités en disposant de petites plaques de plomb, découpées de façon à entourer le tube, à l'entrée et à la sortie du cylindre, et le tube était positionné avant chaque expérience de façon à ce que la longueur de son entrée à l'entrée du détecteur fût précisément de 6.5 cm. Le signal mesuré étant sensible à la position du tube par rapport au détecteur, ce système, beaucoup plus contrôlé, permet une plus grande reproductibilité des résultats.

Le liquide injecté s'écoule à la sortie dans un collecteur disposé sur une balance électronique (Mettler) reliée à un ordinateur. Un programme permet d'enregistrer en continu les données envoyées par la balance, ce qui permet, par pesée différentielle, de suivre en temps réel les débits d'injection durant l'expérience (le programme calcule un débit moyen sur un intervalle de temps défini). Le détecteur NaI est relié à un photomultiplicateur. Après amplification, le signal de radioactivité est intégré sur des intervalles de temps choisis (en général 4, 10 ou 60 s.): un temps court permet une résolution temporelle plus grande et donc une étude cinétique plus fine, tandis qu'un temps plus long est plus approprié si l'on ne s'intéresse qu'aux quantités adsorbées, car il permet, en particulier pour une étude de réactivité antigène/anticorps, d'amplifier des différences de signal souvent très faibles. L'évolution de ce signal est visualisée sur l'écran d'un analyseur multicanal (Cosynus 60 ou 62), permettant d'afficher un groupe de 2048 canaux, 2 groupes de 1024 canaux ou 4 de 512. Les données d'un groupe (lorsque deux groupes au moins ont été définis) sont transférées en bloc pendant l'acquisition sur le groupe effectif, sur un microordinateur grâce auquel elles peuvent être traitées (graphiques, calcul du débit...). Par la suite, une amélioration de ce système d'acquisition a consisté en l'implantation directement dans l'ordinateur d'une carte Camberra, permettant de se passer du Cosynus, ce qui, à l'aide du logiciel associé, a grandement simplifié l'acquisition et la gestion des données. Cette carte Camberra (Packard Radiomatic) est de type AccuSpec FMS (Fast Multi-Channel Scaling). Le « software » est constitué de modules de programmes exécutables, dont AICTRL.exe (Acquisition Interface Control), résident, MCA.exe (programme principal), AC.exe (compilateur pour les programmes d'autoséquence) et un ensemble « Basic Spectroscopy » (ND) permettant de traiter et manipuler les données spectrales.

Ce montage permet donc de suivre la protéine marquée dans le volume du tube, ainsi que son adsorption sur les parois du verre (cf Figure 5 chapitre IV, p.80). Pendant l'injection de la solution protéique, la somme du signal dû au remplissage du tube et du signal relié à la quantité de protéine adsorbée sera visualisée, la contribution du remplissage devenant constante après un certain temps. Après rinçage avec du tampon, seul le signal dû à la protéine présente sur la paroi s'affichera, que l'on pourra alors corrélérer à la quantité adsorbée.

Différentes études ont été entreprises grâce à ce montage: isothermes d'adsorption, processus d'échange, de réaction entre un antigène et un anticorps (de façon directe ou après échange de la première molécule sur une couche protéique préadsorbée), cinétiques d'adsorption et de désorption, etc... Les renseignements obtenus dans une expérience où la première protéine injectée était marquée et la deuxième était froide ont souvent été complétés par l'expérience symétrique dans laquelle la première était froide et la seconde marquée. Tous ces aspects seront décrits et commentés dans les chapitres suivants, mais une caractéristique importante est que dans ce système, l'adsorption est réalisée de façon dynamique, à un certain débit d'injection. Le phénomène de diffusion/convection vers la surface, d'orientation des molécules dans le gradient de vitesses, la géométrie propre au système impliquant certaines conditions hydrodynamiques précises, sont autant d'aspects qui ne doivent pas être occultés.

3.2. Passivation de la surface interne du tube de verre.

La passivation de la surface interne du tube de verre est grossièrement décrite dans le chapitre IV. Elle permet de calibrer le tube, dans le sens où, aucune adsorption sur la surface n'intervenant, le signal ne sera dû qu'aux molécules marquées présentes dans le volume. Voici dans le détail la procédure expérimentale à suivre.

Après nettoyage du tube avec de l'acide sulfochromique ou Hellmanex/acide sulfurique dilué, puis rinçage extensif à l'eau bidistillée, le tube est connecté à ses deux extrémités à une tubulure en Téflon suffisamment longue. Le bout de chaque tube est relié à une vanne à trois voies. A l'aide d'une seringue, une solution concentrée de fibrinogène (100 mg% (w/w)) est injectée dans le tube. Le système est fermé à ses deux extrémités et laissé au repos pendant environ une heure, de manière à ce que le fibrinogène puisse s'adsorber et saturer la paroi interne du tube. Le tampon qui sera utilisé dans l'expérience sur le tube passivé est ensuite injecté dans le tube (à un débit lent) pour chasser la solution de fibrinogène, et ce en veillant à ce qu'aucune bulle d'air n'ait pénétré dans le tube lors du raccordement de la seringue contenant le tampon. Après avoir mis le tube légèrement sous pression afin d'éviter un dégazage ultérieur, le système est fermé et immergé dans un bain-marie à 60°C pendant environ 10 minutes. A cette température, le fibrinogène subit une dénaturation thermique (DeBA83) et va se fixer irréversiblement sur la surface, empêchant toute adsorption supplémentaire de protéine. L'ensemble est amené à température ambiante avant d'être connecté au circuit expérimental, en veillant à nouveau à ce qu'aucune interface avec l'air n'ait lieu au contact de la surface (ce qui est la partie la plus délicate).

Le critère de réussite de la passivation sera le suivant: lors d'une expérience dans laquelle une protéine marquée est injectée puis rincée avec du tampon, si le pourcentage d'augmentation du bruit de fond (BdF) par rapport au signal (c'est-à-dire le rapport BdF après rinçage moins BdF avant injection sur signal à la fin de l'injection) reste inférieur à 2%, on pourra considérer que la passivation est effective.

3.3. Calibration du tube de silice et calcul de la concentration surfacique des protéines adsorbées.

La calibration, c'est-à-dire la prise en compte de la fenêtre que voit effectivement le détecteur NaI, aboutit à la détermination de ce que nous avons appelé la « longueur efficace de comptage » du tube (L_{eff}). Celle-ci permet de relier le signal de radioactivité détecté dans le tube à la quantité de protéines adsorbées par unité de surface.

Deux méthodes peuvent être utilisées à cette fin: l'une de ces approches a été décrite par Boumaza *et al.* (BOUM92), et tient compte de façon intrinsèque de L_{eff} dans chaque expérience; l'autre approche, qui est celle que nous avons arbitrairement retenue pour le calcul

des concentrations surfaciques, s'effectue avec L_{eff} fixé et déterminé par avance grâce à une expérience dans laquelle le tube est préalablement passivé avec du fibrinogène (cf partie 3.2. précédente).

Le principe, ainsi que les avantages et inconvénients de ces deux méthodes, sont discutés dans la partie « Study of the Fib/anti-Fib reaction » du chapitre IV, à laquelle le lecteur pourra se référer.

4. Calibration et linéarité des appareils de mesure.

4.1. Calibration du Cosynus 62.

Le photomultiplicateur (PM) doit être sous tension depuis plus de 12 heures avant toute calibration.

Sur le panneau arrière de l'appareil, le câble arrivant sur J1 est branché sur SIGNAL, et comme en mode MESURES (mode MCS), les deux interrupteurs ACQUIRE et COIN sont respectivement sur la position haute et au milieu.

Remarque: un zéro électronique de l'appareil peut être réalisé: l'interrupteur ACQUIRE est alors mis sur position STROBE, le câble arrivant sur J1 (en mode MCS) est débranché, et le zéro est réglé avec le bouton frontal à droite de l'écran du Cosynus.

Le Cosynus est relié à un amplificateur et un sélecteur insérés dans un châssis métallique. Le câble arrivant sur Tsc (acquisition du signal en fonction du temps, position regroupant à la fois l'amplificateur et le sélecteur) est branché sur Amp (amplificateur uniquement). Sur le sélecteur, les boutons LL (Lower Level, seuil bas) et UL (Upper Level, seuil haut) sont réglés au minimum et au maximum respectivement.

Sur le Cosynus, le mode calibration est le mode PHA, qui est le mode effectif lors de la mise en route de l'appareil.

Dans le détecteur NaI, une source d'iode 125 de forte activité est insérée. Le spectre apparaissant à l'écran comprend 2 pics: le photopic (P), qui est le pic majoritaire, et un pic secondaire à droite du photopic, le pic somme (S).

Le photopic (ou pic photoélectrique) est dû aux rayons γ qui perdent toute leur énergie dans le cristal, et qui produisent un grand nombre de photons. Le nombre de ces photons est en moyenne proportionnel à l'énergie absorbée, mais malheureusement seule une faible partie de ces photons produit des photo-électrons sur la cathode du PM.

Deux particules γ incidentes peuvent être virtuellement en coïncidence et totalement absorbées par le cristal. Ce phénomène d'auto-coïncidence peut se produire suffisamment souvent pour donner un pic somme dans la zone d'énergie de 1.324 MeV.

Le signal intégrant la surface de chaque pic (signal obtenu après un temps défini) est donné par l'appareil en positionnant les curseurs au début et à la fin du pic.

En jouant sur le gain ou éventuellement la haute tension (HT) alimentant le PM (bien que pour chaque PM, une HT optimale est donnée par le constructeur), on détermine ainsi la meilleure efficacité de comptage (Eff%) du PM. Pour ce faire, la relation suivante est utilisée:

$$\text{Eff \%} = \frac{4(1 - P / T)}{(2 - P / T)^2} \times 100$$

où T est le signal total intégrant toute la surface du spectre, somme de P et S. Cette relation est l'équation d'Eldridge (ELDR64). En règle générale, Eff% doit être supérieur à 60%.

La linéarité du Cosynus 62 est telle que 2010 canaux correspondent à une tension de 8V (pour cet appareil, contrairement au Cosynus 60 présentant une dérive, la linéarité est très bonne). Ceci permet de déterminer les valeurs en Volt de LL et UL délimitant la fenêtre centrée sur le spectre de l'iode 125 (début de P et fin de S), sur laquelle nous allons travailler. Ces valeurs sont réglées et fixées au niveau du sélecteur (Discriminateur).

Remarque: La calibration sur la carte d'acquisition Camberra s'effectue de façon automatique à l'aide d'une option incluse dans le programme MCA.exe.

4.2. Linéarité du signal mesuré sur le tube de silice.

La linéarité du signal obtenu par le biais de la chaîne d'appareils de mesure détecteur NaI/photomultiplicateur/amplificateur/Cosynus 62 ou carte Camberra, concerne surtout le système détecteur/photomultiplicateur. En effet, un temps mort de comptage pourrait introduire une erreur d'autant plus grande que le nombre de coups enregistrés est grand.

La figure 4 (p.52) représente l'activité mesurée sur le tube passivé avec du fibrinogène d'une solution d'albumine marquée en fonction de sa concentration en solution. Chaque point expérimental correspond au signal du tube rempli, sans adsorption d'albumine sur la paroi, et a été corrigé du facteur de la décroissance radioactive: ces points se rapportent donc tous à un temps identique. Nous pouvons constater que dans le domaine étudié, dans lequel s'inscrivent typiquement les signaux mesurés au cours de nos expériences, la linéarité est parfaite.

4.3. Calibration du compteur γ .

L'activité des solutions de protéines marquées est mesurée à l'aide d'un compteur γ (Minaxi γ , United Technologies, Packard Instrument Co. Inc., Downers Grove, USA).

Les solutions sont comptées dans des tubes à essai. Les volumes sont presque toujours comptés sur 200 μ l, et déterminés précisément par pesée (balance Mettler, précision au $1/10^6$ de μ g): ceci limite l'effet du volume sur le résultat du comptage, bien que cet effet reste faible. Nous avons démontré en effet qu'une activité de 167000 cpm/ml mesurée sur un volume de 200 μ l diminue de façon régulière jusqu'à 163000 cpm/ml en augmentant le volume à 600 μ l de la même solution radioactive. Ceci est dû au fait que la position du détecteur (cristal de NaI) est constante, et une variation du volume induit une variation de l'angle solide de comptage. La position du détecteur peut cependant être réglée en hauteur de façon à optimiser la mesure pour un volume particulier.

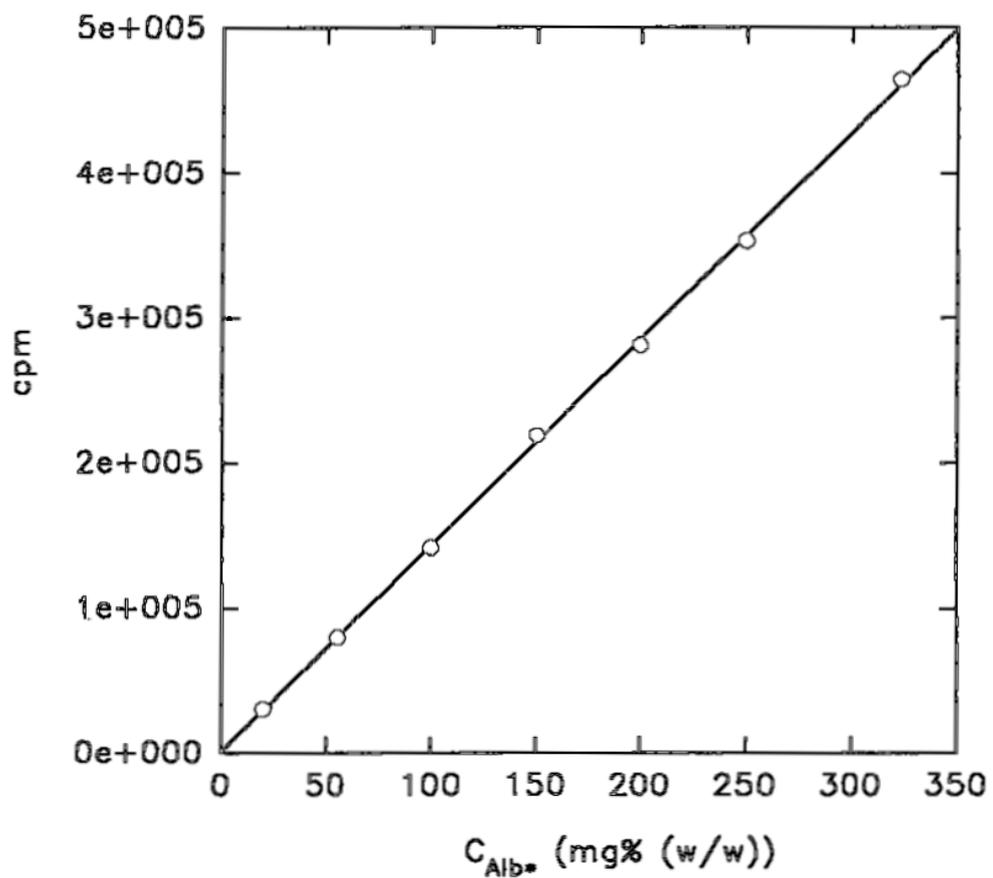


Figure 4: Linéarité du signal mesuré sur le tube de silice. La droite représente l'ajustement des points expérimentaux par une régression linéaire.

La calibration du compteur γ s'effectue avec une source scellée d'iode 129 et une solution d'iode 125. Une méthodologie comportant trois programmes prédéfinis est suivie: (i) un programme « Contrôle Qualité » (QC), qui analyse le pourcentage de variation du BdF depuis le dernier programme QC, donne la valeur de l'énergie centrale du pic photoélectrique de calibration du nucléide (^{129}I) en keV, calcule la résolution du détecteur (%) et le Chi-carré, qui est un contrôle de la reproductibilité des comptages; (ii) un programme d'autocalibration, permettant d'ajuster automatiquement la haute tension appliquée sur le détecteur pour compenser les écarts de température et de mesure liés à l'âge; (iii) un programme calculant l'efficacité de comptage d'une source d' ^{125}I . Elle est déterminée par la méthode d'Eldridge. Cette méthode est très sensible: elle permet de révéler de très faibles variations de rendement dues par exemple à la vaporisation partielle de l'iode à la partie supérieure d'un tube bouché (due à la température ou un stockage prolongé), au renversement d'un tube, à l'atténuation provoquée par l'épaisseur d'eau ou par la paroi de verre du tube, dont l'effet est de 15 à 20% supérieur à celui d'un tube en plastique.

Le rendement du cristal NaI 2x2 pouces de l'appareil utilisé est supérieur à 70% pour l'iode 125. Le temps de comptage maximal défini par tube est de 10 min., pour un écart-type de 0.5.

Prétemps: pour un échantillon assez actif (supérieur à 300000 cpm), les pertes dues au temps mort deviennent significatives. Cet inconvénient est corrigé automatiquement par un circuit temps réel.

Stabilité: une variation de température provoquera une dérive inférieure à 1,5% par degré. L'appareil n'étant pas thermostaté, ceci peut avoir une influence non négligeable sur un comptage, si celui-ci est effectué le matin ou en milieu d'après-midi, car il n'est pas rare d'avoir des variations de température de plus de 4°C dans le local dans une même journée.

4.4. Linéarité du compteur γ .

L'appareil corrige le défaut chronique de linéarité de réponse du détecteur NaI à moins de 5% de l'énergie du pic photoélectrique. La question se pose cependant de savoir si la réponse est linéaire sur toute la gamme de mesure des activités avec lesquelles nous avons travaillé, pouvant varier de quelques cpm à plusieurs millions de cpm. En effet, la méthode de mesure des concentrations par dilution radioactive suppose une variation linéaire du signal de radioactivité en fonction de la concentration d'une même solution protéique marquée.

Nous avons vérifié cette linéarité en partant d'une solution mère d'anti-IgG marqués (anti-IgG*) de concentration et d'activité spécifique connues. Cette solution a été diluée en cascade dans du tampon PBS. La dilution est réalisée de façon précise par pesée et les concentrations, c'est-à-dire les activités théoriquement attendues pour chaque tube, sont donc connues. Nous avons représenté sur la figure 5a (p.54) l'activité mesurée, en cpm ramenés à un volume précis de 200 μl , en fonction de la concentration $C_{\text{anti-IgG}^*}$ de la protéine en solution (en mg% poids/poids). La figure 5b (p.54) est un agrandissement de la première dans le domaine des faibles concentrations, à savoir entre 0 et 2.5 mg%. On voit que, dans ce domaine, la réponse n'est pas linéaire, alors qu'elle l'est et le reste au-delà de 2.5 mg% et jusqu'aux plus fortes activités. Une régression linéaire effectuée sur l'ensemble des points expérimentaux donne une droite dont l'ordonnée à l'origine est d'environ 25000 cpm/200 μl . Cette valeur est faible comparée à l'amplitude du signal obtenu pour la solution mère à 100 mg% ($4.7 \cdot 10^6$ cpm/200 μl).

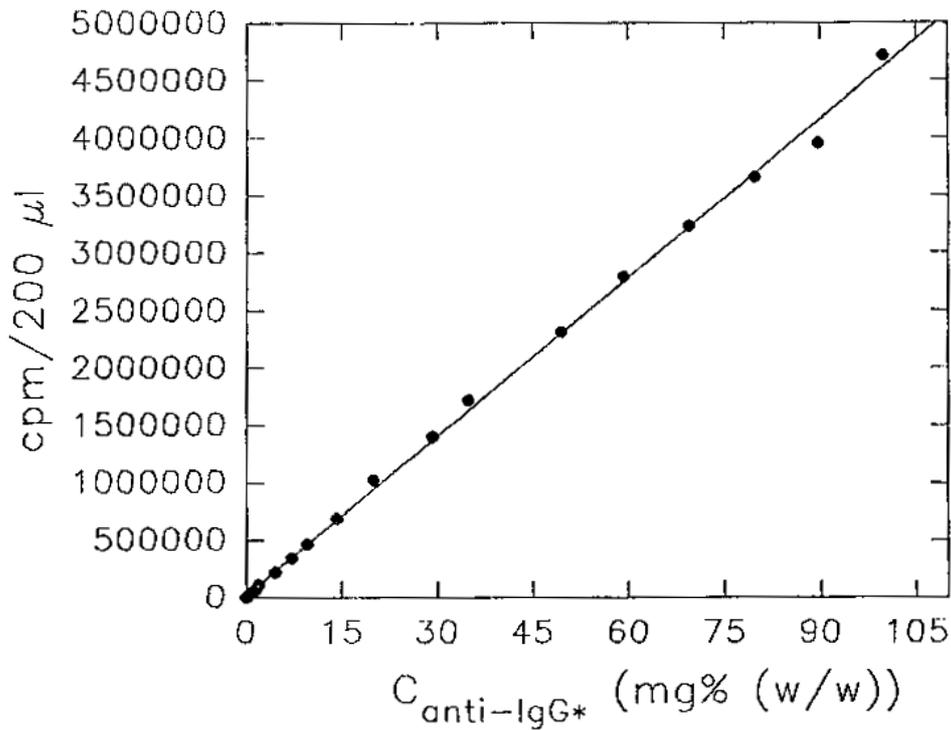


Figure 5a: linéarité de la réponse du compteur gamma.

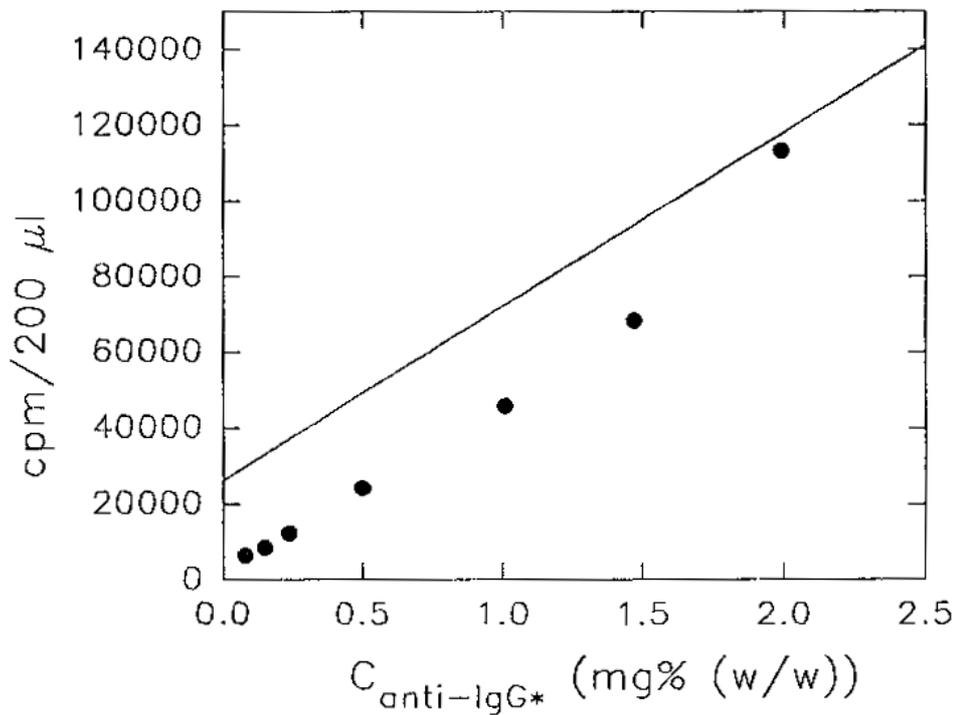


Figure 5b: agrandissement de la Figure 5a dans le domaine des faibles concentrations.

- Points expérimentaux
- Droite obtenue par régression linéaire sur l'ensemble des points.

L'hypothèse pouvant être faite est que cette non linéarité aux faibles concentrations peut être la conséquence d'une adsorption parasite de la protéine marquée sur les parois du tube à essai. L'activité spécifique de la protéine étant d'environ $23.5 \cdot 10^6$ cpm/mg (ce que l'on peut vérifier dans cette expérience), on trouve que la valeur de 25000 cpm/200 μ l correspond à environ 1 μ g de protéine. Il est possible d'estimer assez correctement la surface que recouvre 200 μ l de solution sur le fond arrondi d'un tube à essai, sachant que le rayon est de 0.5 cm, la hauteur du liquide dépassant la demi-sphère (coupole formée par la base et approximée comme telle) de 0.2 cm et le rayon de la demi-sphère de 0.3 cm. La surface que l'on obtient est alors de 1.2 cm², ce qui donnerait une concentration interfaciale égale à environ 0.8 μ g/cm². Ceci est tout à fait en accord avec l'ordre de grandeur de la valeur à saturation de la concentration surfacique d'une IgG sur du verre (sur le tube de silice, nous avons obtenu un $\Gamma_{\max} = 0.8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$).

De cela nous pouvons donc déduire qu'il est fort probable que, dans l'intervalle de temps nécessaire pour faire la dilution, la pesée et le comptage, la protéine marquée va s'adsorber sur les parois du tube à essai, de façon proportionnelle à sa concentration en solution. Lorsque la concentration dépasse une certaine valeur (ici environ 2.5 mg%), la majoration du signal devient négligeable par rapport au signal, et la concentration interfaciale, au vu de sa valeur approximative, doit se stabiliser très vite: le régime linéaire s'amorce.

Cet effet doit entraîner une déplétion de la concentration en solution. Ceci a été vérifié en mélangeant la solution de protéine marquée (il s'agissait d'IgG) à une solution d'IgG froide de forte concentration (environ 50 mg%). La protéine froide s'adsorbant majoritairement sur les parois, nous avons effectivement constaté que la réponse du compteur γ devenait linéaire sur tout le domaine de concentrations, ce qui confirme notre hypothèse de départ.

Les activités des solutions comptées se situaient généralement dans le domaine linéaire, et la contribution de l'adsorption parasite sur le signal mesuré a été négligée.

IV. PREPARATION DE L'ACIDE SULFOCHROMIQUE.

L'acide sulfochromique permet un nettoyage parfait de la vaisselle et a été utilisé tant pour la cellule du réflectomètre que pour le tube de verre, par trempage pendant un minimum de 24 heures. Au moins dix rinçages à l'eau bidistillée (Millipore) sont ensuite nécessaires.

La préparation de l'acide sulfochromique pour 1 litre de solution nécessite:

- 50 g de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (bichromate de potassium),
- 50 ml d'eau,
- H_2SO_4 (acide sulfurique) concentré qsp 1 litre.

Préparation: Dans un grand erlenmeyer disposé sur un tambour chauffant (thermostat 2/3, c'est-à-dire entre 80 et 120°C), dissoudre par petites quantités le bichromate dans 50 ml d'eau, à l'aide d'un agitateur magnétique (la solution étant dense et le bichromate se dissolvant très mal, prendre un gros barreau magnétique). Toutes ces opérations doivent se faire sous hotte, les émanations (sels de chrome) étant hautement toxiques. Rajouter progressivement, en le faisant couler sur la paroi de l'erlenmeyer, l'acide sulfurique par volumes de 10 ml, tout en maintenant l'agitation et le chauffage. Laisser refroidir l'acide sulfochromique lentement sous agitation durant la nuit.

V. METHODE DE NETTOYAGE DES SURFACES AU HELLMANEX.

Une méthode de nettoyage des surfaces de silice (tube de verre ou cellule de réflectométrie) autre que celle utilisant l'acide sulfochromique a parfois été employée: il s'agit d'une mise en contact de ces surfaces avec un détergent, le Hellmanex, pendant quelques heures (2 ou 3 heures à 20-25°C suffisent, mais nous l'avons généralement laissé agir pendant la nuit), suivi d'un rinçage d'abord à l'eau bidistillée, puis avec une solution d'acide sulfurique diluée (rapidement injectée et laissée au repos pendant environ 5 minutes). Un dernier rinçage avec de l'eau bidistillée (suivi de l'injection du tampon de travail) permettra l'obtention d'une surface parfaitement propre. La solution mère concentrée de Hellmanex (Hellma GMBH & Co, Müllheim, Allemagne) a été diluée à 2 ou 5 % avec de l'eau pure déminéralisée et, pour une action plus immédiate, peut être préalablement chauffée à environ 60°C. L'acide sulfurique (H₂SO₄) est dilué à 10 %. Ce dernier permet *in fine* de décrocher rapidement les quelques molécules qui ne l'auraient pas été par le Hellmanex et d'éliminer des molécules de surfactant adsorbées. Ceci a été vérifié sur le tube, où après une expérience donnée, l'emploi successif de ces deux produits dans les conditions susdites s'est révélé suffisant pour retrouver le signal du bruit de fond avant l'expérience (cf Figure 6, p.57).

Le Hellmanex est un concentré alcalin de surfactants et substances nettoyantes biodégradables, indiqué pour le nettoyage de surfaces (verre, quartz) optiques, et dit sans influence sur des réactions enzymatiques ou sérologiques.

Cette méthode présente les avantages d'être tout aussi efficace que celle utilisant l'acide sulfochromique, d'être moins agressive pour la surface (pas de dépôt éventuel de sels de chrome), d'être moins lourde à utiliser, à savoir moins dangereuse et ne nécessitant pas de démontage du système expérimental, ce dernier point entraînant une plus grande reproductibilité des expériences d'adsorption.

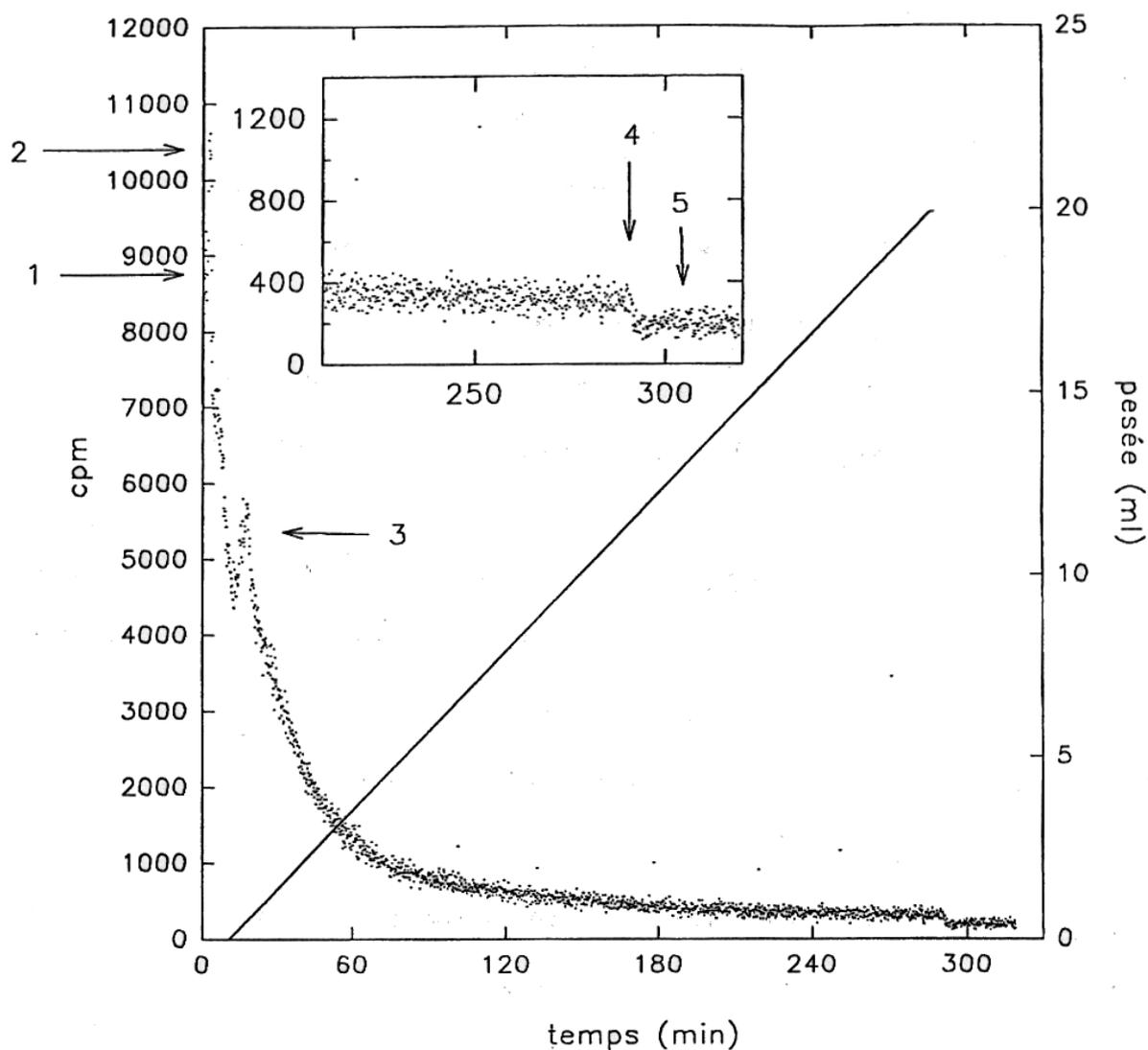


Figure 6: Rinçage Hellmanex/ H_2SO_4 (IgG^* , tube).

Courbe en points: cpm; ligne continue: pesée (ml), la pente de cette droite indiquant le débit d'injection (environ 4.8 ml/h).

1: Niveau de départ correspondant à une certaine quantité de protéine adsorbée.

2: Injection de Hellmanex: légère montée due à un "décrochage" probable de molécules marquées adsorbées en amont du tube, dans la tubulure en Téflon, qui arrivent dans le volume du tube.

3: Autre "décrochage".

4: Injection de H_2SO_4 : retour au niveau du bruit de fond initial.

5: Injection d'eau.

VI. PREPARATION DU TAMPON PBS ET DES SOLUTIONS DE FIBRINOGENE ET D'IGG.

1. Tampon PBS.

Le tampon que nous avons le plus généralement utilisé pour mettre les protéines en solution ou diluer des aliquots de solutions protéiques mères était du tampon PBS (Phosphate Buffered Saline) pH7.5, 0.05M phosphate, 0.15M NaCl. De l'azide de sodium NaN_3 10^{-3}M a été rajouté dans certains cas, pour éviter la prolifération bactérienne.

Ce tampon a été préparé en ajustant à 7.5 le pH d'une solution de Na_2HPO_4 0.05M, 0.15M NaCl (de masse moléculaire 358.14 ou 177.99 selon que le degré d'hydratation est 12 ou 2 H_2O respectivement) avec une solution de NaH_2PO_4 0.05M, 0.15M NaCl (de masse moléculaire 137.99 (H_2O) ou 156.01 ($2\text{H}_2\text{O}$)). Par aspiration sous vide, le tampon ainsi obtenu est filtré sur filtre Millex-GV 0.22 μ (filtration stérile) et amené dans un ballon tricol. Ce dernier est stocké à 4°C et maintenu le plus possible sous vide: la solution est prélevée à l'aide d'une seringue à une ouverture du ballon, et un filtre Millex de 0.22 μ est positionné à l'ouverture permettant l'entrée d'air, afin de le maintenir le plus stérile possible. Avant chaque utilisation, le tampon PBS est filtré à nouveau et dégazé. On le laisse ensuite s'équilibrer à température ambiante.

2. Solutions protéiques.

Comme nous l'avons déjà mentionné dans le chapitre I, le fibrinogène est assez peu soluble en solution aqueuse. Pour le dissoudre entièrement dans le tampon PBS, le fibrinogène sous forme de lyophilisat (Kabi Vitrum, Stockholm, Suède) subit plusieurs filtrations successives.

La poudre lyophilisée de fibrinogène humain est préparée selon une méthode modifiée de Cohn (Björling 1972). Après lyophilisation, le produit est transformé en poudre sèche à 70°C pendant 24 heures. La concentration en plasminogène est de 2 à 4 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de fibrinogène et la concentration en plasmine inférieure à 5 $\mu\text{g}/\text{g}$ de fibrinogène.

La poudre est d'abord pesée, et la masse est plus que doublée si l'on se réfère à la concentration finale voulue par dilution, car il y a une forte proportion de sels. En effet, pour 1g de fibrinogène pur, il y a 0.4 g de NaCl (masse moléculaire: 58.44) et 1.0 g de citrate de sodium (masse moléculaire: 294.1). Or pour un aliquotage typique à environ 400 $\text{mg}\%(\text{w}/\text{w})$ de concentration en fibrinogène finale, nous avons dissous 500 mg de poudre lyophilisée dans environ 50 ml de tampon. Ceci conduit à une augmentation de la molarité en NaCl de 0.03M, passant donc de 0.15 à 0.18M, et à une molarité en citrate de sodium de 0.014M. Cette quantité n'est évidemment pas négligeable, mais il faut remarquer que lors d'une expérience typique, un aliquot est dilué 4 à 40 fois environ dans du tampon PBS, réduisant d'autant cet écart en molarité. Le citrate sera donc finalement présent sous forme de traces.

Pour dissoudre le fibrinogène dans la solution tampon, il est nécessaire de l'ajouter petit à petit et non en une fois, pour ne pas former d'agrégats (qu'il faudrait alors très longtemps pour dissoudre), tout en remuant la solution avec une spatule. Le fibrinogène a tendance à rester à la surface et pour ne pas risquer d'altérer sa structure, il faut évidemment éviter de l'écraser (car il colle à la spatule) sur les parois de verre du becher. Il faut compter environ 1 heure lorsque le tampon est à température ambiante pour arriver à dissoudre à peu près toute la protéine.

Une filtration de cette solution sur un filtre de 0.22 μm est impossible car le filtre se bouche trop vite. C'est pourquoi une première filtration sur un filtre Millex de 0.45 μm s'impose, suivie de la filtration à 0.22 μm . La concentration est ensuite déterminée par mesure

de l'absorbance à 280 nm sur une fraction diluée. Il est alors possible de mesurer la perte de protéine sur les filtres en comparant la concentration obtenue à celle attendue. Si la dissolution a été bien menée, la perte est généralement minimale.

La solution de fibrinogène est ensuite répartie dans des cryotubes, et le volume des aliquots est, dans la mesure du possible, estimé en fonction des besoins ultérieurs de manière à optimiser le lot. Les cryotubes sont rapidement congelés dans l'azote liquide et stockés à -20°C pour une durée maximale de 3 mois.

La même démarche est suivie pour la préparation des IgG humaines, mais elle est grandement simplifiée à cause de la grande solubilité de la protéine dans l'eau. Les IgG sont reconstitués à partir de la poudre lyophilisée par redissolution dans de l'eau ou du tampon, par une agitation douce qui peut demander 5 à 10 min.

Ces IgG humaines polyvalentes ont été fournies par le Centre Régional de Transfusion Sanguine de Strasbourg (CRTS). Elles sont obtenues par fractionnement à l'éthanol (technique de Cohn) d'un mélange de plasma provenant de plus de 1000 donateurs. La technique de fabrication comporte un traitement des immunoglobulines à pH4 en présence de traces de pepsine (ceci permet d'éliminer toute activité anti-complémentaire). La répartition physiologique des sous-classes d'immunoglobulines n'est pas modifiée par rapport à celle des IgG du plasma, et le pourcentage d'IgG par rapport au total des protéines est toujours supérieur à 95% (moyenne: 98%). Le pourcentage des polymères par rapport à l'IgG totale est inférieur à 10%, et l'addition de saccharose facilite la lyophilisation et la redissolution du produit, tout en assurant une meilleure stabilité des IgG.

La composition moyenne d'une solution ainsi reconstituée contenant 500 mg d'IgG pour 100 ml de solvant est la suivante:

IgG: 475-550 mg%, c'est-à-dire environ $3.3 \cdot 10^{-5} M$

IgA: 4 mg%

IgM: <2 mg%

Protéines: 500-600 mg%

Sodium et chlorures: 6.5 mM

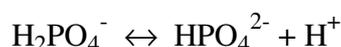
Saccharose: 850 mg%, $C_{12}O_{11}H_{22}$, donc de masse moléculaire 342, c'est-à-dire environ $2.5 \cdot 10^{-2} M$.

Si l'on compare les concentrations molaires d'IgG et de saccharose, nous pouvons constater que le saccharose est 1000 fois plus concentré que les IgG. Cet aspect n'a pas été considéré dans nos études d'adsorption, mais pourrait avoir une incidence non négligeable sur les propriétés d'adsorption des IgG humaines: le saccharose diffusant beaucoup plus vite vers la surface, il pourrait favoriser l'adsorption subséquente des IgG, ou modifier leur structure sur la surface.

Ce problème ne se pose pas avec les IgG de lapin anti-fibrinogène ou anti-IgG humaines, car ceux-ci ont été purifiés et nous ont été fournis par le CRTS sans lyophilisation ni rajout de sucre préalable. Il serait pour cela intéressant de comparer les isothermes d'adsorption d'IgG humaines et de lapin.

3. Force ionique : PBS, Fibrinogène, IgG.

Tampon PBS: Le tampon PBS (pH7.5, 50mM phosphate, 0.15M NaCl) contient les espèces suivantes en solution: Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 et NaCl. L'ion phosphate est un triacide, et l'équilibre concerné à pH7.5 est le suivant:



dont le pKa est 7.2. La relation de Henderson-Hasselbalch rend compte de la dissociation des acides faibles, et permet d'estimer les proportions relatives de ces deux espèces:

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log \left(\frac{[\text{HPO}_4^{2-}]}{[\text{H}_2\text{PO}_4^-]} \right)$$

A pH 7.5, on trouve qu'il y a donc 2 fois plus de HPO_4^{2-} que de H_2PO_4^- . Les concentrations sont donc de 2/3 et 1/3 de la concentration initiale (50mM), à savoir 0.033M pour HPO_4^{2-} et 0.017M pour H_2PO_4^- . La concentration en Na^+ totale est donc: $2 \cdot 0.033 + 0.017 + 0.15 = 0.233\text{M}$, tandis que celle de Cl^- est de 0.15M. La force ionique (I) s'obtient par la relation:

$$I = \frac{1}{2} \sum_i M_i Z_i^2$$

où M_i est la molarité de l'ion i de valence Z_i . Nous obtenons ainsi $I = 0.266$.

Fibrinogène: la molécule de fibrinogène possède une charge nette: celle-ci peut influencer sur la force ionique du milieu, et ceci d'autant plus que sa concentration est élevée. Voyons quelle est cette contribution à I totale pour une concentration de 50 mg% (w/w), concentration choisie pour les expériences de réflectométrie. Le point isoélectrique du fibrinogène est de 5.5, c'est-à-dire 2 unités de pH au-dessous de 7.5: la protéine a donc une charge nette négative. A 50 mg%, le fibrinogène ayant une masse moléculaire de 340 kDa, sa molarité est de $1.47 \cdot 10^{-6}\text{M}$. A pH 7.5, la composition en acides aminés (cf chapitre I, tableau V) permet, connaissant le pKa de chaque groupement, d'apprécier le nombre de charges positives et négatives sur la molécule. Le résultat est le suivant: 336 Asp^- , 214 Lys^+ , 153 Arg^+ et 336 Glu^- , ce qui donne une charge nette égale à -305. Il faudrait en fait ne tenir compte que des groupements en surface, mais la molécule de fibrinogène étant très allongée, nous pouvons supposer cette valeur correcte en première approximation.

Si l'on calcule la force ionique résultante en supposant que chaque charge portée par la molécule est indépendante, Z_i^2 est toujours égal à 1, et on obtient $I = 0.0008$, ce qui est négligeable. Mais il est plus probable qu'il y ait une corrélation entre les charges, celles-ci étant concentrées sur certaines parties de la molécule, ce qui impliquerait un comportement de type polyion. La répartition des charges sur cette molécule somme toute très allongée, amène à penser que son comportement est sans doute intermédiaire entre celui d'une somme d'ions indépendants et celui d'un polyion. Néanmoins, il est intéressant de considérer ce cas limite. Le carré de 305 dans l'expression de la force ionique implique une valeur $I = 0.068$, ce qui n'est plus du tout négligeable et ramène la valeur dans le tampon PBS à 0.334. La contribution du fibrinogène (à 50 mg%) représenterait alors 20% de I totale.

IgG: la même analyse peut être faite pour des molécules d'IgG. Si l'on se réfère à la séquence d'une IgG humaine (cf tableau V, chapitre I), nous obtenons à pH 7.5 une charge nette de -119 (41 Arg^+ , 107 Asp^- , 140 Glu^- et 87 Lys^+). A nouveau, il ne faudrait considérer que les charges de surface de la molécule, mais ce calcul peut donner un bon ordre de grandeur. A 50 mg%, la molarité est de $3.33 \cdot 10^{-6}\text{M}$ (masse moléculaire: 150000). Avec une somme d'ions indépendants, nous obtenons $I = 0.0006$, et un avec un polyion, $I = 0.024$, c'est-à-dire une force ionique totale de 0.29, la contribution à I des IgG à 50 mg% étant alors de 8%. Le cas du polyion est ici plus probable, la molécule d'IgG étant grossièrement sphérique.

Aussi bien pour le fibrinogène que pour les IgG, la contribution de ces molécules à la force ionique totale pourrait avoir une incidence sur la structure de la couche adsorbée. En effet, comme nous le verrons dans les chapitres IV (Figures 2a et 2b, p.73-74) et V (Figures 3a

et b, 4b et c et 5a et b, p.102-105) dans les expériences de réflectométrie, le remplacement de la solution protéique par une solution tampon PBS provoque à la fois une diminution de l'épaisseur de la couche adsorbée et une augmentation de son indice de réfraction moyen. La variation sur chacun de ces paramètres est de l'ordre de 20%, aussi bien pour une couche d'IgG ou de fibrinogène que pour une couche constituée d'un mélange de ces deux molécules. Le changement de force ionique induit par le passage du tampon pourrait influencer sur les proportions respectives des molécules adsorbées en conformation « side-on » ou « end-on ». La couche se compactant, les molécules se « couchent » sur la surface, établissant davantage de liens avec celle-ci. Ceci pourrait signifier que les molécules en solution (avant rinçage avec le tampon) interagissent avec les molécules adsorbées de façon à les maintenir dans une certaine conformation à l'interface (avec une proportion importante de molécules en position « end-on »). Cette hypothèse pourrait être vérifiée en injectant dans la cellule du réflectomètre des solutions de protéine de concentration décroissante (donc de force ionique décroissante), ou un tampon de force ionique décroissante.

Mais ce tassement de la couche adsorbée pourrait également être dû à un effet de nature purement hydrodynamique, lié à l'écoulement du tampon (par gravité) dans la cellule.

VII. SOLUTIONS D'ANTICORPS DE LAPIN : PURIFICATION ET CARACTERISTIQUES.

Pour notre étude, nous avons utilisé des anticorps de lapin anti-fibrinogène humain et anti-IgG humaines issus de différentes purifications réalisées au Centre Régional de Transfusion Sanguine de Strasbourg (CRTS), par Monique Freund et Catherine Ravana.

1. Anti-fibrinogène (anti-Fib).

Les caractéristiques importantes des solutions d'anti-Fib sont indiquées dans le chapitre IV, § « Study of the Fib/anti-Fib reaction ».

Trois solutions ont été utilisées, issues de trois purifications différentes du même plasma brut extrait de lapins immunisés contre du fibrinogène humain préparé au CRTS (dont l'immunogénicité n'est peut-être pas identique à 100% à celle du fibrinogène Kabi). Nous nous référerons à ces solutions tout au long de ce travail en les appelant 1, 2 et 3 pour les distinguer. Ces solutions ont été purifiées et un test ELISA a été réalisé selon les protocoles suivants:

Purification: - première estimation de la réactivité par la détermination d'un titre Ouchterlony (immunodiffusion double en milieu gélifié).

- double précipitation de l'antisérum de lapin soit à l'acide caprylique / sulfate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 45%, soit à l'acide octanoïque / sulfate d'ammonium après dilution avec de l'acide acétique pH4.

- Dialyse contre du tampon PBS.

- Vérification de la pureté par SDS PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis): les molécules de SDS vont se fixer sur les protéines en leur conférant une densité de charges négatives égale, les protéines ne migrant alors plus qu'en fonction de leur poids moléculaire dans un champ électrique.

- Dosage des anticorps à la BCA, pour déterminer une concentration précise. Il s'agit d'une réaction entre la protéine et un mélange BCA / sulfate de cuivre CuSO_4 4%. La lecture se fait à 562 nm et la sensibilité se situe dans le domaine de concentrations 10 à 100 µg/ml.

Test ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay): - « Coating » des micropuits en polypropylène de la plaque de titration avec du fibrinogène humain (Kabi), en solution dans du PBS (1 µg/ml, 100 µl/puits).

- Saturation avec de la BSA (Bovine Serum Albumin) 1% dans PBS. Ceci afin d'éviter des interactions aspécifiques de l'anticorps avec la surface du puits.

- Mise en contact de l'anti-Fib à des concentrations décroissantes, par dilutions en cascade de 2 en 2 (160 µg/ml initial).

- Ajout du conjugué IgG de chèvre anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase.

- Ajout du substrat OPD et lecture à 490 nm.

- Détermination du « titre » ELISA, c'est-à-dire le point d'inflexion de la courbe de titration.

Pour les solutions d'anti-Fib 1 et 3, le titre ELISA était de 1/27000^{ème} à 12 g/l, tandis que pour la solution d'anti-Fib 2, il était de 1/10000^{ème} (12 g/l).

Concernant la solution d'anti-Fib 2, une mauvaise première purification a résulté en une contamination importante par de l'albumine. Après reprécipitation et concentration sur cellule Amicon, une deuxième purification a donc été réalisée par gel-filtration moléculaire. Cette opération supplémentaire peut expliquer le mauvais titre ELISA obtenu.

Remarque: ces solutions ne contiennent pas d'IgM.

Marquage: le marquage de ces solutions a donné une activité spécifique au jour du marquage environ 4 fois plus élevée pour la solution d'anti-Fib 2 que pour les solutions 1 et 3. Le tableau I résume les résultats du marquage.

TABLEAU I:

MARQUAGE DES SOLUTIONS D'ANTI-FIB.

	Activité voulue (mCi/50mg)	Rapport ICI/ ¹²⁵ I dans le milieu réactionnel	Activité spécifique (cpm/mg)	Rendement de marquage (%)	Rapport ¹²⁵ I/anti-Fib (1 atome pour x molécules)
anti-Fib 1	0.5	1836	7.5·10 ⁶	31	1/3602
anti-Fib 2	1	678	20·10 ⁶	43	1/1233
anti-Fib 3	0.25	1751	4.5·10 ⁶	38	1/5589

2. Anti-IgG.

Les IgG de lapin anti-IgG humaines que nous avons utilisées dans un premier temps avaient été obtenues par saignée des lapins lors de la réponse primaire de production des anticorps (première réponse à l'antigène du système immunitaire). Le plasma était donc susceptible de contenir beaucoup d'IgM, produits en grande quantité lors de cette réponse. Cette présence d'IgM a été vérifiée sur la solution purifiée d'anti-IgG par fractionnement sur colonne d'HPLC (High Purification Liquid Chromatography).

Remarque: bien que la procédure de purification des anti-IgG ait été la même que pour les anti-Fib, la présence d'IgM n'a pas été détectée chez ces derniers par analyse sur gel d'électrophorèse.

La Figure 7 (p.63) représente le tracé d'élution de la solution d'anti-IgG en fonction du temps, ainsi que, pour comparaison, d'une solution d'IgG humaines (CRTS). Les masses moléculaires des différents constituants sont indiquées au-dessus de leurs pics respectifs (V_0 étant l'endroit de sortie du volume mort). Un échantillon de référence (pics non montrés) à servi d'étalonnage pour les masses (20 μ l, kit BIORAD Standards Calibration, à 35 mg/ml). La colonne est constituée de silice enrobée de Séphadex et traitée de façon à éviter les interactions aspécifiques. Pour la solution d'anti-IgG, un pic correspondant à des molécules de masse moléculaire supérieure à 400 kDa se détache, représentant de 20 à 30% du signal total. Ce pic se rapporte donc très probablement aux IgM, de masse moléculaire 920 kDa. Nous voyons que l'échantillon d'IgG humaines (CRTS) contient majoritairement des IgG.

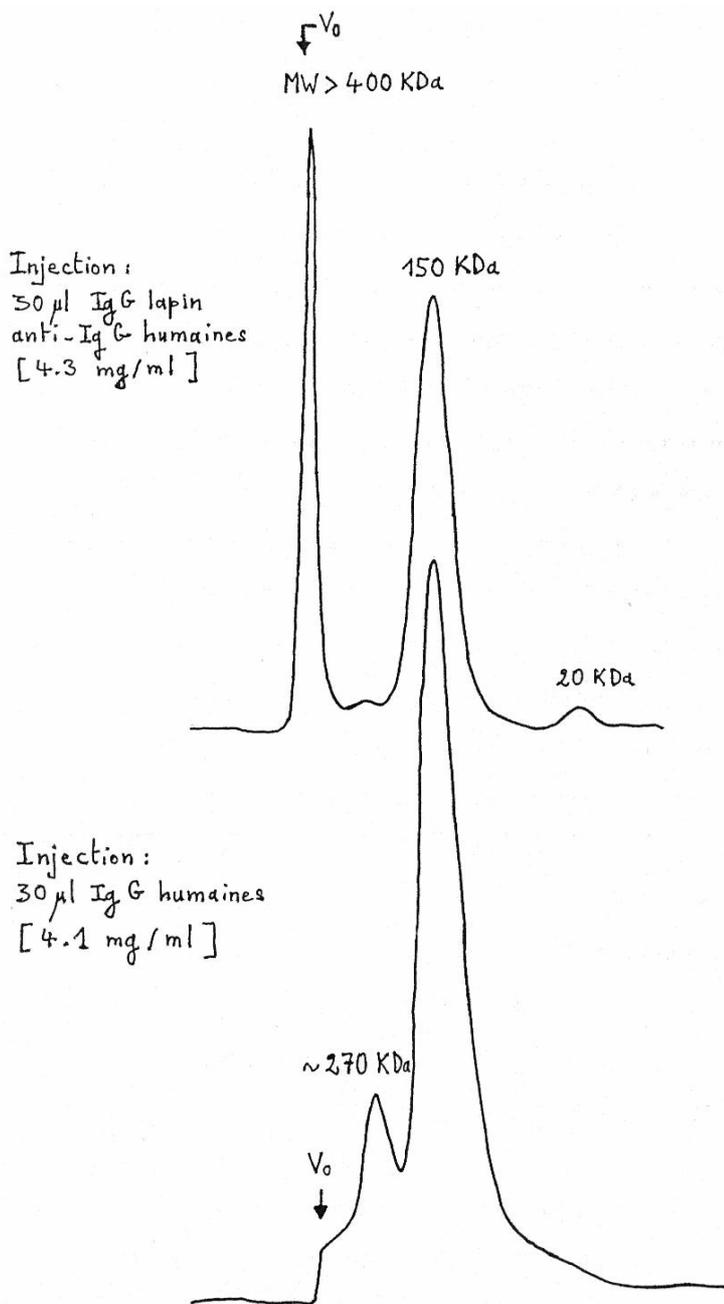


Figure 7: Passage sur HPLC de solutions d'IgG humaines et anti-IgG de lapin.
Colonne: SW 3000G (0.75 x 60 cm), domaine de résolution: 10 - 400 kDa;
0.5 ml/min., 0.5 cm/min.; Tampon: PBS pH7.5.

Une deuxième indication de la présence d'IgM a été apportée lors de la détermination du pH isoélectrique (pH_i) de la solution d'anti-IgG par isoélectrofocalisation (PhastGel, IEF 3-9, Pharmacia): deux bandes majeures se détachaient sur le gel, l'une dans le domaine de pH_i correspondant à celui des IgG (entre 6.75 et 6.85), l'autre, plus fine, localisée aux alentours de 7.1-7.2.

La présence d'IgM est gênante aussi bien en réflectométrie, où elle conduit à des épaisseurs importantes qui masquent l'épaisseur des autres protéines étudiées, qu'en radioactivité, car les IgM (pentamères d'IgG) sont aussi des anti-IgG et peuvent influencer sur le signal de la réaction. C'est pourquoi nous avons purifié la solution d'IgG de lapin anti-IgG humaines (MIRA93). Un premier essai de purification par gel-filtration sur une colonne de Séphacryl 200 (Pharmacia) s'est révélé infructueux. Nous nous sommes alors orientés vers une technique de chromatographie par échange d'ions, qui a consisté à faire passer la solution d'anti-IgG sur un gel de DEAE (diéthylaminoéthyl) Trisacryl (Sepracor), échangeur anionique. Une électrophorèse (SDS-PAGE, Pharmacia) a cependant montré que la séparation IgG-IgM était incomplète. Cette méthode n'a donc pas pu être retenue. Enfin, une chromatographie par gel-filtration sur un gel Superose 12 (particules de diamètre compris entre 20 et 40 µm, domaine de fractionnement: 1000 à 300000) a permis d'obtenir deux pics bien distincts d'IgM et d'IgG. Une électrophorèse (SDS-PAGE) a confirmé l'absence d'IgM dans la fraction des IgG. La solution d'anti-IgG a ensuite été dialysée trois fois dans du tampon PBS (quelques heures), filtrée sur filtre Millipore GV-0.22µ et congelée à -20°C.

Les titres ELISA des différentes purifications de la solution d'anti-IgG étaient tous d'environ 1/12000ème pour une concentration de départ de 12 g/l.

VIII. IMMUNOPRECIPITATION EN PHASE LIQUIDE.

Pour confirmer l'effet du marquage à l'iode 125 sur la perte de réactivité des anticorps de lapin vis-à-vis de leur antigène, une technique immunologique, l'immunoprécipitation en milieu liquide, a été utilisée.

1. Principe de la méthode.

Le principe de cette méthode est le suivant: lorsqu'un antigène en solution est mélangé, dans des proportions adéquates, avec une solution d'anticorps ou un antisérum appropriés, il se forme un précipité. L'analyse quantitative de cette interaction consiste en l'ajout de quantités croissantes d'antigène à des tubes contenant un volume constant de la solution d'anticorps. Après incubation, les précipités sont centrifugés et analysés (par pesée ou en déterminant l'activité, comme nous verrons plus loin). Une courbe de ce type est généralement obtenue (Figure 8):

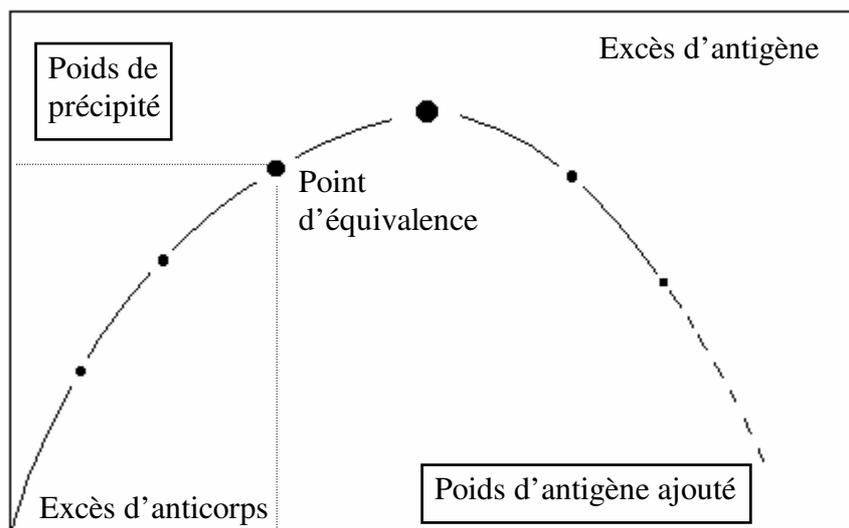


Figure 8: Réaction de précipitation entre un anticorps et un antigène.

Au point d'équivalence, qui correspond au tube dont le surnageant ne contient pratiquement plus ni antigène ni anticorps, le contenu en anticorps d'un sérum peut être calculé, car tout l'antigène ajouté se trouve alors dans le précipité sous forme de complexe où il est associé à tous les anticorps disponibles; le contenu en anticorps est par conséquent donné par la différence entre les poids du précipité et de l'antigène ajouté. Deux zones peuvent donc être définies, de part et d'autre du point d'équivalence: celle où l'on se trouve en excès d'anticorps et celle où l'on est en excès d'antigène. L'analyse du précipité formé en excès d'anticorps, alors que les sites de fixation de l'antigène sont largement saturés, donne une mesure du rapport molaire anticorps/antigène dans le complexe, ce qui permet une estimation de la valence effective de l'antigène, c'est-à-dire le nombre effectif de sites de liaison (déterminants) pour les anticorps. Ce paramètre, qui dépend notamment de la taille de l'antigène et de l'espèce qui a produit l'anticorps, est extrêmement variable. Ainsi, le calcul effectué avec des antisérums de lapin hyperimmunisés contenant préférentiellement des IgG montre que l'ovalbumine peut avoir une valence de 10 et la thyroglobuline humaine peut présenter jusqu'à 40 déterminants à sa surface (ROIT90). Lorsque l'anticorps est en excès, des complexes solubles d'antigènes (Ag) et d'anticorps (Ac) peuvent alors être mis en évidence dans le surnageant, dont un grand nombre a une composition de type Ag_4Ac_3 , Ag_3Ac_2 et Ag_2Ac . Lorsque l'antigène est fortement en excès, l'analyse par ultracentrifugation révèle que les complexes sont principalement de forme Ag_2Ac , ce à quoi l'on peut s'attendre car les molécules d'IgG sont divalentes. Entre ces situations extrêmes, la liaison Ac/Ag donne généralement lieu à des structures tridimensionnelles en réseau (supermolécules), s'assemblant principalement par interactions Fc-Fc pour former de gros agrégats qui précipitent (théorie du réseau immunologique).

Les petits agrégats qui se forment lorsque l'on mélange des solutions diluées d'antigène et d'anticorps ont un aspect trouble ou turbide qui peut être quantifié par diffusion de lumière (néphélométrie). La sensibilité de cette mesure peut être accrue en utilisant la lumière monochromatique d'un faisceau laser et en ajoutant du polyéthylène glycol à la solution afin d'augmenter la taille des agrégats.

Pour ce qui concerne nos expériences, réalisées sur le système fibrinogène/anti-fibrinogène, le radiomarquage nous a permis de suivre de façon très précise la formation du précipité. Deux types de test parallèles ont été réalisés: (i) l'antigène est marqué (Ag^*) et

l'anticorps non, et (ii) l'anticorps est marqué (Ac*) et l'antigène non. Un comptage de l'activité sur le précipité ou sur le surnageant permet de quantifier la molécule marquée qui apparaît ou qui disparaît, respectivement. Dans le cas (i), nous devons toujours observer la formation du précipité Ac/Ag*, et ceci pour deux raisons: le site de reconnaissance de l'anticorps est gardé intact, et l'anticorps est polyclonal, c'est-à-dire capable de reconnaître différents sites épitopiques (le marquage de l'antigène n'est globalement pas perturbant pour la réaction). Le précipité obtenu correspond donc à la référence de la réaction entre les deux espèces moléculaires sans qu'il y ait un quelconque effet dû au marquage. Dans le cas (ii), l'influence d'un marquage plus ou moins fort sur la réactivité de l'anticorps peut être directement appréciée par quantification de l'Ac* qui apparaît dans le précipité Ag/Ac* ou, et ceci dans les deux cas, de l'Ac* qui disparaît dans le surnageant. Les résultats de cette étude sont décrits à la fin du chapitre IV.

Remarque: ce test est aussi connu sous le nom de « test de Farr », couramment utilisé en virologie médicale, bactériologie et parasitologie (recherche de toxines, d'antigènes bactériens ...).

2. Procédure expérimentale.

Dans des tubes Eppendorf de 2 ml est déposé un volume fixe (entre 20 et 40 μ l) de la solution protéique marquée (Ag* ou Ac*), de concentration et d'activité spécifique connues. Des dilutions dans le tampon adéquat (PBS) de la solution mère de l'anticorps ou l'antigène correspondants (froids) sont réalisées de façon à balayer un domaine de rapports anti-fibrinogène/fibrinogène compris entre 0 et 140 molécules d'anticorps pour une molécule d'antigène dans le milieu réactionnel. Des volumes de tampon PBS, calculés en tenant compte des volumes de la solution froide et de façon à ce que le volume final de chaque tube soit de 300 μ l, sont rajoutés à la solution marquée, suivi en dernier lieu du rajout des volumes de la solution froide. Plutôt que de compléter chaque tube avec le PBS en dernier, ceci présente l'avantage, lorsque le nombre de tubes est élevé, de ne mettre anticorps et antigène en présence qu'au tout dernier moment, et de les faire réagir dans un volume qui n'est pas restreint à quelques gouttes de liquide. Le milieu est homogénéisé en aspirant deux ou trois fois le milieu réactionnel avec le pipetman.

Après avoir bouché les tubes, ceux-ci sont incubés 1 heure à 37°C dans une étuve et laissés reposer de 24 à 48 heures à 4°C (les précipités ont alors le temps de bien se former). Après ce temps, les tubes sont centrifugés pendant 10 min. à 10000 rpm. Les surnageants sont récupérés dans des tubes à essai en veillant à ce que la pointe du pipetman ne soit pas posée sur le culot qui peut être très difficile à voir. Pour être sûr de récupérer toutes les molécules ou complexes solubles dans le surnageant, le culot est repris avec 300 μ l de PBS et les tubes centrifugés à nouveau. A la fin, les surnageants sont rajoutés aux précédents, tandis que les culots sont dissous dans 1 ou 2 gouttes de NaOH 0.1M. Afin que leur volume de comptage soit comparable à celui des surnageants, on rajoute 600 μ l de PBS, le tout est vigoureusement mélangé de façon à récupérer entièrement le culot, et ces volumes sont recueillis dans des tubes à essai. Les tubes contenant surnageants et précipités sont ensuite comptés (compteur γ) et l'activité reliée aux quantités de molécules radioactives apparues dans le précipité ou disparues dans le surnageant.

Remarque: le complexe antigène/anticorps peut également être précipité avec du sulfate d'ammonium $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ 55%.

On pourra noter qu'il y a toujours un précipité, même si aucun Ac* ne réagit avec l'antigène correspondant, car la solution d'Ac* est majoritairement composée d'anticorps froids (il y a au maximum 1 Ac* sur 1200 molécules d'anticorps dans les solutions d'anticorps marqués que nous avons utilisées). Ce fait est confirmé par un test ELISA qui a

été réalisé sur le système Fib/anti-Fib*₃, lequel a révélé un titre équivalent à celui de la solution d'anti-Fib₃ non marquée. Ceci est normal vu le rapport Ac*/Ac non *, mais ce résultat est important tout de même car il confirme l'inocuité de la procédure de marquage elle-même sur la réactivité des anticorps froids qui, même s'ils ne sont pas détectés, interviennent dans le processus global étudié (par exemple en diminuant le nombre de sites de réaction disponibles pour les Ac*, ou dans le phénomène de désorption, par départ de complexes antigène/anticorps).

Parallèlement à ces mesures par comptage de l'activité des solutions, nous aurions pu envisager de déterminer leur absorbance à 280 nm, mais les volumes auraient alors dû être ramenés à 1 ml (volume minimal pour une lecture sur une cuve en quartz) et ceci de façon assez précise pour ne pas avoir d'erreur sur la concentration. Cependant les concentrations mises en jeu dans nos expériences étaient trop faibles, et ces mesures n'ont pu être réalisées.

Chapitre IV

Réactivité d'anticorps vis-à-vis d'antigènes adsorbés sur une surface solide

INTRODUCTION

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à la réactivité d'anticorps vis-à-vis de leur antigène respectif, lorsque celui-ci est adsorbé directement sur une surface de silice nue. A cette fin, nous avons utilisé deux approches complémentaires: la réflectométrie à balayage angulaire et une technique de radiomarquage. Une attention particulière a été apportée à l'évaluation quantitative de tous les effets secondaires, c'est-à-dire les processus autres que celui de la réaction immunologique proprement dite, effets influençant la détermination du rapport de réactivité molaire.

Nous avons choisi d'étudier les systèmes antigène/anticorps suivants: (i) des anticorps d'oeufs de poule (IgY) dirigés contre des immunoglobulines G humaines (IgG), (ii) des anticorps de lapin (anti-IgG) dirigés contre des IgG, et (iii) des anticorps de lapin (anti-Fib) dirigés contre du fibrinogène humain (Fib). Tous les anticorps sont polyclonaux.

Par la technique de radiomarquage, nous avons également déterminé les isothermes des IgG et du fibrinogène sur la surface du tube de verre, et ce dans les mêmes conditions hydrodynamiques sous lesquelles nous avons testé la réaction antigénique.

Cette étude a été présentée lors du 207^{ème} congrès international organisé par l'American Chemical Society (ACS), intitulé: "Proteins at Interfaces", à San Diego (Californie, du 15 au 17 mars 1994), et a été acceptée pour publication dans le livre écrit pour l'occasion (Brash & Horbett Editors), devant paraître au début de l'année 1995. Nous la présentons sous la forme de l'article soumis à l'ACS, constituant la première partie de ce chapitre.

Dans une deuxième partie, nous présentons les résultats obtenus par des expériences d'immunoprécipitation en milieu liquide, lesquelles nous ont permis de confirmer le problème du marquage par la méthode de McFarlane sur la réactivité des anti-Fib.

Enfin, nous proposons différentes solutions qui devraient à l'avenir permettre de pallier ce problème de marquage par l'obtention d'un signal non affecté par celui-ci.

Reactivity of Antibodies on Antigens Adsorbed on Solid Surfaces

Ph. Huetz¹, P. Schaaf^{2,3}, J.-C. Voegel¹, E.K. Mann², B. Miras²,
V. Ball¹, M. Freund⁴ and J.-P. Cazenave⁴

¹Centre de Recherches Odontologiques, INSERM, CJF 92-04
1, Place de l'Hôpital - 67000 Strasbourg, France

²Institut Charles Sadron, CNRS-ULP
6, rue Boussingault - 67083 Strasbourg Cedex, France

³Ecole Européenne des Hautes Etudes des Industries Chimiques
de Strasbourg

1, rue Blaise Pascal, BP 296F, 67008 Strasbourg Cedex, France

⁴Centre Régional de Transfusion Sanguine, INSERM U311
10, rue Spielmann - 67085 Strasbourg Cedex, France

The aim of this study was to analyze the antigen/antibody reactivity after antigen adsorption onto a solid surface. Three systems were evaluated: (i) the IgG/IgY, (ii) the IgG/anti-IgG and the Fib/anti-Fib systems, using either an optical technique (scanning angle reflectometry) or a radiolabeling approach which allows quantifying precisely such side effects as desorption or exchange reactions. With the optical technique, antibody/antigen molar reactivity ratios of 0.8, 1 and ≈ 6 were found for the three systems respectively. The behaviour of the Fib/anti-Fib system was quantitatively analyzed using the radiolabeling technique: desorption of the adsorbed antigen molecules and/or exchange reactions by incoming antibody molecules were precisely evaluated. The reactivity ratios varied strongly, from ≈ 1.5 down to zero, between anti-Fib solutions which were prepared slightly differently, indicating a problem linked to the radiolabeling.

Biological fluids are complex ionic aqueous mixtures of various macromolecules, cells and microorganisms. If we compare the sizes of a protein and a cell for instance, the difference of two or three orders of magnitude between them leads to diffusion coefficients and characteristic transport times which are significantly different. This implies that the first process which takes place when a biological fluid comes into contact with a solid surface is the adsorption of different proteins onto this surface. But even this apparently simple problem is fairly complicated, so that researchers have for years addressed the problem of protein adsorption from single component aqueous solutions. From these numerous investigations, a few general rules emerged: (i) adsorption of proteins onto solid surfaces is not fully reversible, so that thermodynamic laws can seldom be applied and only with great care (1), (ii) the affinity of proteins for a given surface usually increases with the mass of the macromolecules (2), and (iii) for a given protein/surface system, the affinity for the surface is the highest at a pH value close to the isoelectric point of the protein (3).

After having concentrated on single component solutions, the investigations moved towards the understanding of the interactions between a solid surface and a solution containing a mixture of proteins. The additional fundamental process that occurs, beyond those just described, is an exchange mechanism between the adsorbed proteins and the

free macromolecules of the solution, a phenomenon which has been clearly demonstrated by different radiolabeling experiments (4, 5). Out of the reported results, it appears that low molecular weight proteins adsorbed on surfaces are more easily replaced by high molecular weight proteins than the contrary (6, 7). Such an observation has also been reported for synthetic polymers (8, 9).

In this work, we focus on the evaluation of the reactivity of adsorbed antigens with their respective antibodies by two complementary approaches: scanning angle reflectometry and a radiolabeling technique. Particular attention was devoted to a quantitative evaluation of all the side effects influencing the determination of the molar reactivity ratio.

We selected different immunologic systems: (i) antibodies from hen eggs (IgY) directed against human γ -immunoglobulins (IgG), (ii) rabbit antibodies (anti-IgG) directed against IgG, and (iii) rabbit antibodies (anti-Fib) directed against human fibrinogen (Fib). All the antibodies are polyclonal.

Using the radiolabeling technique, we also determined the IgG and Fib isotherms onto the bare surface, for the same hydrodynamical conditions under which we tested the antigenic reaction.

Experimental methods and materials

Three different antigen-antibody pairs were studied. Lyophilized human polyclonal IgG (Mw \approx 150000) was prepared as described in (10) and isolated from blood given by about 1000 donors. The reactivity against this molecule of two different antibodies was considered: purified polyclonal IgY (Mw \approx 170000) isolated from the egg yolk of hens immunized against human IgG, and a solution of purified rabbit anti-IgG (Mw \approx 150000). Human fibrinogen (Mw \approx 340000), of grade L and coagulability $>90\%$, was purchased from Kabi Vitrum (Stockholm, Sweden). We tested the reactivity of a purified rabbit γ IgG (anti-Fib) solution directed against this human Fib. IgG, IgY, anti-IgG and anti-Fib were provided by the Centre Régional de Transfusion Sanguine (Strasbourg).

All protein solutions were prepared in PBS buffer solutions, type 1 or type 2, as indicated in the text. Type 1 PBS buffer was prepared by dissolving 10 mmol of $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 100 mmol of NaCl and 1 mmol of NaN_3 per liter of deionized water (Super Q, Millipore), the pH being adjusted to 7.8 with concentrated NaOH. Type 2 PBS buffer was prepared with 50mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ and 0.15M NaCl, the pH adjusted to 7.5 with 50mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. In all experiments, the buffer was filtered with a Millex GV-0.22 μm filter, and degassed before use. The same buffer was used throughout an experiment for the rinsing steps and to dilute the antigen and antibody solutions.

Silica provided the adsorbing surface in all experiments: one flat surface of a prism made of Herasyl (Heraeus, refractive index $n=1.45718$) for the reflectivity experiments, circular tubing for the radiotracer experiments. In all cases these surfaces were cleaned with sulphochromic acid, and the hydrophilicity verified. Note that adsorption took place under flow conditions for the radiotracer experiments, but non-flow, non-stir conditions for the reflectivity experiments.

The experimental apparatus used in the radiotracer experiments has been described by Boumaza *et al.* (11) and consists of a silica tube of inner diameter 0.17 cm and length 10 cm or 20 cm. Antigens and antibodies were radiolabeled (^{125}I) using a technique adapted from the method of McFarlane (12) in which iodine monochloride is the iodinating agent. Proteins were stored in a concentrated form (0.4 to 1% (w/w)) at -20°C . Just before use, they were quickly thawed at 37°C and diluted in type 2 PBS buffer.

Concentrations were determined by absorbance of the solutions at 280 nm (spectrophotometer Beckman, model 34, Inst. Inc. Fullerton, USA) and specific activities by γ counting (Minimaxi γ , United Technologies, Packard Instrument, USA). The way we calculated the adsorbed protein amounts will be discussed in a precise manner in the section dealing with the Fib/anti-Fib reaction.

Structural information on the interfacial adsorbed layer was evaluated with the help of Scanning Angle Reflectometry (13). This technique is based on the variation, after adsorption, of the reflection coefficient of a light wave polarized in the plane of incidence (p-wave) around the Brewster angle (θ_B). At this angle, about 42.5° for the silica-water interface, the reflectivity of a p-wave would be null for a perfectly abrupt, planar interface (Fresnel interface) (14). The signal here is thus very sensitive to deviations from this interface: for example, any adsorbed film. The light source is a 5 mW He-Ne laser ($\lambda = 632.8$ nm). This light, polarized in the plane of incidence, passes through a silica prism to reflect off the inner, optically polished interface, which forms one face of the experimental cell. The reflected angle is selected with an angular precision of $\pm 0.01\%$. The reflected intensity was recorded at various angles θ around θ_B , after previous equilibration of the silica surface with PBS buffer. These data constituted the reference signal (Figure 1). In order to study the reactivity of the antigen/antibody systems, the antigen solution was then injected, over five minutes, into the cell to replace the buffer. The protein solution was then left in contact with the surface, and the measurement of the reflectivity curve $I(\theta)$ repeated (Figure 1). Each curve required approximately 5 minutes to measure, limiting the adsorption kinetics which can be followed. As adsorption proceeded at the interface, the reflectivity at θ_B increased; the shape of the curve and the position of its minimum also changed (Figure 1). These changes depend on both the thickness and the density of the adsorbed layer, which can therefore be deduced. This evolution was followed for several hours. The solution was then replaced by buffer. The antibody solution was injected similarly. Typical reflectivity curves, taken at various points during the successive adsorption of antigen and antibody, are shown in Figure 1, along with the fits to these curves given by a simple model of the interface.

We adopted for the interface the common model of a homogeneous, isotropic layer defined by a thickness L_0 and a mean refractive index n (14). The actual protein layer is not homogeneous. In particular, protein molecules may adsorb in both the "end-on" and "side-on" positions, with possible conformational changes upon or after adsorption. L_0 is thus an optical average over the different molecular configurations occurring in the layer. The mean refractive index n of the layer is related to the protein concentration c within this layer by the known refractive index increment dn/dc for the protein with respect to the solvent ($dn/dc = 0.18$ cm³/g for Fib, (15)). The total adsorbed quantity is then given by the product $\Delta n \cdot L_0$ (with Δn the refractive index difference between layer and solvent).

All experiments were performed at room temperature ($22 \pm 2^\circ\text{C}$).

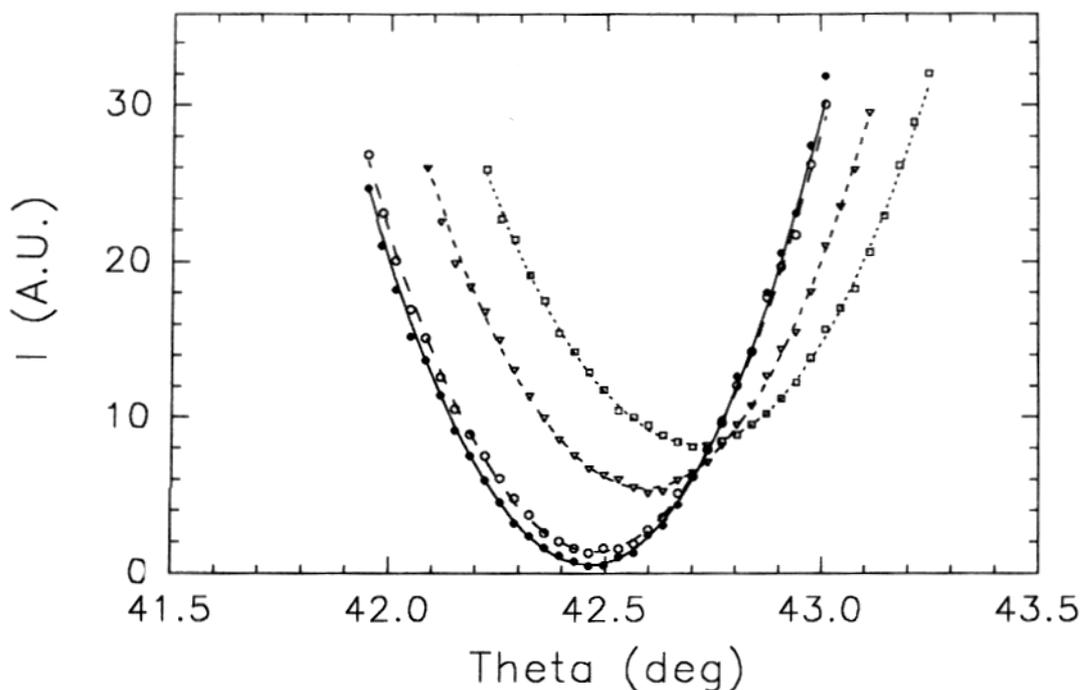


Fig.1: SAR: Reflected intensity (arbitrary units) as a function of angle, taken at various points during the successive adsorption of fibrinogen and its antibody.

• : Before adsorption (Fresnel curve); ◦ : after 100 min of 0.05% (w/w) fibrinogen adsorption; ▽ : after 60 min of 0.01% (w/w) anti-fibrinogen reaction; ◻ : after 800 min of anti-Fib reaction.

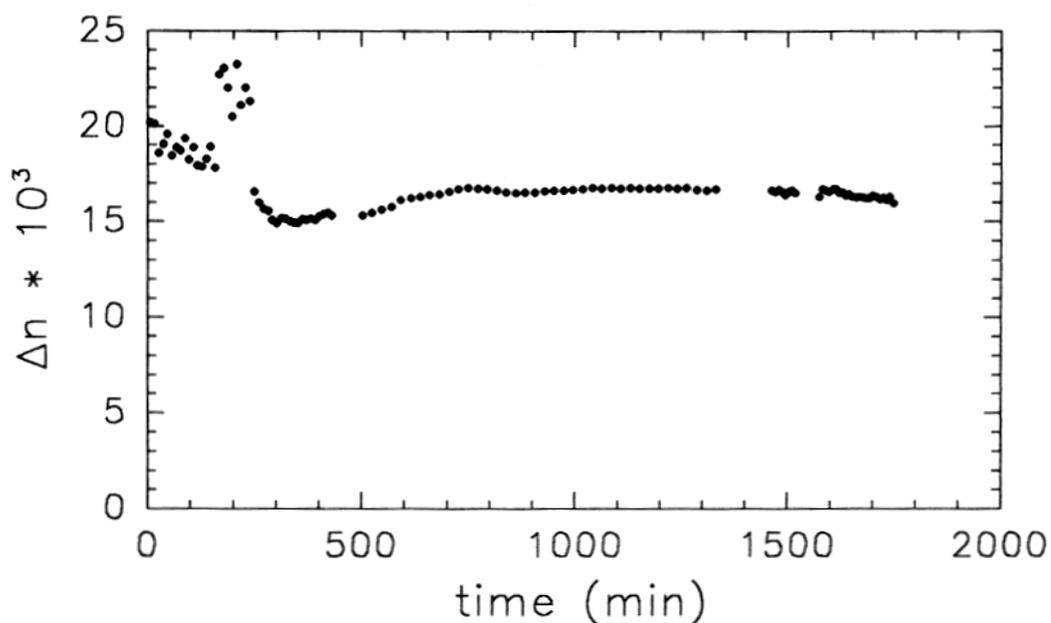


Fig.2a: SAR: Variation of the refractive indice (Δn) with time (0-160 min: Fib (0.05% (w/w)), 160-230 min: PBS, 230-1800 min: anti-Fib (0.01% (w/w))).

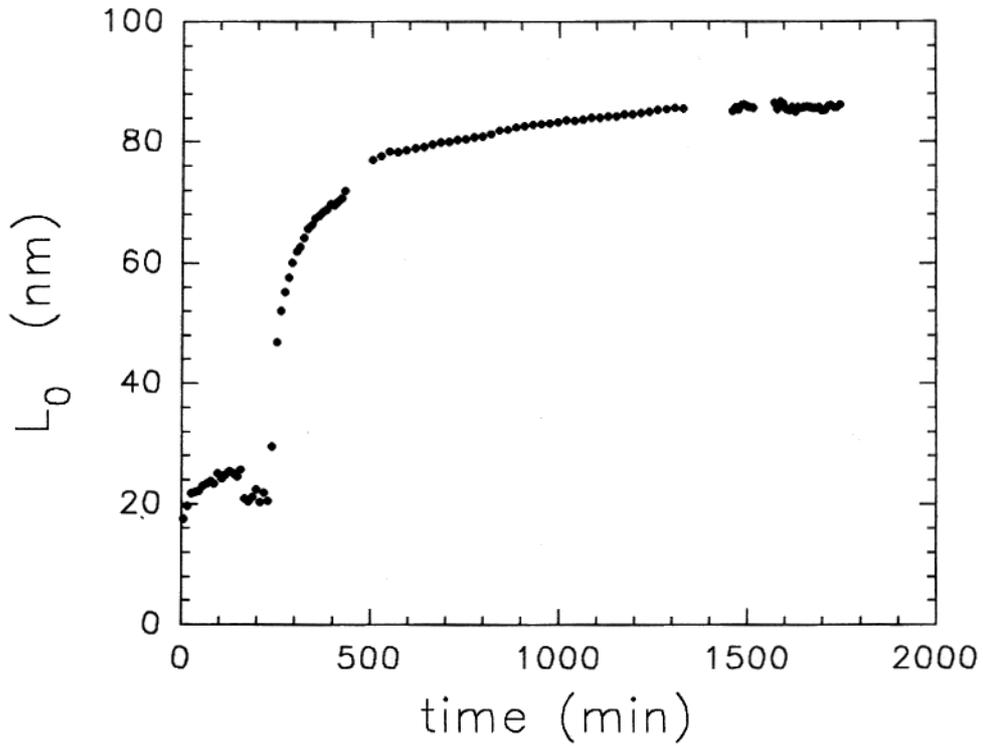


Fig.2b: SAR: Variation of the layer thickness (L_0) with time (same conditions as in Fig.2a).

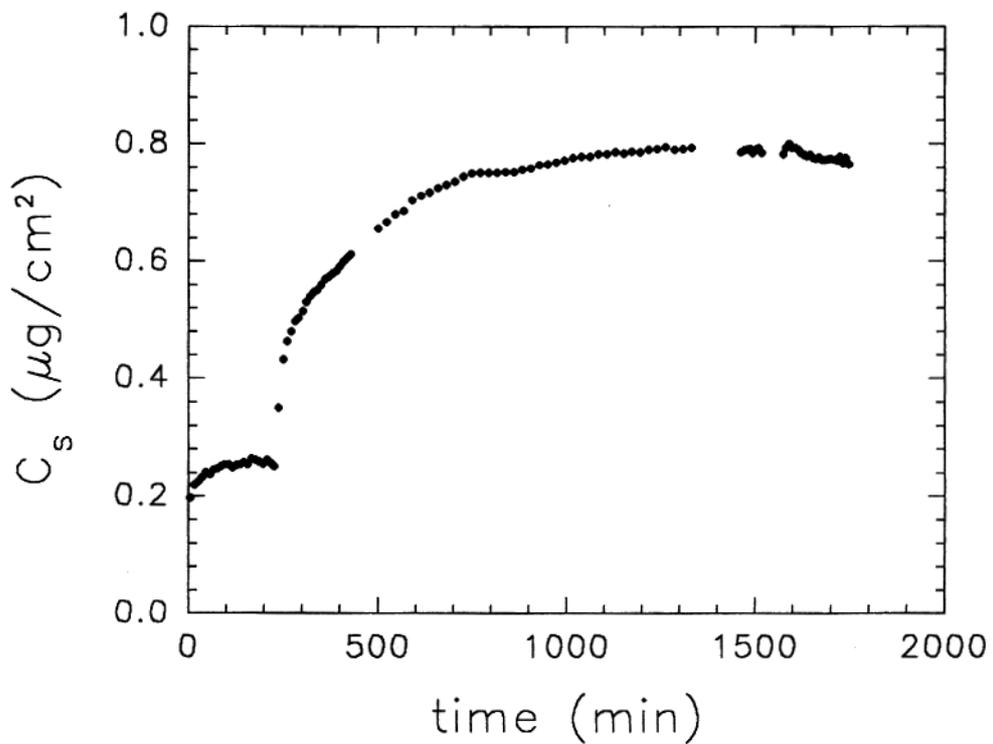


Fig.2c: SAR: Variation of the surface concentration ($\Delta n \cdot L_0$) with time (same conditions as in Fig.2a).

Results and discussion

Layer Structure Determination by Scanning Angle Reflectometry (SAR). The concentration of the antigen was set at 0.05% (w/w), unless otherwise indicated, in order to attain saturation of the surface (see isotherms below), whereas the antibody concentration was set at 0.01% (w/w). The total adsorbed quantity is determined with a precision of the order of 10%. The thickness L_0 is reproducible within about 20% from one experiment to another. On the other hand, the total adsorbed quantity, $\Delta n \cdot L_0$, varies. This quantity adsorbed is known to depend sensitively on the state of the surface (16). The results presented here are preliminary in the sense that only one or two trials have been performed for each antigen/antibody pair.

The IgG/IgY System. Human polyclonal IgG was reconstituted in type 1 buffer and injected. The reflected intensity led to a value $L_0 = 20$ nm and a refractive index difference $\Delta n = 2.2 \cdot 10^{-2}$. The amount of adsorbed IgG was then calculated by assuming the refractive index increment dn/dc to be the same as for fibrinogen ($0.18 \text{ cm}^3/\text{g}$). The adsorbed amount was found to be equal to $0.25 \text{ }\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (Exp. 1a, Table I, p.76). The width of the layer is close to the “end-on” dimension of the IgG molecule (of dimensions $23.5 \times 4.4 \times 4.4 \text{ nm}^3$, (17)). The surface concentration corresponds to total coverage of 15% if every molecule is in this end-on position, or 80% for a “side-on” position, which should be compared to the maximum, or “jamming-limit”, coverage of about 55% predicted by simple adsorption models like “Random Sequential Adsorption” (RSA) model (18).

We then investigated the reactivity of the adsorbed IgG molecules with purified polyclonal IgY ($M_w \approx 170000$). We found that a significant amount of IgY from the 0.01% (w/w) IgY solution reacted with the IgG layer: the measurement of the reflectivity led to total protein layer of $0.48 \text{ }\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Withdrawing the adsorbed amount relative to the simple IgG layer, one obtains that IgY molecules are fixed at a surface concentration $\Delta\Gamma_{\text{IgY}} = \Gamma_{\text{Tot}} - \Gamma_{\text{IgG}} = 0.23 \text{ }\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Taking into account the molecular weight of the two species, the IgG/IgY reactivity is in a ratio of 1:0.8.

The IgG/anti-IgG System. The human IgG solution was prepared in type 2 PBS buffer. We again obtained $L_0 = 20$ nm for the IgG layer, but a somewhat higher density for this trial, with $\Delta n = 4.0 \cdot 10^{-2}$. This implies protein adsorption of $0.45 \text{ }\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (Exp. 1b, Table I, p.76). This layer was put in contact with a 0.01% (w/w) solution of purified rabbit anti-IgG ($M_w \approx 150000$). The amount of adsorbed anti-IgG was $0.40 \text{ }\mu\text{g}/\text{cm}^2$; again, the antibody reacts in an approximately 1:1 ratio with the IgG on the surface.

An IgG solution, at 0.01% (w/w), was again introduced into the cell after rinsing. The total layer thickness increases immediately by 4 nm, suggesting that accessible reactive sites remain on the antibody after adsorption. The relatively small additional layer thickness suggests that the additional antigen is either predominately in the side-on position or considerably intercalated in the antibody layer. The quantity of IgG adsorbed at the surface increases slowly, over about 15 hours, to $0.05 \text{ }\mu\text{g}/\text{cm}^2$; this corresponds to 0.13 antigen per antibody already adsorbed.

**Table I. Amounts of adsorbed antigen (Γ)
and immobilized rabbit antibodies ($\Delta\Gamma$, raw signals).**

Exp.	Antigen	Bulk conc. (% (w/w))	L_0 (nm)	Γ ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$)	Antibody (0.01% (w/w))	ΔL_0 (nm)	$\Delta\Gamma$ ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$)
1a	IgG	0.050	20	0.25	IgY	---	0.23
1b	IgG	0.050	20	0.45	anti-IgG	13	0.40
1c	Fib	0.050	22	0.25	anti-Fib	63	0.52
2a	Fib*	0.010		0.32	anti-Fib ₁ *		0.30
2b	Fib*	0.010		0.40	anti-Fib ₁ *		0.27
2c	Fib	0.010		---	anti-IgG*		0.084
2d	Fib	0.010		---	anti-Fib ₂ *		0.076
2e	Fib	0.057		---	anti-Fib ₂ *		0.046
2f	Fib	0.056		---	anti-Fib ₂ *		0.040
2g	Fib	0.010		---	anti-Fib ₃ *		0.16
2h	Fib	0.050		---	anti-Fib ₃ *		0.11
2i	Fib*	0.011		0.29	anti-Fib ₃		-0.03

Experiments 1a-c: SAR, experiments 2a-i: radiotracer technique. Corresponding thicknesses are given for SAR measurements (L_0 , ΔL_0). For experiment 2i, the quantity of Fib desorbed by unlabeled anti-Fib molecules was evaluated (thus the negative value). Indices of the different anti-Fib are related to their origin (see text explanations). (*) means that corresponding proteins were labeled.

The Fib/anti-Fib System. A 0.05% (w/w) solution of Fib prepared in type 2 buffer was injected. The layer thickness, refractive index, and total adsorbed quantity as they evolve in time after introduction of the protein are given in Figures 2a-c for a typical experiment. The values saturate at $L_0 = 22$ nm and $\Delta n = 1.8 \cdot 10^{-2}$ for a total adsorbed amount of $0.25 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (Exp. 1c, Table I). The value of L_0 is intermediate between the end-on and side-on dimensions of the molecule (of dimensions $45 \times 9 \times 6$ nm³, (19)); probably both configurations are present in the layer, to give the averaged 22 nm value. This value is very close to that found in earlier experiments (16) at similar protein concentrations. The density would correspond to a coverage of about 20% in the "end-on" position and 120% in the "side-on" position. Both the thickness and the density imply that a significant fraction of the protein molecules approach the "end-on" position under the conditions of this experiment. A range of different layer thicknesses have been observed depending on the substrate (16, 20).

The surface was then rinsed with buffer solution. As seen in Figures 2a-c, the protein layer appears to rearrange to become more compact (both thinner and more dense, while the total adsorbed quantity remains unchanged) during this process. This compactification was observed consistently in adsorbed protein layers. It may represent a shift in the proportions of "end-on" to "side-on" positions for the molecules adsorbed.

A purified rabbit γ IgG (anti-Fib) solution directed against human fibrinogen was then injected, and led to the values $L_0 = 85$ nm, $\Delta n = 1.6 \cdot 10^{-2}$ for both layers, i.e. $\Delta\Gamma = 0.52$ $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ of anti-Fib. Considering the molecular weight of the two species, the reactivity Fib/anti-Fib is thus about 1:5. A second similar experiment found a ratio of 1:8. Such large ratios suggest aggregation of the anti-Fib molecules in solution.

We have seen that the method of scanning angle reflectometry can give information about the total quantity of adsorbed molecules and the layer thickness. This can be used to estimate the reaction between the antibody and its antigen adsorbed on the surface. Note however that it cannot distinguish between the different species. In particular, any departure of the initially adsorbed antigen will remain unaccounted for.

Radiotracer Experiments.

Isotherms of Human Fibrinogen and γ IgG. We present the isotherms of human Fib and IgG in Figures 3 and 4.

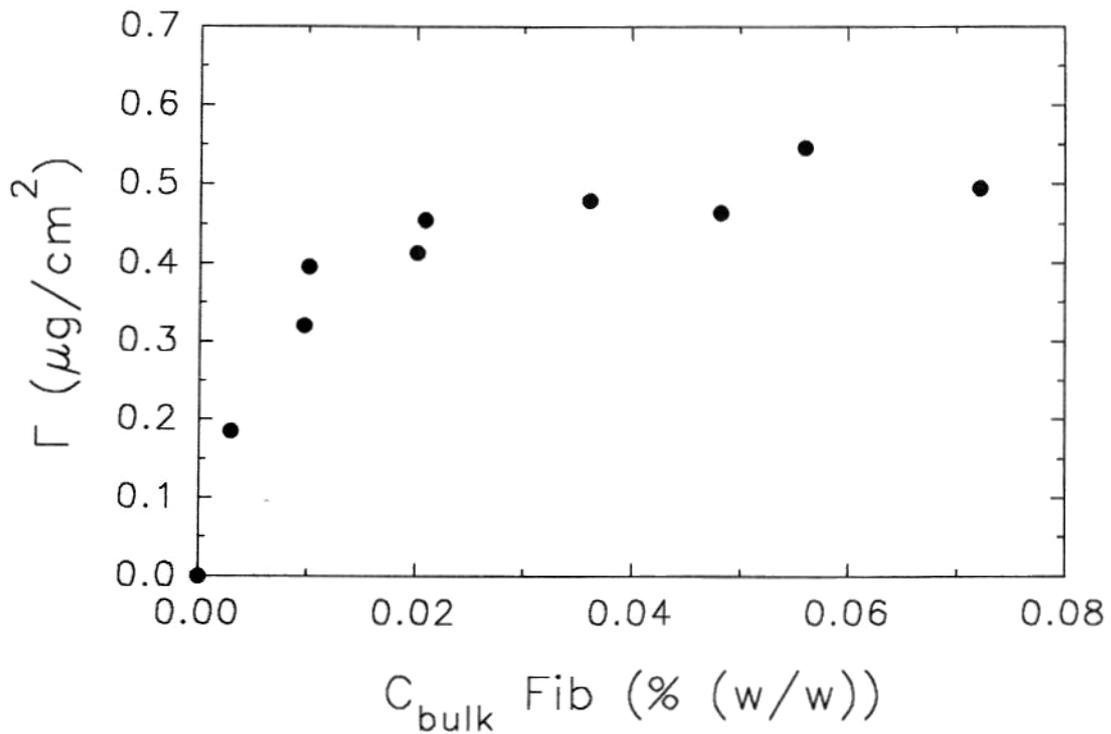


Fig.3: Adsorption isotherm of human Fib onto silica at a flow rate of $2.4 \text{ cm}^3 \cdot \text{h}^{-1}$ during 3.45 h (followed by a PBS rinse of 1.30 h at $4.8 \text{ cm}^3 \cdot \text{h}^{-1}$). Each point represents an independent experiment.

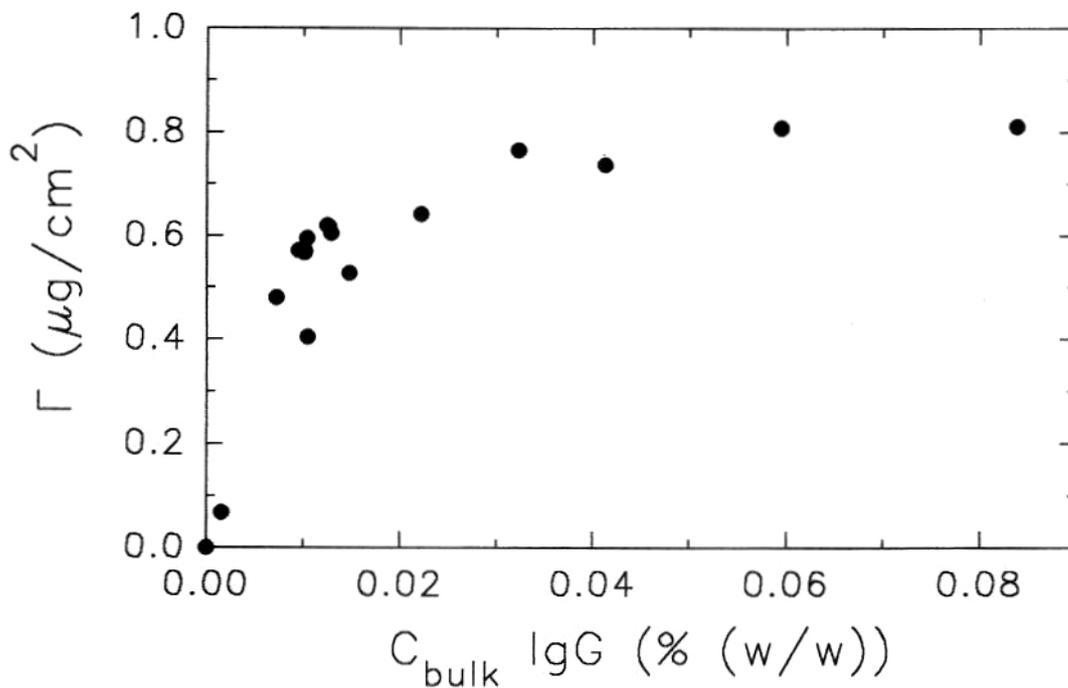


Fig.4: Adsorption isotherm of human IgG onto silica at a flow rate of $2.4 \text{ cm}^3 \cdot \text{h}^{-1}$ during 4.2 h (followed by a PBS rinse of 1.23 h at $4.8 \text{ cm}^3 \cdot \text{h}^{-1}$).

The Fib isotherm was realized by injection of labeled Fib, in type 2 PBS buffer, at a flow rate of $2.4 \text{ cm}^3 \cdot \text{h}^{-1}$ during 3.45 h, followed by a PBS rinse of 1.30 h at $4.8 \text{ cm}^3 \cdot \text{h}^{-1}$ (same conditions as those used in the Fib/anti-Fib reaction studies).

The plateau value ($\approx 0.50 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$) would correspond to a coverage of about 45% for an "end-on" and of 250% for a "side-on" configuration if one considers a parallelepiped of dimensions $45 \times 9 \times 6 \text{ nm}^3$ for the Fib molecule. One would thus conjecture that the molecules are mainly (if not exclusively) fixed in an "end-on" configuration. The coverage in this position is in reasonable agreement with that expected in the jamming limit for the RSA model.

The γIgG isotherm was realized under slightly different conditions than for the Fib one: the γIgG molecules were adsorbed on the tube at the same $fr = 2.4 \text{ cm}^3 \cdot \text{h}^{-1}$ but during 4.2 h, followed by a PBS rinse of 1.23 h at $4.8 \text{ cm}^3 \cdot \text{h}^{-1}$.

The plateau was reached at a bulk concentration of about 0.050% (w/w) with a surface concentration of $\approx 0.8 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$. This corresponds to a coverage of $\approx 49\%$ for an "end-on" and 260% for a "side-on" configuration for ellipsoid dimensions for the IgG molecule of $23.5 \times 4.4 \times 4.4 \text{ nm}^3$. Thus, the same conclusions can be drawn as for the Fib molecules.

If we compare the values of the Γ obtained on the prism and the tube surfaces, we notice that, for the Fib as well as for the IgG molecules (see Table I and isotherms), they vary by a factor of two for identical bulk concentrations. We see that it is very difficult to obtain reproducible values for adsorbed quantities and to compare them between two different surfaces (here both made of hydrophilic silica): hence, the state of the surface influences crucially the adsorption.

Study of the Fib/anti-Fib Reaction. The concentration of the antigen solution was fixed at either 0.05 or 0.01% (w/w), yielding surface concentrations near saturation and at about three-fourths saturation respectively. The antibody solution was constantly 0.01% (w/w). An experiment starts (step 1, Figure 5) with injection of type 2 PBS buffer into the tube previously cleaned with sulphochromic acid. This step is followed (step 2, Figure 5) by injection of ^{125}I labeled Fib until the radioactivity stays approximately constant over a period of 30 min, indicating that the system has reached equilibrium. We chose for this purpose an adsorption time (t) of 3.45 h at a flow rate of $2.4 \text{ cm}^3 \cdot \text{h}^{-1}$. In step 3, the solution is replaced by buffer (rinse of 1.30 h at a flow rate of $4.8 \text{ cm}^3 \cdot \text{h}^{-1}$) and the increase (Δh) in activity at the end of this step is directly related to the amount of adsorbed antigen. The reactivity of the anti-Fib on the adsorbed molecules was then evaluated by flowing the labeled antibody solution ($t = 2.45 \text{ h}$, flow rate = $2.4 \text{ cm}^3 \cdot \text{h}^{-1}$). A rough estimate of the protein uptake due to the antigen/antibody reaction was evaluated by $\Delta h' - \Delta h$ after a PBS rinse of $t = 2.35 \text{ h}$ at a flow rate of $2.4 \text{ cm}^3 \cdot \text{h}^{-1}$ (steps 4 and 5, Figure 5).

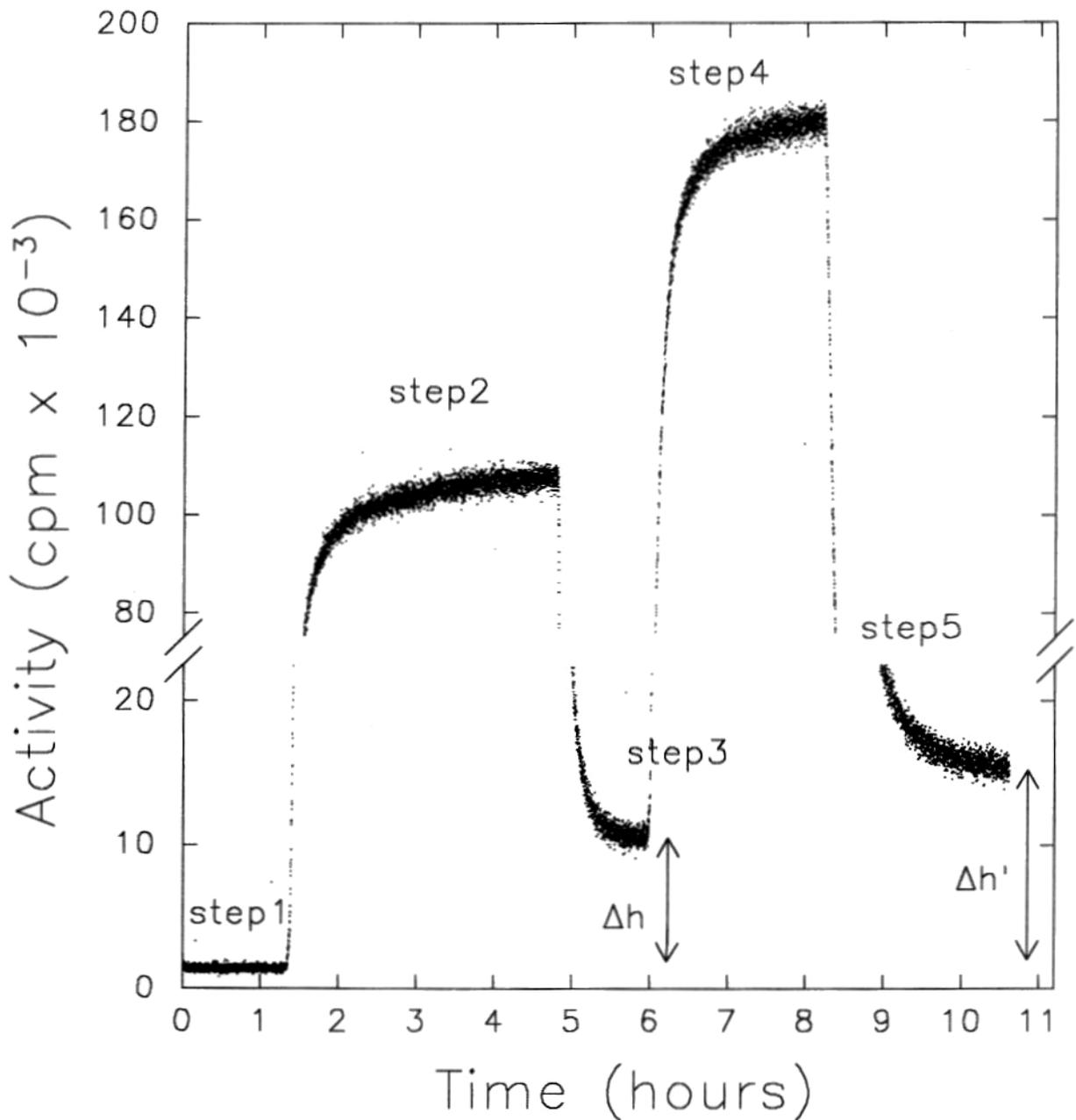


Fig. 5: Evolution of the detected radioactivity versus time in a typical Fib adsorption experiment, followed by the reaction with anti-Fib molecules.

Step 1: PBS buffer injection; step 2: labeled Fib injection; step 3: replacement of the protein solution by pure PBS buffer; step 4: labeled anti-Fib injection; step 5: replacement of the anti-Fib solution by pure PBS buffer.

Δh : increase in activity related to the amount of adsorbed Fib,
 $\Delta h'$: increase in activity proportional to the amount of adsorbed Fib and anti-Fib.

Quantitative analysis requires previous *in situ* calibration in order to relate the observed counts to the quantity of adsorbed protein. Two methods can be used. Method 1 starts with the passivation of the inner tube surface: a solution of concentrated fibrinogen (0.1% (w/w)) is injected and adsorption is allowed to proceed during ≈ 1 hour. The solution is then replaced by PBS buffer and the tube is heated during 10 min at $\approx 60^\circ\text{C}$, the temperature at which the Fib undergoes a thermal denaturation (21). A radiolabeled protein solution of known concentration and specific activity is then injected and, since under these conditions no adsorption occurs, the radioactivity at the end of step 3 is equal to that of step 1 (background noise), and the increase in activity in step 2 is due only to the known amount of the protein present in the bulk solution. In method 2, for each adsorption experiment one measures the difference of the signal between step 2 (just before the rinsing step) and step 3 (at the end of the PBS rinse); this corresponds approximately to the radioactivity due to the protein amount present in the bulk solution (11). This method has the disadvantage of being affected by the desorption of any weakly bound protein layer during the rinsing step, unlike method 1. On the other hand, it presents the advantage that calibration is made for each individual experiment, allowing for such intrinsic apparatus variations as those linked to the tube removal and replacement for cleaning. Both methods lead to an effective counting tube length (L_{eff}), calculated by writing the equality between the ratio of the activity due to the bulk protein to the specific activity at the same reference date (which is the amount effectively “seen” by the NaI detector), and the product $c\pi r^2 L_{\text{eff}}$, where c is the protein solution concentration determined by absorbance at 280 nm and r the tube radius ($r = 0.085$ cm). L_{eff} varied between 4 and 5 cm, and the precision of this limits the precision of the estimation of the surface concentration (Γ) of the adsorbed protein layer. We compared the Γ of the adsorbed protein amounts calculated with the help of L_{eff} obtained by both methods. The approximately $0.03 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ difference between these values was nearly constant; but molar reactivity ratios were unaffected. With no obvious difference in the quality of the two methods, we chose to give all the values evaluated with method 1.

The labeled Fib, and later the labeled anti-Fib, were injected at a bulk concentration of 0.010% (w/w). The immobilized quantities are given in Table I. It is natural to attribute the change in the signal ($\Delta\Gamma = \Delta h' - \Delta h$) to the reaction of the adsorbed Fib molecules with the incoming anti-Fib ones. However, two other processes must be taken into account: (i) the desorption of labeled Fib molecules, whether directly or in exchange for the incoming anti-Fib molecules or as Fib/anti-Fib complexes and (ii) direct adsorption and/or adsorption by exchange of the anti-Fib molecules. The consequence of the first process is a decrease of the interfacial concentration of the initial adsorbed Fib layer, whereas the second implies that only some fraction of the anti-Fib molecules present at the surface are actually in direct reaction with the first adsorbed layer.

Two separate types of experiments, realized under the same experimental conditions as before but using selective labeling, quantifies these two contributions. To test for contribution (i), only the Fib molecules were labeled (Exp. 2i, Table I, p.76). The Fib concentration was found to decrease by $\Delta\Gamma = -0.03 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ after the unlabeled anti-Fib was introduced. To test for contribution (ii), the adsorption of unlabeled Fib was followed by the injection of labeled rabbit γ -IgG which did not react with the Fib (anti-IgG*, Exp. 2c, Table I, p.76). The observed value of $\Delta\Gamma$, $\approx 0.08 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$, was then due to other processes, whether direct adsorption or an exchange process.

If one takes into account these two contributions, molar reactivity ratios of 1.7 and 1.2 were found for experiments 2a and 2b respectively. Ratios above unity are not

unexpected, since the polyclonal antibodies may react with different epitopes of the same antigen molecule.

In order to verify the reproducibility of these molar reactivity ratios, we repeated the experiments with two other stock solutions of purified anti-Fib. The results of these experiments, with what will be called solutions 2 and 3, as well as those with solution 1 as already discussed, are presented in Table I (with the preparation of anti-Fib molecules denoted by the indice). These three solutions were issued from three different purifications of the same crude plasma of rabbits immunized against human Fib. The proportion of labeled proteins was increased in solution 2, by doubling the quantity of NaI* added to the protein in the reaction medium, in an attempt to increase the signal at the interface (the specific activity was $\approx 20 \cdot 10^6$ cpm/mg compared to $\approx 7.5 \cdot 10^6$ and $4.5 \cdot 10^6$ cpm/mg for solutions 1 and 3 respectively). However, ELISA tests showed that while solutions 1 and 3 had about the same titer, i.e. the same reactivity against Fib, the reactivity for solution 2 was two to three times lower.

The results are as follows: (i) with anti-Fib*₂ molecules, we see (exp. 2d, Table I, p.76) that the signal is of the same order of magnitude as that obtained in experiment 2c, with anti-IgG* molecules. No significant reaction occurred in this case. This was confirmed by two similar experiments for which the Fib solution was injected at higher bulk concentrations ($\approx 0.056\%$ (w/w), exps. 2e, 2f, Table I). If the anti-Fib*₂ molecules (same bulk concentration) had reacted proportionally with the adsorbed Fib, the signal would have been significantly higher. The fixed amounts were in fact slightly lower than for experiment 2e: when the Fib is near saturation, direct adsorption of antibodies is less important.

(ii) With anti-Fib*₃ molecules, we performed two experiments in which the (unlabeled) Fib solution was injected at 0.010% (w/w) (exp. 2g) and 0.050% (w/w) (exp. 2h, Table I, p.76). The anti-Fib*₃ signals led to $\Delta\Gamma$ of 0.16 and 0.11 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$, respectively.

The advantage of the use of unlabeled antigen molecules is that all subsequent signal is entirely due to antibody adsorption or reaction; the desorption of labeled antigen molecules can, and has, led to lower total signals after than before antibody adsorption. However, without labeling, the surface concentration of the antigen molecule must be taken from the isotherm, and the value is less precise than the one directly obtained in the same experiment with both radiolabeled antigen and antibody molecules (from this isotherm, Figure 3, bulk solutions of 0.010% and 0.050% correspond to a Γ of 0.35 and 0.50 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$, respectively). On the other hand, if both molecules are labeled, it is important to have an estimation of the $\Delta\Gamma$ of the antigen at the end of step 5 in order to appreciate this contribution in the resulting signal, even if the conclusion is that it is negligible.

Again, the effect of adsorption processes unrelated to the direct antigen-antibody reaction must be taken into account. For experiment 2g, this is given by experiments 2c, 2d and 2i (Fib at a bulk concentration of 0.01%), and for experiment 2h, by experiments 2e and 2f (higher Fib bulk concentration). Molar reactivity ratios of mean values 0.56 and 0.30 were then found for experiments 2g and 2h respectively, quite different from the results obtained with the first anti-Fib preparation (exps. 2a and 2b).

These results indicate that a real problem exists linked to the radiolabeling itself. We have shown that for the anti-Fib*₁ and anti-Fib*₃ molecules, prepared from solutions 1 and 3 exhibiting the same reactivity levels in ELISA tests and with identical ¹²⁵I activities, the molar reactivity ratio is about three times higher for anti-Fib*₁ compared to anti-Fib*₃ molecules, whereas for the anti-Fib*₂, 2 to 3 times less reactive (ELISA) and with a labeling ≈ 4 times stronger, a total absence of reactivity could be shown. The influence of

the radiolabeling on the activity of rabbit antibodies was qualitatively confirmed by batch immunologic experiments performed on the systems Fib/anti-Fib₂ and Fib/anti-Fib₃. These experiments were liquid phase immunoprecipitation tests. In one set of these tests, the antigen was labeled whereas the antibody was not, inverting the labeling for the other test. We then varied the molar ratios Fib/anti-Fib and incubated the mixtures at 37°C during 1 hour. If the molecules react, they form an "immunologic network" that precipitates when antigens and antibodies are at equivalence. After one or two days at 4°C, the solutions were then centrifuged and the radioactivity of the precipitate and the supernatant measured. The labeled molecules were of course the same as those used preceedingly in the tube experiments.

We found that for the system Fib/anti-Fib₂, with the anti-Fib₂ labeled, no radioactivity appears in the precipitate, whereas all the initial activity remains in the supernatant. This means that in the precipitate, we have only unlabeled Fib/anti-Fib₂ complexes, the labeled/unlabeled ratio of the anti-Fib₂ molecules being here of about 1:1200. For the system Fib/anti-Fib₃, about 5% of the initial anti-Fib₃ is found in the precipitate, and correlatively disappears in the supernatant. For both systems, when the Fib is labeled and the anti-Fib not, all the initial radioactivity appears in the precipitate and disappears in the supernatant, the reaction being then total between the antigen and antibody molecules.

These results are in good agreement with those observed in the tube experiments. They suggest that the rabbit antibody is very sensitive to the radiolabeling method employed, and from one labeling to another the reactivity is more or less modified.

This observation is supported by the works of Pressman and Sternberger (22), and Koshland (23, 24), who demonstrated that extensive iodination (by the same McFarlane-derived method) destroys the precipitating capacity of a rabbit antibody, whose active site contains an iodine-reactive residue. Iodination thus reduces the binding capacity by a direct attack at the active site, by substitution or disubstitution in the phenolic group of a tyrosyl residue, which is the more sensitive to this attack, or on both the nitrogen and carbon atoms of the imidazole ring of a histidyl residue. Other groups may also be subjected in a γ -globulin to a chemical modification which could affect its reactivity, such as oxidation of cysteinyl and cystinyl residues to cysteic acid, methionyl residues to the corresponding sulfoxide or sulfone, or tryptophanyl residues. These changes could enhance the rigidity of the arms of the γ IgG by inducing a steric hindrance at the angle region of the Fab fragments, or result in a local rupture of its 3-dimensional structure, resulting in a partial denaturation and a correlated inactivation.

Another indication of this effect due to the ¹²⁵I radiolabeling is brought by a complementary study concerning the reactivity of the system IgG/anti-IgG with a latex particle test. Unlabeled IgG were adsorbed under saturation conditions ($\Gamma_{\max} = 0.54 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) on latex particles 790 nm in diameter. After elimination of the free IgG molecules in solution by successive centrifugations and redispersions with buffer, a solution of $\approx 0.030\%$ (w/w) labeled anti-IgG (of high specific activity $\approx 12.5\cdot 10^6$ cpm/mg) was brought into contact with the latex-IgG complexes and the reaction allowed to take place during 2 hours under gentle agitation. The reaction was stopped by centrifugation, and a measure of the activity of the supernatant led, by depletion, to the amount of anti-IgG* fixed on the surface. This quantity ($0.11 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) was found to be equal to the quantity of IgG adsorbed on these latex particles in experiments where we studied the homogeneous exchange mechanism IgG/IgG* under the same experimental conditions ($\Gamma_{\text{IgG}^*} = 0.13 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) (25). Such an observation cannot be imputed to an eventual bad orientation of the

antigen epitopes, as the antibody is polyclonal and recognizes a variety of determinants on the antigen molecule. Thus, this demonstrates that no reaction between IgG and the labeled anti-IgG occurred. Again, an effect of the radiolabeling on the activity of the anti-IgG may be implied.

However, these effects do not concern the adsorption properties of the protein molecules on which we worked. Indeed, this has been demonstrated by Schmitt *et al.* (26), and is true in so far as less than one atom of iodine is statistically present per molecule, which was always the case in the radiolabelings we made (never higher as ≈ 1 per 200 molecules).

Conclusion

The Scanning Angle Reflectometry technique offers the possibility of analyzing the thickness variations of an adsorbed protein layer, and is thus well adapted to a qualitative evaluation of the reactivity between biological macromolecules. Hence, if an antibody reacts with an antigen, the evolution of the signal demonstrates it clearly and unambiguously. Such qualitative information is not immediately accessible with the radiotracer technique. However, to quantify the different side reactions (desorption of Fib and direct adsorption or exchange mechanisms of anti-Fib), which cannot be omitted in a precise estimation of the molar reactivity ratios, the radiotracer experiments are perfectly adapted and the adsorbed quantities are well evaluated.

The radiolabeling technique highlighted the unforeseen problem of the ^{125}I labeling method used in this work with regard to the reactivity of rabbit antibodies. As this problem is linked to the presence of aminoacids which react covalently with ^{125}I atoms on the Fab fragment of the antibody, i.e. the epitope binding site, an antibody which belongs to a different species may not be affected by this kind of labeling technique. Nevertheless, a verification of the reactive ability of the labeled antibody towards its antigen in solution, e.g. with a liquid phase immunoprecipitation test, is essential whatever the chosen labeling technique or the origin of the antibody. Such an information is not given by an ELISA test, since the proportion of labeled molecules is generally low compared to the unlabeled ones: only the “ cold ” antibodies which react are detected.

From this point of view, reflectometry has the appreciable advantage that one can work with unaltered native molecules.

The tube geometry is a good model to mimic what occurs in biological systems, i.e. blood vessels. The sensitivity could be enhanced by increasing its surface, e.g. with a system composed of hollow silica capillaries (27). The possibility of studying molecular mechanisms under flow, i.e. precisely defined hydrodynamic conditions, is an appreciable advantage. This is in contrast with the SAR experiments as performed here, under static conditions. The kinetics of adsorption are certainly different: such factors as the relative frequency of side-on and end-on adsorption may be affected.

By combining the SAR and radiotracer techniques, we obtain different kinds of information that lead to a better comprehension and evaluation of the reactivity phenomena occurring between biological macromolecules. The SAR technique gives additional structural information, while the selective labeling of the radiotracer techniques allows one to distinguish between processes involving the different molecules.

Our study is a basis for further studies of the reactivity of antibodies with antigens adsorbed on an existing protein layer. Lutanie *et al.* (28) have observed a complete loss of reactivity of IgY with IgG adsorbed on a human albumin layer. To be generalized, this result should be verified on different types of surfaces and with a variety of immunological systems. The nature of the first adsorbed layer certainly plays a major role in this mechanism. As exchange processes cannot be detected by SAR, the radiotracer technique

is of great utility for such an investigation. Using the controls described here, one can avoid misleading results.

Acknowledgments

One of the authors, Ph. H., thanks the Faculty of Odontology of Strasbourg for financial support.

Literature Cited

1. Lyklema, J. *Colloids and Surfaces* **1984**, *10*, 33.
2. Wojciechowski, P.; ten Hove, P.; Brash, J.L. *J. Colloid Interface Sci.* **1986**, *111*, 455.
3. Norde, W.; Lyklema, J. *J. Colloid Interface Sci.* **1978**, *66*, 257.
4. Brash, J.L.; Uniyal, S.; Pusineri, C.; Schmitt, A. *J. Colloid Interface Sci.* **1983**, *95*, 28.
5. Voegel, J.-C.; de Baillou, N.; Schmitt, A. *Colloids and Surfaces* **1985**, *16*, 289.
6. Absolom, D.R.; Zingg, W.; Neumann, A.W. *J. Biomed. Mat. Res.* **1987**, *21*, 161.
7. Norde, W.; Favier, J.P. *Colloids and Surfaces* **1992**, *65*, 17.
8. Pefferkorn, E.; Carroy, A.; Varoqui, R. *J. Polym. Sci. Polym. Phys. Ed.* **1983**, *23*, 1997.
9. De Gennes, P.-G. *C. R. Acad. Sci. Paris II* **1985**, *301*, 1399.
10. McKinney, M.M.; Parkinson, A. *J. Immunol. Methods* **1987**, *96*, 271.
11. Boumaza, F.; Déjardin, Ph.; Yan, F.; Bauduin, F.; Holl, Y. *Biophys. Chem.* **1992**, *42*, 87.
12. McFarlane, A.S. *Nature* **1958**, *182*, 53.
13. Schaaf, P.; Déjardin, Ph.; Schmitt, A. *Rev. Phys. Appl.* **1986**, *21*, 741.
14. Azzam, R.M.A.; Bashara, N.M.; in *Ellipsometry and Polarized Light* (North Holland, Amsterdam), 1977.
15. De Feijter, J.A.; Benjamins, J.; Veer, F.A. *Biopolymers* **1978**, *17*, 1759.
16. Schaaf, P.; Déjardin, Ph.; Schmitt A. *Langmuir* **1987**, *3*, 1131.
17. Quash, G.A.; Rodwell, J.D.; in *Covalently Modified Antigens and Antibodies in Diagnosis and Therapy*; Marcel Dekker, Inc.: New York, Basel, 1989; p. 156.
18. Feder, J. *J. Theor. Biol.* **1980**, *87*, 237.
19. Doolittle, R.F. *Sci. Amer.* **1981**, *245*, 126.
20. Cuypers, P.A.; Hermens, W.T.; Hemker, H.C. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1977**, *283*, 77.
21. De Baillou, N. *Thesis*, University of Strasbourg, 1983.
22. Pressman, D.; Sternberger, L.A. *J. Immunol.* **1951**, *66*, 609.
23. Koshland, M.E.; Englberger, F.M.; Erwin, M.J.; Gaddone, S.M. *J. Biol. Chem.* **1963**, *238*, 1343.
24. Koshland, M.E.; Englberger, F.M.; Gaddone, S.M. *J. Biol. Chem.* **1963**, *238*, 1349.
25. Ball, V.; Huetz, Ph.; Elaïssari, A.; Cazenave, J.-P.; Voegel, J.-C.; Schaaf, P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 7330.
26. Schmitt, A.; Varoqui, R.; Uniyal, S.; Brash, J.L.; Pusineri, C. *J. Colloid and Interface Sci.* **1983**, *92*, 25.
27. Yan, F.; Déjardin, Ph. *Langmuir* **1991**, *7*, 2230.
28. Lutanie, E.; Voegel, J.-C.; Schaaf, P.; Freund, M.; Casenave, J.-P.; Schmitt, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 9890.

II. ANALYSE DE LA REACTIVITE DES ANTICORPS ANTI-FIB₂ ET ANTI-FIB₃: IMMUNOPRECIPITATION EN MILIEU LIQUIDE (TEST DE FARR).

Les caractéristiques des solutions d'anti-Fib₂ et d'anti-Fib₃ sont données dans le chapitre III ainsi que dans l'article inclus dans ce chapitre.

1. Solution d'anti-Fib₂.

La figure 6 (p.87) donne le rapport des quantités de molécules marquées (notées *) restant dans le surnageant ou apparaissant dans le précipité, sur la quantité initiale ajoutée dans le milieu réactionnel (MR), en fonction du rapport molaire anti-Fib₂/Fib du MR. Nous voyons que, lorsque les molécules d'anticorps sont marquées, aucune réaction entre elles et le fibrinogène n'a lieu: la radioactivité du surnageant reste constante lorsque le rapport anti-Fib₂*/Fib augmente dans le milieu réactionnel (MR), et corrélativement, aucune radioactivité n'apparaît dans le précipité. Au contraire, lorsque le fibrinogène est marqué, l'activité du précipité augmente, et celle du surnageant diminue dans la même mesure, indiquant que le système réagit normalement.

Remarques: (i) dans cette expérience, le deuxième surnageant de lavage du précipité n'a pas été rajouté au premier. Ceci explique la légère perte d'anti-Fib*₂ ou de Fib* et le départ à environ 90% de la quantité initiale. (ii) Nous voyons que, bien que le rapport anti-Fib₂/Fib* devienne très grand, la courbe expérimentale ne suit pas l'allure en cloche habituelle (cf chapitre III, p.65). Ceci est peut-être l'indice d'un problème d'agrégation des molécules d'anti-Fib₂, leur concentration initiale en solution atteignant 660 mg% (w/w) lorsque le rapport anti-Fib₂/Fib* est maximal (les concentrations des autres espèces marquées ou non n'ayant jamais dépassé 170 mg%). De fait, le point d'équivalence n'est jamais atteint, car la valeur du Fib* dans le surnageant se stabilise à 30% de sa quantité initiale. Néanmoins, si l'on considère le niveau en Fib* le plus élevé dans le précipité, il faudrait environ 40 molécules d'anti-Fib₂ pour saturer tous les sites épitopiques d'une molécule de fibrinogène. Une telle valeur coïnciderait avec celle obtenue pour la thyroglobuline humaine par exemple.

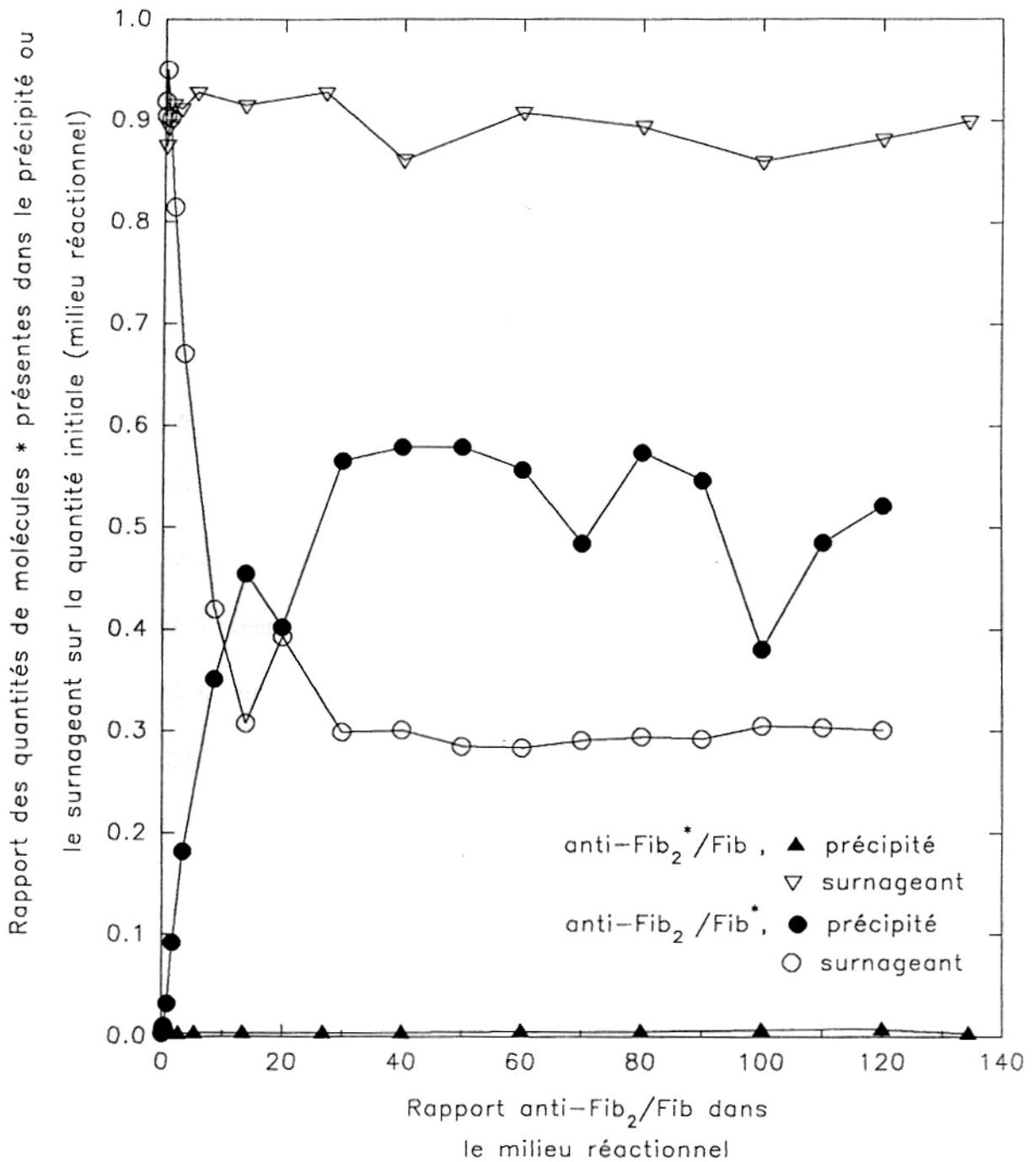


Figure 6: réactivité du système Fib/anti-Fib₂ (test de Farr).

2. Solution d'anti-Fib₃.

La même analyse que précédemment a été réalisée dans le cas du système Fib/anti-Fib₃, et les résultats de ce test sont montrés sur la figure 7 (p.89). A nouveau, une grande différence est mise en évidence, selon que les molécules de Fib ou d'anti-Fib₃ sont marquées. Lorsque le Fib est marqué, la réaction se déroule normalement, en rapport avec l'activité initiale des molécules d'anti-Fib₃, dont un ordre de grandeur est donné par le test ELISA. Cependant, il est très net que, contrairement au cas du système Fib/anti-Fib₂, une réaction Fib/anti-Fib*₃ s'amorce, bien qu'elle soit de faible amplitude (environ 4.5% de l'anti-Fib*₃ de départ). Ce signal reste néanmoins très faible comparé à celui du couple de référence Fib*/anti-Fib₃.

Ceci rejoint les conclusions que nous avons proposées dans l'article ci-inclus: l'anti-Fib*₃ étant de 2 à 3 fois plus réactif (test ELISA) et environ 4 fois moins marqué que l'anti-Fib*₂, il est davantage susceptible de réagir, ce que l'on vérifie sur le système expérimental du tube de silice.

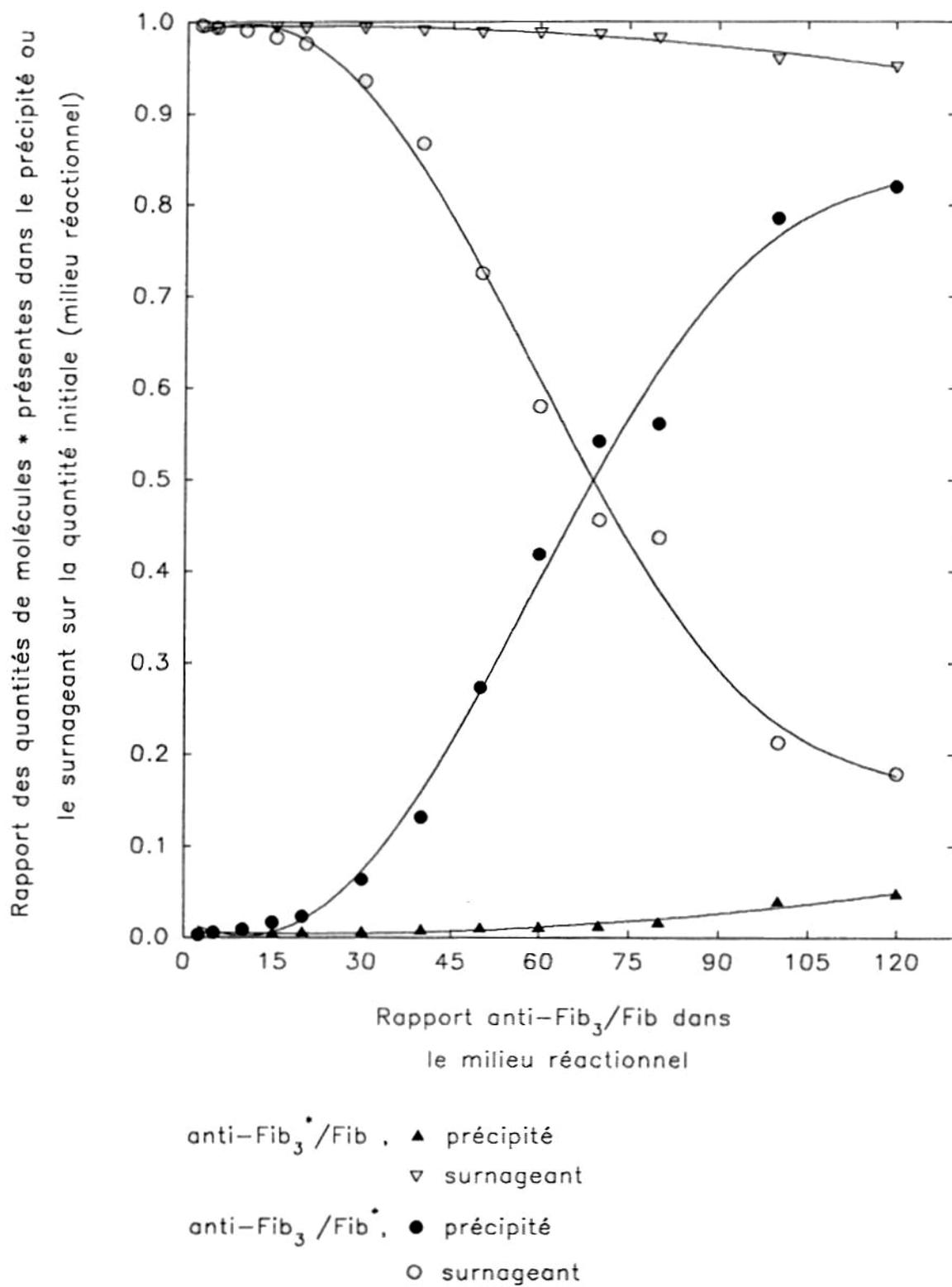


Figure 7: réactivité du système Fib/anti-Fib₃ (test de Farr).

Remarques: (i) cette légère augmentation de la réactivité des anticorps marqués est probablement liée au fait que, le marquage étant plus faible, l'iode 125 ne « bloque », par fixation sur un résidu tyrosyle, qu'un des deux bras de l'IgG, laissant à l'autre son entière capacité de reconnaissance; (ii) la concentration de l'anti-Fib froid dans le MR atteint une valeur encore plus élevée que lors du test précédent, à savoir 990 mg%, le Fib froid ou marqué ainsi que l'anti-Fib*₃ ne dépassant pas 20 mg% environ. Il est difficile de dire si cela a une incidence sur le résultat observé: la courbe a ici davantage l'allure de la cloche classique, le domaine que nous avons étudié semblant cependant être la limite à mi-parcours. Si l'on fait cette hypothèse, la valeur à ce pseudo-point d'équivalence (80% du Fib* a disparu du surnageant) laisse penser qu'il faut au moins 120 molécules d'anti-Fib*₃ par molécule de Fib pour saturer tous les épitopes, ce qui paraît impossible si l'on considère les dimensions moléculaires respectives des deux espèces. Il faudrait alors supposer qu'une agrégation progressive de l'anticorps ou une agrégation induite de l'antigène (concentration en anticorps dépendante) entraînerait un déplacement de la courbe vers la droite.

3. Conclusion.

Il apparaît clairement sur les figures 6 et 7 que le marquage à l'iode 125 réalisé en utilisant la méthode de McFarlane altère considérablement la capacité de reconnaissance des anticorps. Les raisons de cette perte d'activité ont été discutées dans l'article du début de ce chapitre.

III. SOLUTIONS AU PROBLEME DU MARQUAGE PAR LA METHODE DE MCFARLANE.

Pour pallier ce problème du marquage à l'¹²⁵I par la technique de McFarlane, différentes alternatives ont été envisagées, qui n'ont pas pu être mises en oeuvre dans le cadre de ce travail. Il y a deux voies possibles pour tenter de résoudre le problème: l'emploi d'autres techniques de marquage, plus douces, ou des méthodes qui visent à coupler des molécules détectables (par voie enzymatique ou radiomarquage par exemple) sur une région des IgG non impliquée dans la reconnaissance antigénique.

1. Marquage par le réactif de Bolton-Hunter.

Le réactif de Bolton-Hunter est un agent acylant marqué à l'¹²⁵I préparé par la méthode à la chloramine-T, qui réagit spontanément et dans des conditions douces principalement avec des résidus lysine (groupements aminés libres) (BOLT73). L'utilisation de ce réactif est un complément aux méthodes à la chloramine-T et à la lactoperoxidase, dans lesquelles l'iode radioactif est introduit dans le noyau phénolique des résidus tyrosines et également dans les histidines. Lorsqu'un marquage sur une tyrosine peut conduire à la perte de l'activité immunologique, ce qui a été notre cas, ou lorsque le substrat ne contient pas (ou peu) le groupe approprié, le réactif de Bolton-Hunter est une excellente alternative. De plus, cette méthode est non oxydative.

2. Marquage par la chloramine-T.

La procédure de marquage par la chloramine-T la plus récente et efficace est celle de Markwell (MARK82). Le réactif, fourni par PIERCE, est appelé: « Iodo-beads™ iodination reagent ». Il s'agit de molécules de chloramine-T immobilisées sur des billes de polystyrène non poreuses. Comme il n'y a aucun contact entre la protéine et l'agent oxydant immobilisé, ce réactif constitue une méthode de marquage à l'iode 125 plus douce que la chloramine-T soluble. Comme dans la méthode de McFarlane, c'est l'iodure de sodium NaI qui fournit l' ^{125}I .

3. Marquage par la peroxidase.

L'iodation peut être catalysée par la lactoperoxidase (MORR71). Cette méthode présente plusieurs avantages: (i) l'halogénéation à la peroxidase induit moins de réactions secondaires que d'autres méthodes d'halogénéation, car l'oxydant peroxidase peut être utilisé en de très faibles concentrations; (ii) la réaction peut être très sélective, car la lactoperoxidase ne iode que les résidus tyrosine qui peuvent former un complexe enzyme-substrat avec la peroxidase. Ceci permet d'ailleurs de mettre en évidence quels sont les résidus tyrosine qui sont particulièrement exposés au solvant sur la protéine; (iii) l'iodation de résidus tyrosine externes ne perturbe que peu la structure tridimensionnelle de la protéine, et son activité biologique (enzymatique ou de liaison, comme les hormones ou les immunoglobulines) est ainsi préservée.

4. Préparation de conjugués IgG-Enzyme.

Dans de tels conjugués, l'enzyme est par exemple la phosphatase alcaline (PA) (ENGV71, KEAR79, O'SU79), la peroxidase (POD, HRP: horseradish peroxidase) (HURU80, WILS78), ou la β -galactosidase (β -gal) (ISHI83). Avant le couplage sur l'IgG, nous pourrions donc envisager de marquer ces enzymes à l' ^{125}I .

Il semblerait que les conjugués IgG-HRP possèdent une spécificité d'activité enzymatique et une réactivité immunologique très élevées, meilleures que les conjugués IgG-PA ou IgG- β -gal (PORT85).

5. Utilisation du système avidine-biotine.

Il s'agit d'un couplage avec la biotine, sous sa forme d'ester actif, aux groupements aminés des IgG, et ceci n'altère pas leurs propriétés immunologiques. Les anticorps biotinés peuvent réagir avec l'antigène correspondant et le complexe antigène/anticorps/biotine formé peut ensuite être révélé par deux procédés différents: (i) utilisation de l'avidine comme pont entre l'anticorps et une enzyme, tous deux biotinés (procédé BRAB: « Bridged Avidin-Biotin »); (ii) utilisation de l'avidine couplée à une enzyme pour révéler l'anticorps-biotine (procédé LAB: « Labeled Avidin-Biotin »). On peut s'attendre à ce qu'un grand nombre de molécules de biotine fixées sur l'anticorps réagisse avec un grand nombre de molécules d'avidine, elle-même couplée à plusieurs molécules de peroxidase. Ainsi, le signal enzymatique est amplifié. Cette technique est utilisée au niveau de tests ELISA par exemple, et est donc très opérante sur une surface. A nouveau, la peroxidase pourrait être marquée à l' ^{125}I pour un suivi en radioactivité.

L'avantage de cette méthode est que la liaison avidine-biotine est très forte, malgré son caractère non covalent. Par ailleurs, l'anticorps, même fortement biotiné, ne perd pas

sa capacité de reconnaître l'antigène, et n'est pas polymérisé par le couplage. De plus, la POD ou la β -gal par exemple gardent pratiquement toute leur activité.

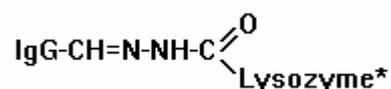
6. Couplage avec une protéine A ou G.

Les protéines A ou G (extraites de bactéries) lient très fortement la fraction Fc des IgG. Elles pourraient être marquées à l' ^{125}I et incubées avec les anticorps. Il suffirait ensuite d'en éliminer l'excès par dialyse.

Un kit vendu par PIERCE (cf catalogue), appelé « ImmunoPure[®] Protein G Orientation Kit » pourrait s'avérer extrêmement intéressant pour l'étude de l'interaction d'un antigène avec son anticorps: celui-ci est lié par une protéine G couplée covalamment sur une surface, et la liaison protéine G-IgG est ensuite stabilisée par une liaison covalente à l'aide de DMP (dimethylpimélimidate). La molécule d'IgG dirige donc sa partie Fab vers le solvant, tout en étant solidement ancrée sur la surface.

7. Couplage covalent de l'IgG avec une autre protéine ou un peptide.

Dans cette stratégie, la protéine aurait une masse moléculaire (Mw) faible par rapport à l'IgG, le but étant de perturber le moins possible ses propriétés physicochimiques (réactivité, coefficient de diffusion...). La protéine peut être le lysozyme par exemple, de Mw 14500, qui présente l'avantage de se marquer particulièrement bien à l' ^{125}I . Un peptide de synthèse peut être utilisé (Néosystem) et se devra de comporter des résidus tyrosine et suffisamment de groupes polaires pour être soluble. Deux solutions de couplage ont été envisagées: (i) un couplage à l'aide du carbodiimide, mais la réaction s'effectue par l'intermédiaire des groupements amine primaire des protéines, et les résidus N-terminaux étant côté Fab, cela risquerait de bloquer la reconnaissance antigène/anticorps; (ii) un couplage impliquant dans une première étape l'oxydation des résidus glucidiques de la fraction Fc des IgG: l'oxydant est le periodate (NaIO_4) et un groupement aldéhydique -CHO est généré. Parallèlement, le lysozyme (préalablement marqué à l' ^{125}I) est activé par le dihydrazide adipique, et la réaction avec IgG-CHO s'effectue ainsi par le biais d'une liaison hydrazone:



Le Fab est laissé libre par cette méthode. Cette technique de couplage est utilisée par l'équipe de Quash (QUAS78) pour coupler des IgG par leur région Fc à des billes de latex carboxyliques.

8. Méthode utilisant un anion cyanohydridoborate.

L'anion cyanohydridoborate joue le rôle d'agent réducteur sélectif: la réaction d'un aldéhyde ou d'une cétone avec de l'ammoniac, une amine primaire ou secondaire à pH7 en présence de BH_3CN^- (Na^+) conduit à l'obtention d'amines primaires, secondaires ou tertiaires respectivement, via amination réductive du groupement carbonyle (BORC71). BH_3CN^- est stable en solution aqueuse à pH7, réduit facilement les imines, et amine également les α -cétoacides dans ces conditions, ce qui fait de lui un candidat des plus appropriés pour induire des réductions et des aminations sur des systèmes biologiques complexes. Un couplage covalent entre IgG et lysozyme marqué est alors tout à fait

envisageable. La question est cependant de savoir si le groupement Fab préserve sa capacité de reconnaissance.

9. Utilisation d'un sel de pyridinium.

Une approche totalement différente consiste à utiliser un sel de pyridinium, que nous pourrions coupler à un groupement sulfhydryle -SH d'une molécule d'IgG, selon le schéma réactionnel suivant (HOLL93) (Figure 8):

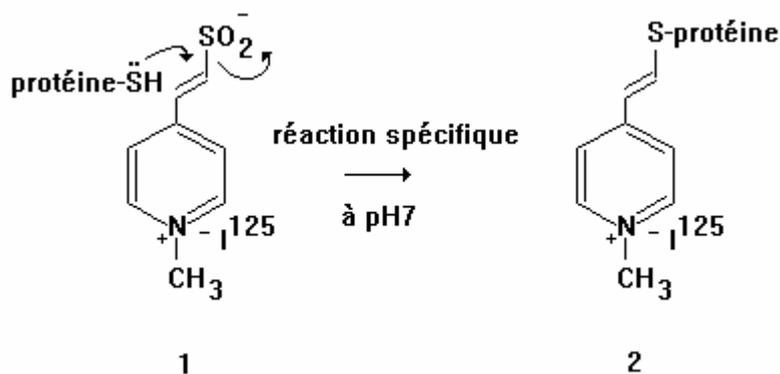


Figure 8: réaction d'une IgG sur un sel de pyridinium.

La liaison saline $\text{N}^+ \text{I}^{125-}$ est forte et la réaction peut être vérifiée et quantifiée par mesure de l'absorption de la lumière. En effet, la longueur d'onde d'absorption maximale (λ_{max}) du composé 1 est de 280 nm, tandis que celle du composé 2 est: $\lambda_{\text{max}} = 360$ nm. La vérification à faire est celle de la stabilité du sel dans le tampon de travail.

Si la réaction ne bloque pas le site actif de l'IgG, cette méthode permettrait de suivre la protéine par la présence de l' $^{125}\text{I}^-$ radioactif présent au niveau du noyau pyridinium.

Chapitre V

Réactivité d'anticorps vis-à-vis d'antigènes adsorbés par échange avec une protéine préadsorbée

INTRODUCTION

Dans ce chapitre, complémentaire du précédent, nous nous sommes intéressés à la réactivité des molécules d'anti-fibrinogène vis-à-vis de molécules de fibrinogène adsorbées sur la surface de silice par échange avec des molécules d'IgG préadsorbées. Le but de ce travail a été de vérifier sur un autre système protéique le résultat d'E. Lutanie (LUTA92) obtenu sur le système dans lequel les anticorps étaient des IgY, et les antigènes des IgG adsorbés par échange compétitif avec de l'albumine humaine. Nous rappelons que la conclusion de ce travail était une perte de la reconnaissance des IgG par les IgY, l'échange étant de nature à dénaturer les IgG.

Pour ce faire, et comme dans le chapitre IV, nous avons utilisé les deux approches complémentaires du radiomarquage et de la réflectométrie à balayage angulaire, qui constituent les deux parties de ce chapitre. Les expériences réalisées en réflectométrie, technique mieux adaptée à l'appréciation qualitative d'une réaction entre deux espèces moléculaires, nous ont permis de conclure sans ambiguïté sur la réactivité du système [Fib/IgG, anti-Fib].

Nous présentons enfin une expérience ayant pour but de reproduire le résultat d'E. Lutanie, réalisée sur le système [IgG/albumine, anti-IgG].

I. EXPERIENCES REALISEES PAR LA TECHNIQUE DE MARQUAGE RADIOACTIF.

Afin d'évaluer la réactivité de molécules d'anti-Fibrinogène (anti-Fib) vis-à-vis de molécules de Fib adsorbées par échange avec des IgG préadsorbées sur le tube de silice, nous avons choisi de calculer les valeurs des quantités de protéines adsorbées à l'aide de la « méthode 2 » décrite dans le chapitre IV. Les rapports de réactivité molaire pour la réaction sur le fibrinogène adsorbé sur la surface nue, déterminés par la méthode 1 dans le chapitre précédent, prendront ainsi des valeurs légèrement différentes (cf plus loin).

L'anti-Fib que nous avons utilisé pour cette étude est celui de la préparation 1 (anti-Fib₁). Nous le dénoterons « anti-Fib » au cours de ce chapitre. Il s'agit de la molécule issue du même marquage que dans le cas de l'étude de la réactivité de l'anticorps sur le Fib adsorbé sur la surface nue: ceci est très important pour la comparaison de la réactivité vis-à-vis de molécules de Fib adsorbées par l'un ou l'autre mécanisme. En effet, la capacité de reconnaissance de l'anticorps est, comme nous l'avons démontré, particulièrement sensible au marquage à l'iode 125.

Pour illustrer la procédure expérimentale suivie, nous pouvons nous référer à la Figure 5 du chapitre IV (p.113): avant l'étape 1, les molécules d'IgG (non marquées) sont injectées dans le tube de silice à une concentration moyenne de 10 mg%. L'adsorption est réalisée pendant 4.2 h à un débit de $2.4 \text{ cm}^3 \cdot \text{h}^{-1}$, suivie d'un rinçage avec du tampon PBS (type 2, cf Chap. IV) pendant 1.23 h à $4.8 \text{ cm}^3 \cdot \text{h}^{-1}$ (correspondant à l'étape 1). Dans une première série d'expériences, l'étape 2 a consisté en l'injection de molécules marquées de Fib à des concentrations en solution variant de 0 à 102 mg%, pendant 2.38 h à un débit de $2.4 \text{ cm}^3 \cdot \text{h}^{-1}$, rincées ensuite avec le tampon pendant 1.52 h à $2.4 \text{ cm}^3 \cdot \text{h}^{-1}$. Ces expériences nous ont permis de déterminer les quantités de Fib* adsorbées par échange avec les IgG dans ces conditions (cf Tableau I).

Remarque: après chaque expérience, le tube de silice a été nettoyé avec de l'acide sulfochromique.

Tableau I
Réactivité de l'anti-Fib* (10 mg%) sur le Fib échangé

Concentration Fib(*) (mg%)	Γ_{Fib^*} échangé ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$)	$\Gamma_{\text{anti-Fib}^*}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$)
0	0	0.090
0	0	0.116
22	0.115	0.124
55	0.214	0.132
62	0.269	0.140
102	0.376	0.152

Réactivité des molécules d'anti-Fib sur les molécules de Fib échangées.

L'étape suivante a consisté à vérifier la réactivité des anticorps anti-Fib vis-à-vis des molécules de Fib échangées (étapes 4 et 5, Figure 5, Chap. IV, p.113). Pour relier directement l'augmentation du signal radioactif à la quantité de molécules d'anti-Fib* adsorbées sur la surface, le processus d'échange a été réalisé avec du Fib non marqué, la quantité de Fib fixée ayant été déterminée séparément (et comme indiqué précédemment) pour des concentrations identiques (à 2 ou 3 mg% près) avec du Fib marqué. La réactivité des molécules d'anti-Fib* a été évaluée de façon analogue à la situation dans laquelle le Fib était adsorbé directement sur la surface. L'anti-Fib* est injecté à la concentration d'environ 10 mg% dans le tube (pendant 2.16 h à $2.4 \text{ cm}^3\cdot\text{h}^{-1}$), et la quantité immobilisée déterminée après passage du tampon PBS (pendant 2.35 h à $2.4 \text{ cm}^3\cdot\text{h}^{-1}$) (cf Tableau I).

Pour estimer le signal radioactif théoriquement suspecté dû aux anti-Fib*, en corrélation avec la quantité de Fib présent à l'interface après échange des IgG, nous devons considérer: (i) la quantité d'anti-Fib* devant théoriquement réagir, déterminée dans la réaction où le Fib est adsorbé directement par le rapport de réactivité molaire, (ii) la quantité d'anti-Fib* s'échangeant avec les molécules de Fib et d'IgG sur la surface (ou donnant une réaction croisée avec les molécules d'IgG) et (iii), nous devons considérer la quantité effective de Fib restant sur la surface à la fin de l'étape de rinçage de l'anti-Fib* avec du tampon. En effet, il peut y avoir départ du Fib par désorption, par échange avec l'anti-Fib* ou sous forme de complexes Fib/anti-Fib*.

Nous avons précisé la contribution (ii) par deux expériences indépendantes dans lesquelles la solution d'anti-Fib* était remplacée soit par des IgG* humaines (« Exp. a »), soit par une solution d'anti-Fib₂* (« Exp. b », et cf Chap. IV) dans les mêmes conditions expérimentales. Dans ces deux expériences, le Fib était non marqué et à une concentration égale à environ 78 mg%.

Les IgG* humaines sont des anticorps non dirigés contre le Fib, mais susceptibles de réagir contre lui par réaction croisée; de plus, ce ne sont pas des anticorps produits par le lapin (comme l'anti-Fib), et les quantités échangées pourraient être légèrement différentes (cf Chap. I pour les différences structurales entre les deux molécules). L'expérience « a » peut cependant être considérée comme tout à fait acceptable pour estimer la contribution (ii). L'anti-Fib₂* par contre (Exp. « b ») est une IgG de lapin et sa réactivité vis-à-vis du Fib, comme nous l'avons démontré dans le chapitre précédent, est nulle. Si le site actif de cet anticorps est bloqué par la présence d'iode, nous pouvons également supposer que sa réactivité vis-à-vis des IgG (réaction croisée) est nulle elle aussi. Par conséquent, la contribution dans le signal produit par

l'anti-Fib* due à une réaction croisée sur les IgG n'a pu être quantifiée. Un test ELISA effectué sur le système IgG/anti-Fib (les deux molécules étant non marquées) a démontré que cette réaction est faible mais cependant non négligeable.

Les quantités fixées obtenues dans les expériences a et b étaient de $0.028 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ pour les IgG* et $0.055 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ pour l'anti-Fib₂*.

Les rapports de réactivité molaire obtenus pour l'anti-Fib₁ dans la réaction sur du Fib adsorbé sur la surface nue étaient 1.2 et 1.7 (Chap. IV). Corrigés en calculant les valeurs des quantités adsorbées par la méthode 2, ces rapports deviennent: 1.1 et 1.6. A la concentration en Fib utilisée pour réaliser les expériences a et b ($\approx 78 \text{ mg}\%$), la valeur de la concentration interfaciale du Fib ($\Gamma(\text{Fib éch.})$) se situe à environ $0.30 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ (cf isotherme du Fib sur les IgG, Figure 4, Chap. VI). La contribution (iii) n'ayant pu être précisée, cette valeur est surestimée (le Fib continue de se désorber ou est échangé par l'anti-Fib* jusqu'au temps de fin de rinçage de l'anti-Fib*). Les valeurs attendues théoriquement pour l'anti-Fib* (Γ_{th}) s'il réagissait dans les rapports 1.1 et 1.6 sont calculées par la relation (1):

$$\Gamma_{\text{th}} = \Gamma(\text{anti-non Fib}) + \Gamma(\text{Fib éch.}) \times R \quad (1)$$

où $\Gamma(\text{anti-non Fib})$ est la quantité à l'interface obtenue soit pour les IgG* (Exp. a) soit pour l'anti-Fib₂* (Exp. b), et R le rapport de réactivité molaire (1.1 ou 1.6). Comme nous l'avons vu, $\Gamma(\text{anti-non Fib})$ est sous-évalué, puisqu'il n'y a pas de réaction croisée possible avec les IgG. (Remarque: ceci est vrai pour les IgG* (Exp. a) si la réaction croisée avec le Fib n'est pas de nature à compenser cet effet).

Pour tenir compte de la différence de masse moléculaire entre le Fib et les IgG, $\Gamma(\text{anti-non Fib})$ et $\Gamma(\text{Fib éch.})$ sont exprimés en $\text{pmol}\cdot\text{cm}^{-2}$ et les résultats (Γ_{th}) traduits en $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$.

L'ensemble de ces données est représenté sur la Figure 1 (p.98), sur laquelle nous avons défini un domaine de réactivité théorique, limité par la valeur la plus faible et la plus élevée de Γ_{th} (symboles ouverts, droites en pointillés). Rappelons que ce domaine est évalué de façon imprécise (contribution (iii) et réaction croisée avec les IgG non précisées).

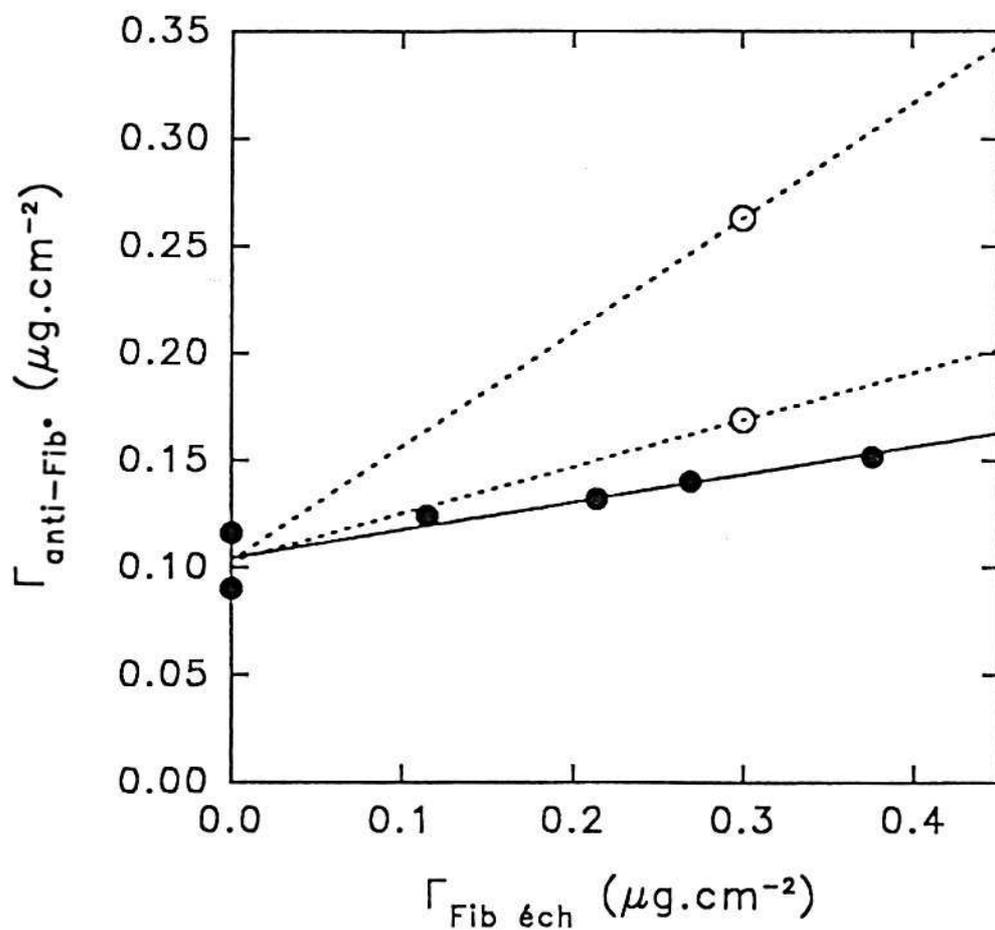


Figure 1: ●: quantité d'anti-Fib* fixée ($\Gamma_{\text{anti-Fib}^*}$, $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) en fonction de la quantité de Fib adsorbée par échange avec des IgG ($\Gamma_{\text{Fib éch}}$, $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$), étude par radiomarquage. La ligne continue est une régression linéaire sur ces points.

○ et lignes pointillées: limites approximatives entre lesquelles se situe le domaine théorique de réactivité (cf texte).

Le seul argument en faveur d'une perte de la capacité du Fib à être reconnu par l'anticorps après échange avec les molécules d'IgG consiste en le fait que les molécules d'anti-Fib₂* non réactives traduisent mieux que les IgG* les quantités d'anti-Fib₁* qui s'adsorbent sur la surface par le seul échange. Nous voyons qu'il est difficile de conclure, sur la base de ces résultats, à une altération des molécules de Fib dans le processus de l'échange, apte à induire une perte de leur reconnaissance par les molécules d'anti-Fib.

II. EXPERIENCES REALISEES A L'AIDE DE LA TECHNIQUE DE REFLECTOMETRIE.

Afin de préciser les résultats obtenus par la technique de radiomarquage, nous avons réalisé trois expériences à l'aide de la technique de réflectométrie à balayage angulaire (SAR, cf Chap. IV), qui nous ont permis de conclure sur la réactivité du système Fib/anti-Fib après échange du Fib sur les IgG.

Ces expériences ont été réalisées avec une cellule (prisme Hérasyl) qui, contrairement aux études de la réactivité vis-à-vis d'un antigène adsorbé sur la surface nue (Chap. IV), n'a jamais été mise au contact d'acide sulfochromique. La cellule, ainsi que les diverses parties du montage (tubulure en Téflon, ballons de verre contenant les solutions à injecter ...) ont été nettoyées avec une solution de Hellmanex à 5% chauffée à 60°C, et, après un abondant rinçage à l'eau bidistillée, avec une solution d'acide sulfurique à 10%. Un dernier rinçage est effectué avec de l'eau bidistillée et du tampon PBS dégazé. Dans les trois expériences, les concentrations des solutions d'IgG, de Fib et d'anti-Fib étaient respectivement de 50, 50 et 10 mg%. L'anti-Fib est celui de la préparation 3 (anti-Fib₃), et le tampon PBS celui de type 2 (cf. Chap. IV). Toutes les solutions, excepté le tampon, sont injectées rapidement par gravité à partir d'un ballon, puis laissées au repos, les molécules diffusant alors vers la surface. Le tampon est lui injecté de façon continue.

Dans la première expérience (Exp. 1, Tableau II), les IgG ont été adsorbées durant 4.2 h, puis rincées avec du tampon pendant 35 min. La solution de Fib est injectée, l'échange pouvant se faire durant 4.4 h. Après un rinçage de 50 min avec du tampon, la solution d'anti-Fib est injectée et nous avons laissé la réaction se poursuivre durant la nuit. Sur la Figure 2 (p.100) sont représentées les variations de l'indice de réfraction (Δn), de l'épaisseur ($d[a]$, en Å) ainsi que le produit de ces deux quantités en fonction du temps. Ce produit traduit la quantité de matière adsorbée à l'interface (cf Chap. IV pour plus de détails), qui, après division par dn/dc (environ $0.18 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$) et correction par rapport aux unités employées, donne la concentration surfacique (Γ , Tableau II). Celle-ci ne peut évidemment pas être évaluée pour une molécule s'adsorbant par échange, en l'occurrence pour le Fib. Pour la même raison, $\Gamma_{\text{anti-Fib}}$ ne donnera qu'une idée approchée de la quantité d'anti-Fib ayant réagi sur le Fib.

Tableau II.
Résultats des expériences de réflectométrie:
réactivité Fib/anti-Fib après échange.

Exp.	Γ_{IgG} ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$)	Γ_{Fib} ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$)	$\Gamma_{\text{anti-Fib}}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$)
1	0.26	--	0.40
2	0.23	--	0
3	--	--	0.50

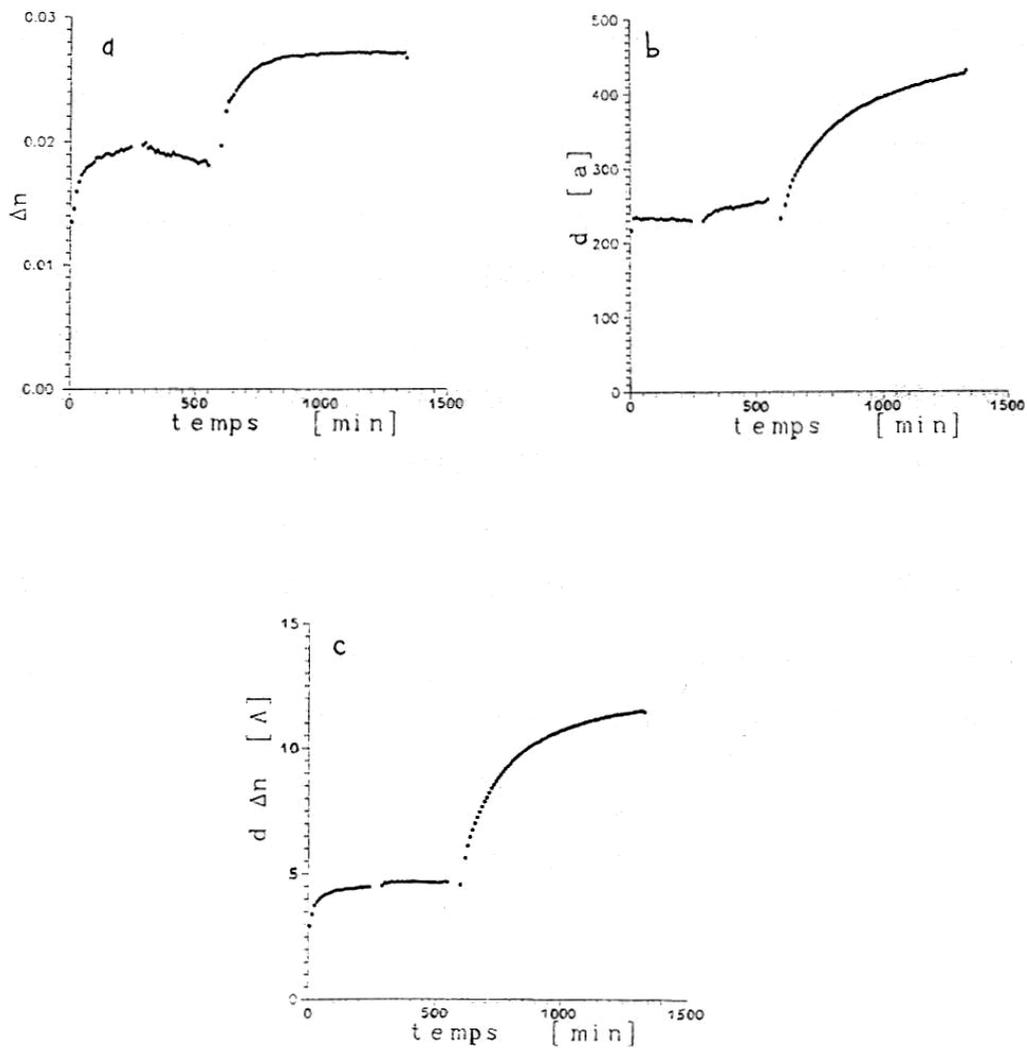


Figure 2: étude du système [Fib/IgG, anti-Fib] en réflectométrie.
a: indice de réfraction (Δn). b: épaisseur (d [a], Å). c: quantité adsorbée. Variations en fonction du temps (min).
t = 0: IgG (50 mg%); t = 255 min: PBS (pH7.5, 0.15M NaCl, 50mM phosphate); t = 290 min: Fib (50 mg%); t = 555 min: PBS; t = 605 min: anti-Fib (10 mg%).

Nous constatons que la réaction Fib/anti-Fib a bien lieu, l'amplitude du signal anti-Fib étant comparable à celle obtenue dans la réaction sur du Fib adsorbé sur la surface nue (cf Chap. IV, Figures 2a-c, p.73-74). Une différence importante est qu'ici l'indice de réfraction augmente lors du passage de l'anti-Fib, alors qu'il ne variait quasiment pas dans la réaction « directe ». Ceci peut s'expliquer par une pénétration de molécules d'anti-Fib dans la couche mixte IgG/Fib.

Afin de vérifier que le signal obtenu dans l'expérience 1 n'est pas dû en partie à une réaction croisée entre les molécules d'anti-Fib et d'IgG, nous avons réalisé une expérience (Exp. 2, Tableau II) qui a consisté à injecter des IgG (pendant 4.8 h), puis, après rinçage avec le tampon PBS (pendant 1 h), la solution d'anti-Fib. La Figure 3 (p.102) montre clairement que, contrairement au résultat du test ELISA que nous avons évoqué précédemment, cette réaction est inexistante. (Remarque: seuls les premiers temps du signal correspondant à l'injection d'anti-Fib sont montrés sur la Figure 3, mais l'enregistrement a été poursuivi durant la nuit, et aucune évolution dans le signal n'a été notée).

Une dernière vérification (Exp. 3, Tableau II) a consisté à tester la réaction de l'anti-Fib sur du Fib adsorbé par échange avec des IgG, mais de façon compétitive en mettant la surface au contact d'un mélange IgG/Fib (50 mg% : 50mg%). Cette manière de procéder a été celle de Lutanie (LUTA92) pour le système [IgG/albumine, IgY anti-IgG]. Les IgG diffusent plus rapidement vers la surface que le Fib; cependant, une certaine proportion de molécules de Fib va pouvoir s'adsorber sur la surface nue. Le mélange a été injecté et laissé au repos pendant 4.2 h, rincé avec du tampon PBS pendant 1.4 h. Puis la solution d'anti-Fib a été injectée et le signal suivi durant la nuit. Nous voyons sur la Figure 4 (p.103) que la réaction Fib/anti-Fib se produit avec une intensité quasiment identique à celle obtenue dans l'expérience 1.

Les conditions d'adsorption des IgG et du Fib étant différentes cependant, de légères différences dans le comportement de la couche apparaissent si l'on compare les variations des indices de réfraction et des épaisseurs: dans l'expérience 1, nous pouvons observer une légère diminution de l'indice et augmentation de l'épaisseur lors de l'injection du Fib, alors que l'inverse se produit pour l'expérience 3 lorsque l'on injecte le mélange IgG/Fib. Il est néanmoins difficile de conclure sur la structure de la couche adsorbée, l'indice n'étant qu'une grandeur moyennée sur toute l'épaisseur: il est ainsi possible d'avoir une zone dense proche de la surface, suivie d'une zone de densité plus faible au contact avec la solution. Il ressort cependant des Figures 2, 3 et 4 (cela est moins net sur la Figure 2) que l'indice augmente corrélativement à une diminution de l'épaisseur lors du rinçage avec le tampon, indiquant une possible compactation de la couche.

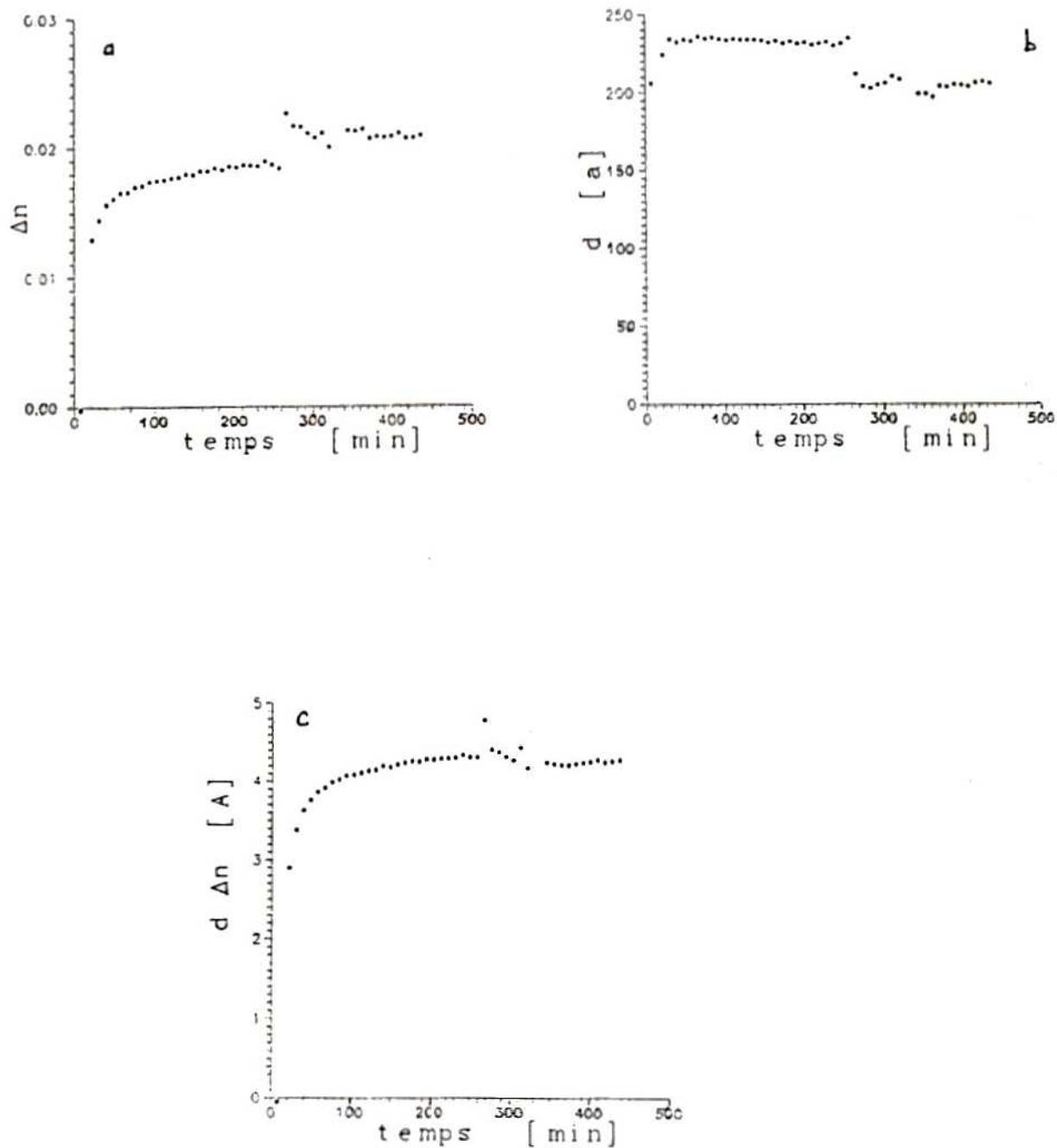


Figure 3: étude du système [IgG, anti-Fib] en réflectométrie.

a: indice de réfraction (Δn). **b:** épaisseur ($d[a]$, \AA). **c:** quantité adsorbée. Variations en fonction du temps (min).

$t = 0$: IgG (50 mg%); $t = 287$ min: PBS (pH7.5, 0.15M NaCl, 50mM phosphate); $t = 344$ min: anti-Fib (10 mg%).

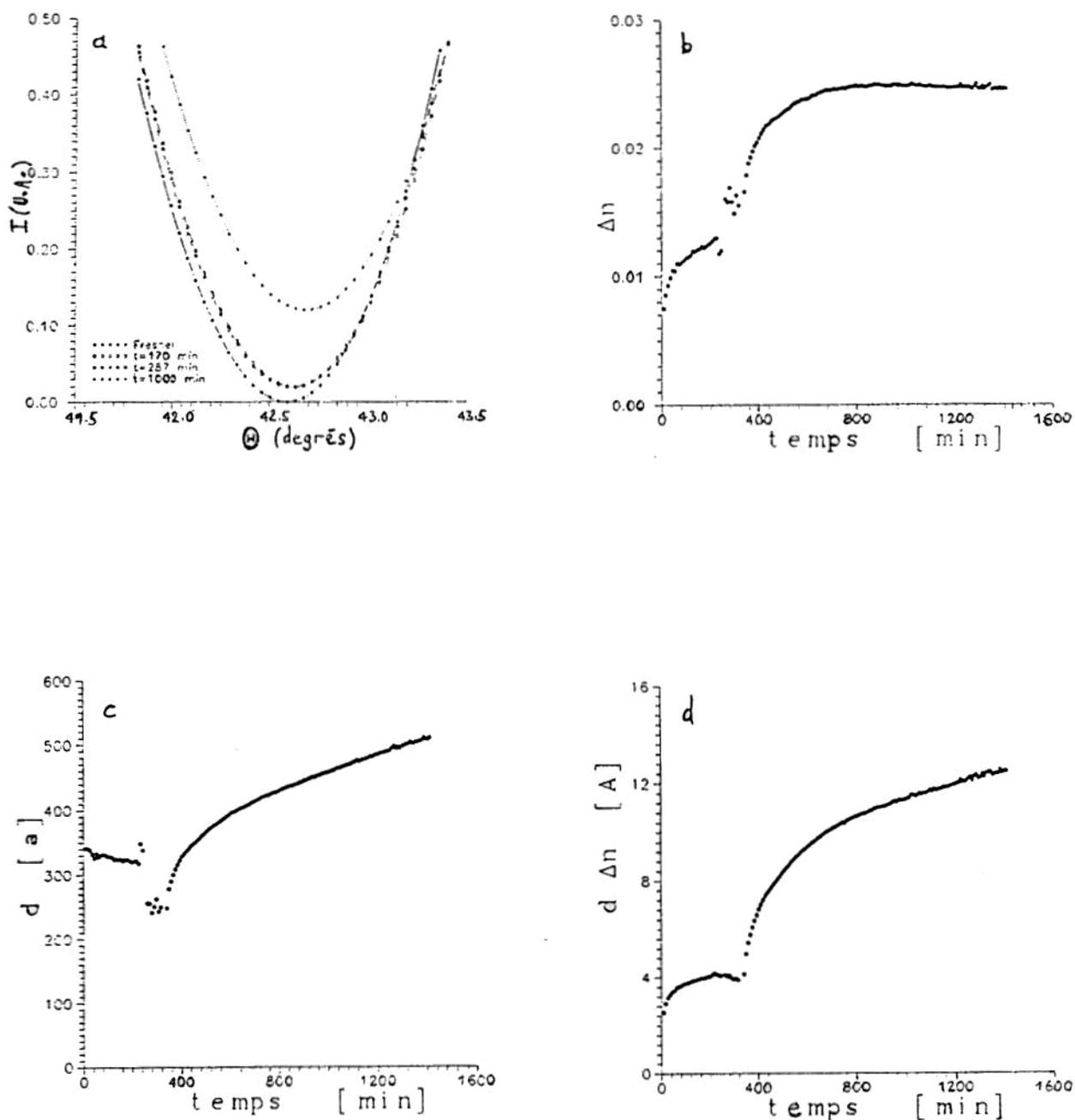


Figure 4: étude du système [Fib/IgG, anti-Fib] en réflectométrie.

a: intensité réfléchie (I , unité arbitraire) en fonction de l'angle (θ , degré), chaque courbe correspondant à un temps donné de l'expérience.

b: indice de réfraction (Δn). **c:** épaisseur (d [a], Å). **d:** quantité adsorbée. Variations en fonction du temps (min).

$t = 0$: mélange IgG (50 mg%)/Fib (50 mg%); $t = 253$ min: PBS (pH7.5, 0.15M NaCl, 50mM phosphate); $t = 337$ min: anti-Fib (10 mg%).

Il ressort de cette étude que nos résultats sont en contradiction avec ceux obtenus par E. Lutanie (LUTA92): sur le système [Fib/IgG, anti-Fib], aucune perte notable de la réactivité de l'anticorps sur l'antigène échangé n'a été observée. Nous savons à quel point il est difficile de reproduire exactement une expérience d'adsorption. Nous avons cependant tenté de reproduire le plus fidèlement possible l'expérience de Lutanie: utilisation de tampon PBS de type 1 (cf Chap. IV), nettoyage de la surface du prisme de verre avec de l'acide sulfochromique, préparation du mélange IgG/albumine humaine (50 mg% : 50 mg%) dans les mêmes conditions (centrifugation des solutions mères pour éviter la présence d'agrégats), etc. Pour tester la réaction antigène échangé/anticorps, la solution d'IgY a été remplacée par une solution d'anti-IgG (cf Chapitres III et IV) à une concentration de 10 mg%. Le mélange IgG/albumine est adsorbé pendant 4 h, et après rinçage de la solution pendant 1.6 h, la solution d'anti-IgG est injectée et le signal suivi durant la nuit. La Figure 5 (p. 105) montre les résultats de cette expérience: nous voyons que la réaction des anti-IgG sur les IgG est forte.

Ceci conforte nos résultats sur le système [Fib/IgG, anti-Fib]. Il semblerait que la réaction négative observée par E. Lutanie ait été liée à des états de surface différents (billes de verre pour les études de radioactivité, nettoyées avec de l'acide chlorhydrique concentré et chaud, prisme ayant séjourné pendant plusieurs jours dans de l'acide sulfochromique pour les études de réflectométrie...). En particulier, le degré d'hydrophilicité devait être différent. Ceci révèle que l'état de la surface doit probablement jouer un rôle déterminant pour les propriétés d'échange (compétitif ou non) entre deux molécules protéiques, et montre l'intérêt de compléter cette étude par des expériences dans lesquelles des surfaces d'hydrophobicité variable seraient employées.

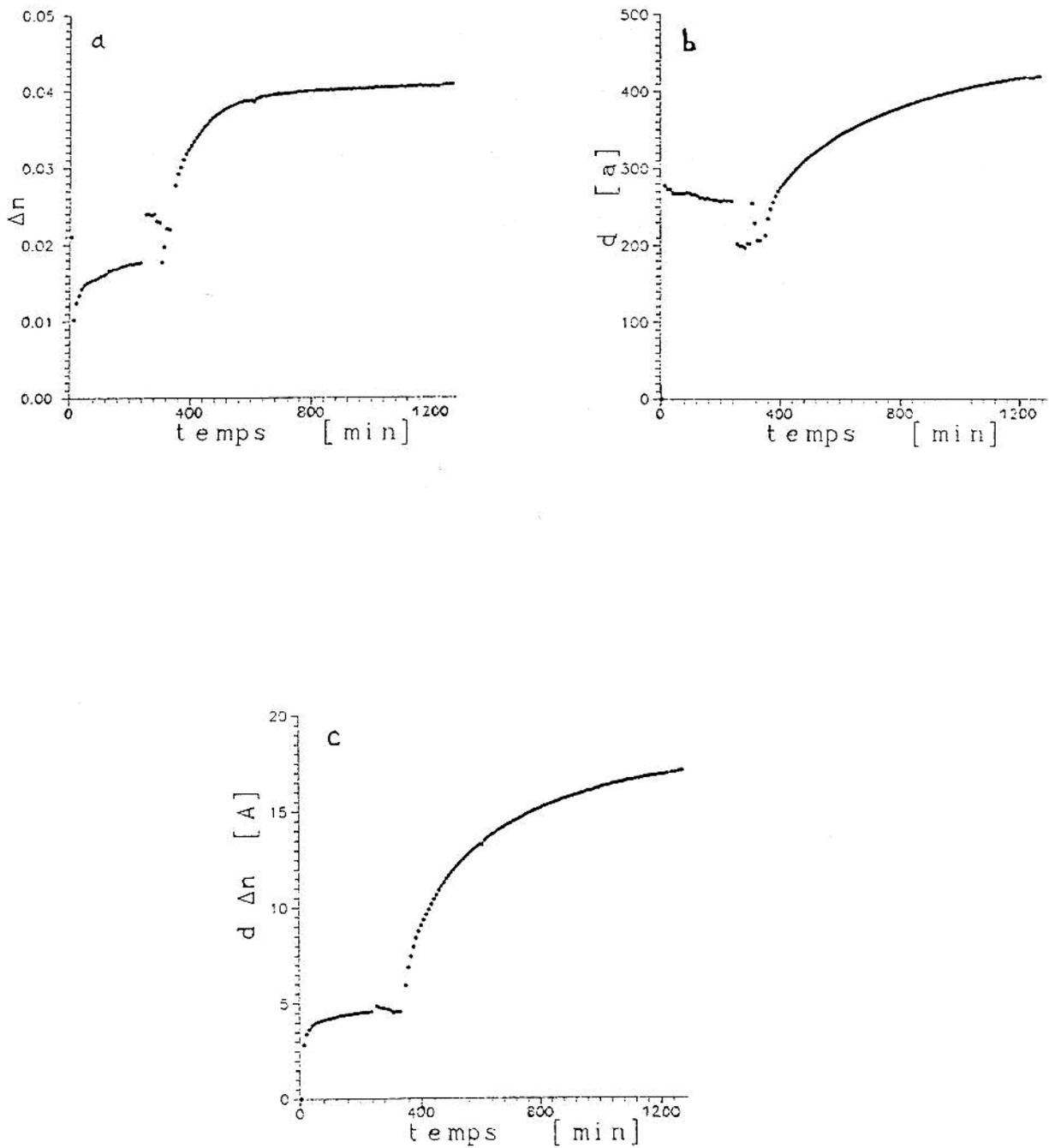


Figure 5: étude du système [IgG/albumine, anti-IgG] en réflectométrie.

a: indice de réfraction (Δn). **b:** épaisseur (d [a], Å). **c:** quantité adsorbée. Variations en fonction du temps (min).

$t = 0$: mélange IgG (50 mg%)/albumine (50 mg%); $t = 245$ min: PBS (pH7.8, 0.1M NaCl, 10mM phosphate, 1mM NaN₃); $t = 341$ min: anti-IgG (10 mg%).

Chapitre VI

Etude cinétique de

l'échange hétérogène IgG/fibrinogène

INTRODUCTION.

Nous avons dans le chapitre précédent concentré notre attention sur le problème de la réactivité d'anticorps vis-à-vis d'un antigène adsorbé sur la surface de silice par échange avec une première protéine adsorbée. De façon complémentaire à ce travail, nous présentons dans ce dernier chapitre une étude de la cinétique de l'échange hétérogène IgG/Fib.

Des expériences réalisées à la fois sur des temps courts (quelques heures) et longs (plusieurs jours) nous ont permis de déterminer les constantes de vitesse associées aux processus de désorption des IgG et d'échange IgG/Fib. Une analyse en fonction de la concentration des molécules de Fib en solution a abouti à la détermination de l'ordre de la réaction d'échange, par rapport aux molécules adsorbées et en solution.

Ce travail sera soumis à publication dans la revue "Langmuir".

Exchange kinetics for a heterogeneous protein system on a solid surface.

Ph. Huetz¹, V. Ball¹, J.-C. Voegel¹, P. Schaaf^{2,3}.

¹Centre de Recherches Odontologiques, INSERM U-424, CJF 92-04
1, Place de l'Hôpital - 67000 Strasbourg, France

²Institut Charles Sadron, CNRS-ULP
6, rue Boussingault - 67083 Strasbourg Cedex, France

³Ecole Européenne des Hautes Etudes des Industries Chimiques
de Strasbourg
1, rue Blaise Pascal, BP 296F, 67008 Strasbourg Cedex, France

ABSTRACT: The heterogeneous exchange process whereby IgG molecules adsorbed on a hydrophilic silica surface are replaced by fibrinogen molecules from the solution has been investigated by means of ¹²⁵I radiolabeling. Two characteristic times appear both in the desorption and exchange processes. At short times (of the order of an hour), the exchange process can be modeled by a first order kinetic reaction with respect to the fibrinogen molecules. Furthermore, consistently with the use of a two exponential model, it is also of first order with respect to the adsorbed IgG molecules. The exchange rate constant was equal to $(384 \pm 5) \times 10^3$ liter·mol⁻¹·h⁻¹. The long time behavior of the exchange process is characterized by a time scale which is identical to the long time behavior of the desorption process. This seems to indicate that at long times the exchange corresponds to a desorption/adsorption mechanism.

Introduction

Protein adsorption to solid surfaces plays a fundamental role in the field of biocompatible materials (ANDR85, IVAR86, BRAS87) such as blood compatible surfaces (LEON87) or metallic surgical implants (ELLI91). Under physiological conditions, biomaterial devices are in contact with various blood proteins such as kininogen, albumin, fibronectin, immunoglobulins or fibrinogen.

These protein molecules can adsorb to such solid surfaces by two different mechanisms: either direct adsorption onto free available space, or by a progressive exchange reaction. The first situation considers the direct contact of molecules with the bare sorbent surface, whereas in the second situation, adsorption seems to proceed by a progressive replacement of already adsorbed molecules. The homogeneous exchange occurs between two molecules of the same nature. However, biofluids are constituted by protein mixtures and the exchange process involves proteins of different nature. In this general case, high molecular weight proteins exchange preferentially with proteins of lower molecular weight which usually adsorb first, due to their smaller diffusion coefficient in the bulk. Historically first observed with plasma proteins, this behavior is called "Vroman effect" (VROM69, WOJC91). Similar observations have also been reported for synthetic polymers (THIE76).

As in the homogeneous reaction, the heterogeneous exchange process between biological macromolecules involves a set of cooperative events implying various physicochemical parameters difficult to apprehend at the molecular dynamics level. For

example, the knowledge of the precise hydrodynamic features of the system is essential for a deep understanding of exchange mechanisms.

The structural properties of the adsorbed protein layer may be quite different for direct adsorption in comparison to adsorption by an exchange mechanism. During the exchange process occurs a series of steps such as interaction with already adsorbed molecules, diffusion within this initially formed layer, reptation of the adsorbing molecules finally followed by annihilation of the links that the first fixed macromolecules had established with the surface. Consequently, the spatial orientation of the molecules may be different.

It was demonstrated experimentally that for homopolymers of the same nature and same molecular weight, a first-order chemical reaction with respect to both the bulky and adsorbed polymers describes the exchange reaction (PEFF83). This result has been extended recently for the homogeneous exchange process whereby γ IgG molecules adsorbed onto latex particles were replaced by γ IgG molecules from the bulk solution, and the first value of $2.3 \cdot 10^{-5} \text{ cm} \cdot \text{h}^{-1}$ for the apparent exchange rate constant was given for proteins (BALL94). However, no results are available for heterogeneous exchange processes, and it is the aim of this paper to present experimental data devoted to this problem. We will, in particular, address the problem of the order of the exchange reaction to see if the first order law found previously, with respect to the molecules in the bulk, may constitute a general law or if it depends on the system.

The experiments were performed for a system in which human fibrinogen molecules (Fib) were brought in contact with human γ IgG molecules adsorbed onto a hydrophilic silica surface. These proteins have been selected mainly with regard to their predominant role in important biological reactions, such as antigen/antibody recognition or clotting, taking place at the interface between biomaterials and biofluids.

Materials and methods

Lyophilized human polyclonal γ IgG ($M_w \approx 150000$), provided by the Centre Régional de Transfusion Sanguine (Strasbourg), was prepared as described in (McKI87) and isolated from blood given by about 1000 donors. Human fibrinogen (Fib, $M_w \approx 340000$), of grade L and coagulability $>90\%$, was purchased from Kabi Vitrum (Stockholm, Sweden). Proteins were dissolved in a PBS buffer solution, prepared with $50\text{mM Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ and 0.15M NaCl , the pH adjusted to 7.5 with $50\text{mM NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. In all experiments, the buffer was filtered with a Millex GV- $0.22\mu\text{m}$ filter, and degassed before use. The same buffer was used throughout an experiment for the rinsing steps.

γ IgG and fibrinogen molecules were radiolabeled (^{125}I) using a technique adapted from the method of McFarlane (McFA58) in which iodine monochloride is the iodinating agent. The amount of NaI was chosen so that only a low fraction of the whole molecules was labeled (this ratio was of about 1:2300 for IgG and 1:700 for Fib molecules). The protein solutions were stored in a concentrated form (0.4 to 1% (w/w)) at -20°C . Just before use, they were quickly thawed at 37°C and diluted in PBS buffer to their final bulk concentrations. These concentrations were determined by absorbance of the solutions at 280 nm (spectrophotometer Beckman, model 34, Inst. Inc. Fullerton, USA) and specific activities by γ counting (Minimaxi γ , United Technologies, Packard Instrument, USA). All experiments were performed at room temperature ($22 \pm 2^\circ\text{C}$).

The experimental apparatus used in the experiments has been described by Boumaza *et al.* (BOUM92) and consists of a silica tube of inner diameter 0.17 cm and length 21.5 cm. The tube is positioned so as to be centered in a circular NaI detector, jutting out from a few centimeters on each side of it, the distance between the edges of the tube and the detector

being regularly verified. A lead sheet surrounding the tube at the close entrance and exit of the detector allows to avoid edge effects in the shape of the signal due to the radioactivity coming from the parts of the tube or tubing situated on either side. A 3-way valve enables alternate flows of solution and buffer, as well as diversion towards a waste vessel, to eliminate air bubbles and stabilize the flux.

Protein or buffer solutions are injected at flow rates of ≈ 2.5 or $5.0 \text{ cm}^3\cdot\text{h}^{-1}$. The corresponding interfacial shear rates (γ) are calculated using the Poiseuille equation (Eqn 1):

$$\gamma = \frac{4 J}{\pi R^3} \quad (1)$$

where J is the flow rate and R the radius of the tube. This gives γ values of 1.45 and 2.90 s^{-1} , respectively.

As discussed previously, the aim of our work was to study the kinetics of the exchange process between Fib and γ IgG, the IgG molecules being adsorbed first. An important corollary of this study is the determination of the ratio between the number of arriving molecules of Fib and the number of leaving IgG molecules. Two sets of experiments were realized for this purpose, in which either Fib molecules were labeled, whereas IgG were injected as a cold solution, or the contrary. (Note: labeled molecules will be denoted with the subscript * throughout the text). Before each experiment, the silica tube and the connected Teflon tubing were cleaned with a 2% solution of Hellmanex, injected and left at rest over night. After extensive rinsing with bidistilled water (MilliQ, Millipore), a 10% sulfuric acid solution was flowed during about 5 min, followed by a rinse with water and PBS buffer solution.

A typical IgG/Fib* experiment starts (step 1, Figure 1) with injection of PBS buffer into the tube. The signal is the one of the background noise (too low to appear on Figure 1), which will have to be taken into account in the further estimation of the adsorbed quantities. This step is followed (step 2, Figure 1) by injection of unlabeled IgG, at a flow rate of $2.5 \text{ cm}^3\cdot\text{h}^{-1}$ during 4.22 h. The choice of the bulk concentration ($\approx 10 \text{ mg}\%$) will be discussed later. In step 3, the solution is replaced by buffer (rinse of 1.23 h at a flow rate of $5.0 \text{ cm}^3\cdot\text{h}^{-1}$). ^{125}I labeled Fib is then injected (step 4) at various concentrations (from 0 to $82 \text{ mg}\%$ (w/w)), during 2.38 h at a flow rate of $2.5 \text{ cm}^3\cdot\text{h}^{-1}$. The signal in Figure 1 was obtained with a Fib* solution of bulk concentration $41.1 \text{ mg}\%$. We see that the radioactivity stays approximately constant at the end of step 4, indicating that the system has reached equilibrium. This was not the case for the lower Fib* solution concentrations, but since in the system IgG*/Fib we will compare the quantities of IgG* released in the same interval of time, it is here not of great importance to attain the thermodynamic equilibrium (what would take a very long time at these low concentrations). The experiment is completed by a PBS rinse of the Fib* solution (step 5, Figure 1), at a flow rate of $2.5 \text{ cm}^3\cdot\text{h}^{-1}$ during 1.52 h. The solutions injected are collected in a container placed on an electronic balance, allowing a precise continuous recording of the weight (i.e. the volume) as function of time. The flow rates are calculated from the slope of the resulting lines.

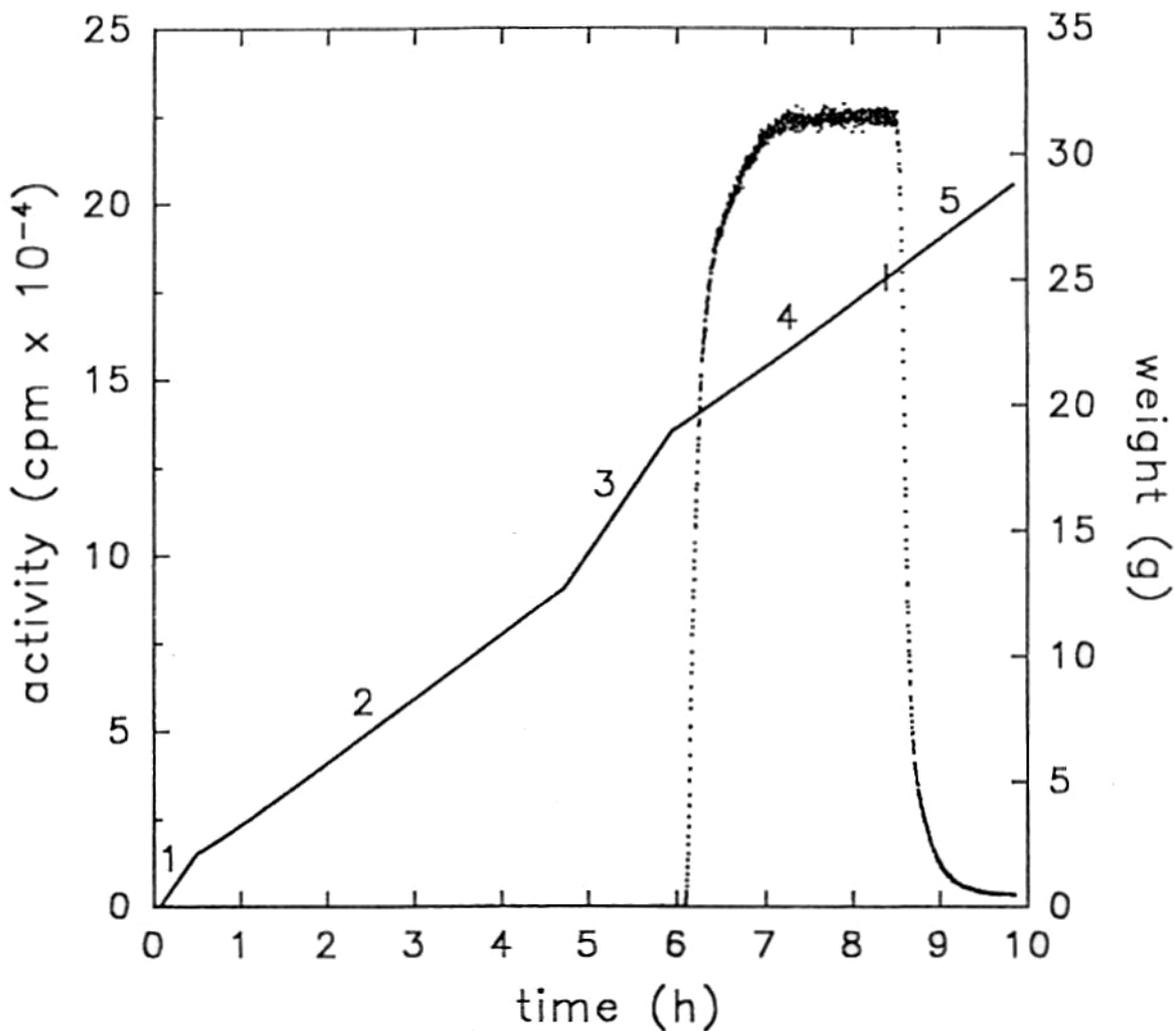


Figure 1. Dots: Evolution of the detected radioactivity ($\text{cpm} \cdot 10^{-4}$) versus time in a typical IgG/Fib* exchange experiment. Full line: Weight (g), i.e. volume, of solutions injected versus time. The flow rates (fr) are calculated from the slope of these straight lines. Step 1: PBS buffer injection (fr: $5.0 \text{ cm}^3 \cdot \text{h}^{-1}$); step 2: unlabeled IgG injection (fr: $2.5 \text{ cm}^3 \cdot \text{h}^{-1}$, during 4.22 h, bulk concentration: $\approx 10.6 \text{ mg}\%$); step 3: replacement of the solution by pure PBS buffer (fr: $5.0 \text{ cm}^3 \cdot \text{h}^{-1}$, during 1.23 h); step 4: labeled Fib injection at bulk concentrations varying between 0 and 82 mg% (fr: $2.5 \text{ cm}^3 \cdot \text{h}^{-1}$, during 2.38 h); step 5: PBS rinse of the Fib solution (fr: $2.5 \text{ cm}^3 \cdot \text{h}^{-1}$, during 1.52 h).

The increase in activity at the end of this step (which will be called Δa), in comparison with the background noise (given in step 1, or 2 or 3 in the case of the initial injection of unlabeled IgG), is directly related to the amount of adsorbed Fib* molecules. The method we used to calculate the adsorbed labeled protein amounts was described earlier (BOUM92): for each adsorption experiment, one measures the difference of the signal between step 4 (just before the rinsing step) and step 5 (at the end of the PBS rinse); this difference (ΔA) corresponds approximately to the radioactivity due to the protein amount present in the bulk solution. The interfacial protein concentration (Γ) is then given by the relation (Eqn 2):

$$\Gamma = 0.5 \cdot R \cdot C_{\text{bulk}} \cdot (\Delta a / \Delta A) \quad (2)$$

where R is the tube radius ($R = 0.085$ cm) and C_{bulk} ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$) the protein solution concentration determined by absorbance at 280 nm.

This method has the disadvantage that it could be affected by the desorption of any weakly bound protein layer during the rinsing step, i.e. leading to an overestimation of the value of ΔA . On the other hand, the method presents the advantage that calibration is made for each individual experiment, allowing for intrinsic apparatus electronic variations. The error on Γ could be estimated from the values of Γ_{IgG^*} taken from our experiments. We obtained a mean value of Γ_{IgG^*} (at a solution concentration of 10.0 mg%) of 0.50 ± 0.06 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$, with a relative error thus equal to about 10%.

In order to analyze the corresponding quantities of IgG molecules released during the exchange process with the Fib molecules, we performed a series of experiments in which IgG molecules were labeled, whereas Fib was injected as a cold solution (concentrations varying from 25 to 62 mg%), with the same time and flow rate conditions as in the IgG/Fib* experiments. The leaving IgG* amounts were evaluated by taking the difference in the signal between the end of step 3 and the end of step 5 (Figure 1, with a signal obtained with labeled IgG molecules).

The quantitative analysis of the experimental data was performed on the IgG* leaving the surface by desorption or exchange with Fib molecules, and not on experiments during which Fib* molecules are adsorbed by an exchange process with IgG. Indeed, the determination of kinetic constants in IgG/Fib* experiments would have required the knowledge of the precise law describing the filling of the tube with a labeled Fib solution without any adsorption of the protein onto the surface, in order to subtract this contribution from the whole signal of Fib* adsorption.

Figure 2a represents the typical signal of an IgG*/Fib exchange experiment. Again, the same sequence of injections as in an IgG/Fib* experiment has been realized, excepted that, at the end of the experiment, there was no rinsing step with buffer (as in step 5, Figure 1): the cold Fib solution injection was carried out during 3.95 h (at bulk concentrations varying between 0 and ≈ 100 mg%), and the kinetics of the IgG* desorption-exchange process was studied during this step (step 4, Figure 2a). For two experiments, Fib injection was continued for about three days, in order to analyze the kinetics of either desorption or exchange within a long period. We chose to integrate the signal of radioactivity over 10 seconds per channel on the multichannel analyzer. This time corresponded to a good compromise between an acceptable kinetic time resolution and a sufficient signal "height" (in comparison with the background noise), depending on the specific activity of the labeled protein.

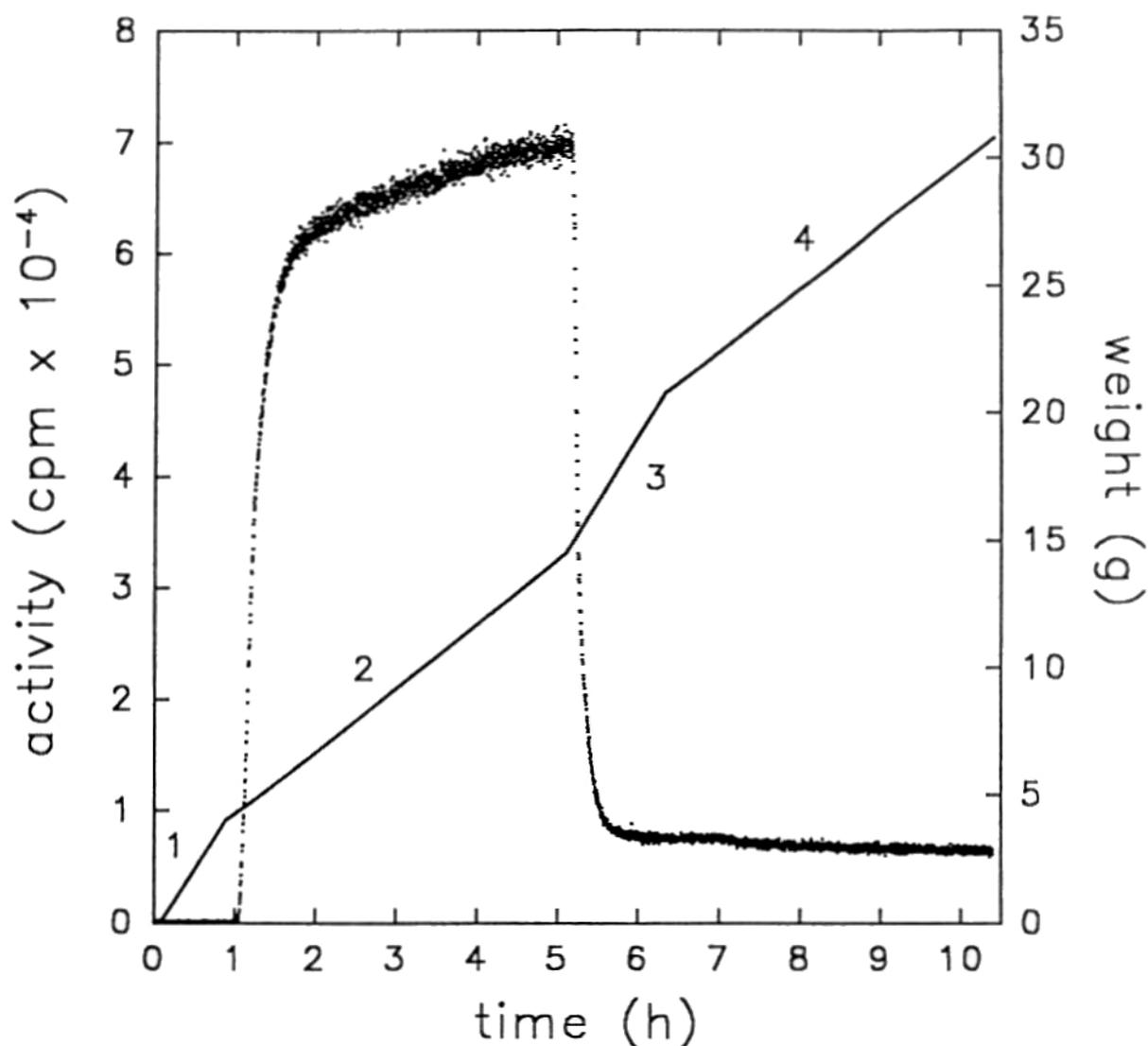


Figure 2a. *Dots:* Evolution of the detected radioactivity ($\text{cpm} \cdot 10^{-4}$) versus time in a typical IgG*/Fib exchange experiment (here: Exp. 4 (see Table I), where $C_{\text{bulk Fib}} = 26.4 \text{ mg}\%$). *Full line:* Weight (g), i.e. volume, of solutions injected versus time. *Step 1:* PBS buffer injection (fr: $5.0 \text{ cm}^3 \cdot \text{h}^{-1}$); *step 2:* labeled IgG injection (fr: $2.5 \text{ cm}^3 \cdot \text{h}^{-1}$, during 4.22 h, bulk concentration: $\approx 10.0 \text{ mg}\%$); *step 3:* replacement of the solution by pure PBS buffer (fr: $5.0 \text{ cm}^3 \cdot \text{h}^{-1}$, during 1.23 h); *step 4:* unlabeled Fib injection at bulk concentrations varying between 0 and $\approx 100 \text{ mg}\%$ (fr: $2.5 \text{ cm}^3 \cdot \text{h}^{-1}$, during 3.95 h or longer). The kinetics of the desorption/exchange process of the IgG* molecules is studied in step 4.

Figure 2b shows an enlargement of the end of the signal of Figure 2a. A problem we encountered was linked to our experimental setting. Indeed, the alternate injection with two syringe pumps required to flow the cold Fib solution through the Teflon tubing that was used for the injection of the labeled IgG molecules. In fact, an extensive rinsing of this part of the tubing with PBS buffer towards the waste vessel was not sufficient, because IgG* molecules remain adsorbed on the walls and desorb by exchange with the Fib molecules. The injected Fib solution thus carries these IgG* molecules along towards the silica tube, the arrival being materialized by an enhancement of the signal when starting step 4 (between arrows 1 and 2, Figure 2b). This overshoot interferes with the beginning of the decrease in the signal due to the desorption-exchange mechanism. We could reduce this artifact by cleaning the tubing upstream from the 3-way valve (during step 3, Figure 2a) with Hellmanex 2% and H₂SO₄ 10% solutions, and by systematically flowing the cold Fib solution towards the waste vessel during 20 minutes at 2.5 cm³·h⁻¹ before injecting it into the tube. But this effect could not be avoided between the valve and the tube, this part being of course inaccessible while flowing the buffer during step 3. This is why we chose in all desorption-exchange experiments to start the kinetic analysis at time $t_0 = 50$ min (arrow 2) after the beginning of Fib injection (arrow 1, Figure 2b). This time was considered to be sufficient to go past this side effect, so that it could not affect the investigated process.

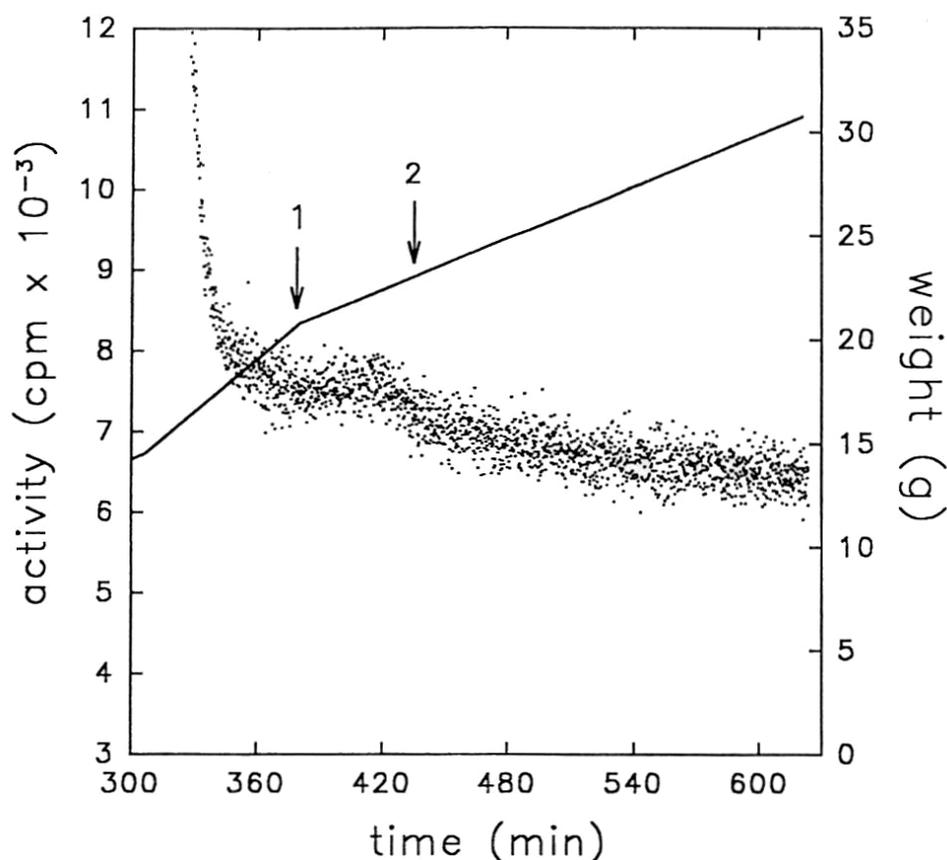


Figure 2b. Enlargement of the end of the experiment of Figure 2a, in the time interval 300-625 min. The two arrows indicate, 1: the start of step 4 (injection of the Fib solution, here at 26.4 mg%) and 2: the time (t_0) chosen in all desorption/exchange experiments to begin the kinetic analysis, i.e. 50 min after the beginning of Fib injection (see text for explanations). Notice the slight increase of the signal between the two arrows.

Results and discussion

IgG isotherm. A series of experiments consisted of first adsorbing IgG molecules on the bare silica surface. Figure 3 shows the isotherm of human IgG realized in the same conditions, i.e. adsorption at a flow rate of $2.4 \text{ cm}^3\cdot\text{h}^{-1}$ during 4.2 h, followed by a PBS rinse of 1.23 h at $4.8 \text{ cm}^3\cdot\text{h}^{-1}$. The plateau was reached for a value of the surface concentration (Γ) of $0.78 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$. This corresponds to a coverage of 47% for an "end-on" and 250% for a "side-on" configuration for ellipsoid dimensions for the IgG molecule of $23.5 \times 4.4 \times 4.4 \text{ nm}^3$ (QUAS89). One can thus assume that the surface is totally covered by IgG molecules and that a large fraction of these molecules is adsorbed in an end-on configuration. The value of Γ corresponding to a surface covered by IgG molecules all adsorbed in a side-on configuration on the surface would be of the order of $0.32 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$. The corresponding C_{bulk} value extrapolated from the isotherm is of $\approx 3 \text{ mg}\%$, indicating that a very low IgG concentration, under our experimental conditions, would be sufficient to attain total surface coverage.

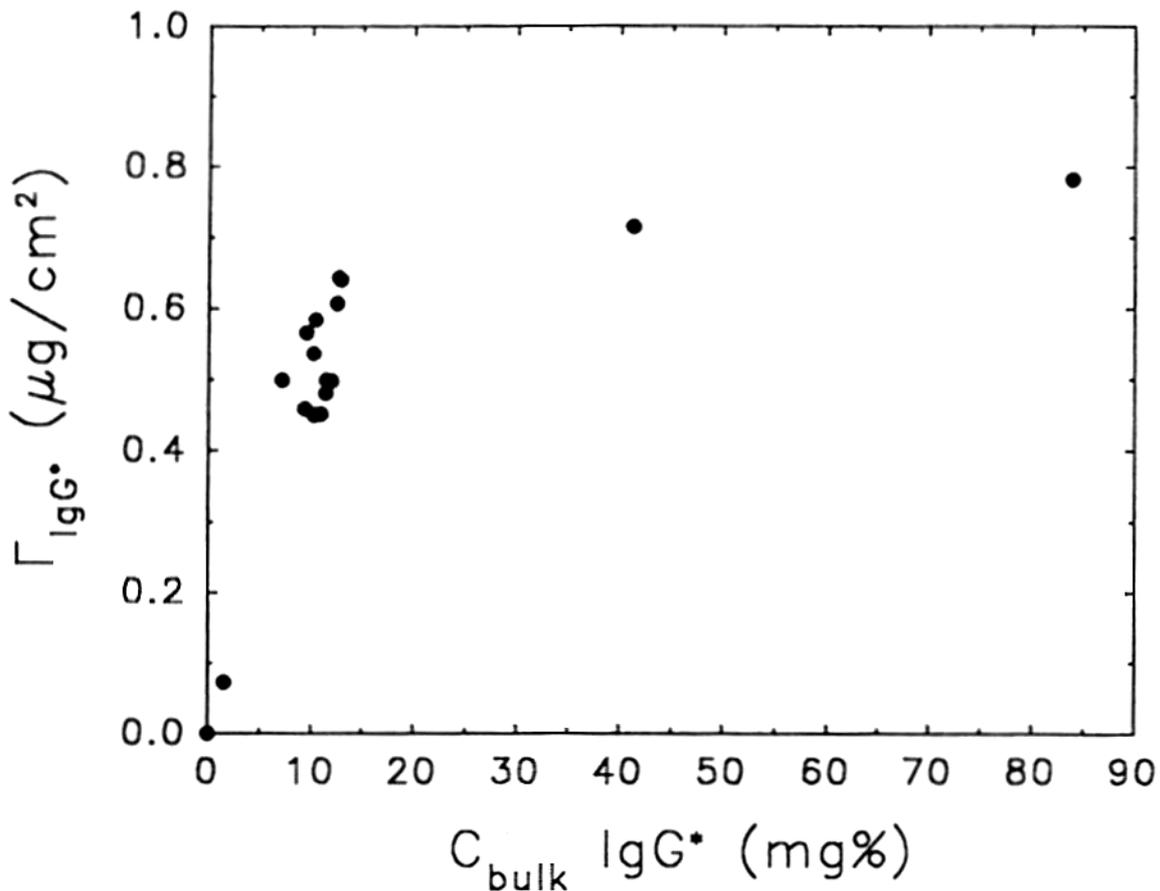


Figure 3. Adsorption isotherm of human IgG onto silica at a flow rate of $2.4 \text{ cm}^3\cdot\text{h}^{-1}$ during 4.2 h (followed by a PBS rinse of 1.23 h at $4.8 \text{ cm}^3\cdot\text{h}^{-1}$). Each point represents an independent experiment.

We analyzed more precisely the kinetics of adsorption in an experiment in which the IgG* molecules were injected at 7.3 mg%: the signal increased linearly after a time at which the filling of the tube was achieved. The slope (S_{exp}) of this line could thus be determined and the experimental rate constant of adsorption, k_{exp} , calculated by the relation (Eqn 3, (BOUM92)):

$$k_{\text{exp}} = C_{\text{bulk}}^{-1} \left(\frac{d\Gamma}{dt} \right)_{\text{exp}} = \left(\frac{0.5R}{\Delta A} \right) \cdot S_{\text{exp}} \quad (3)$$

We obtained for k_{exp} a value of $5.93 \cdot 10^{-7} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$. The Lévêque model (LEVE28), which considers the extreme case of complete control of the kinetic process by diffusion of the molecules to the interface, allows to compare k_{exp} to the Lévêque constant k_{Lev} , given by the relation (Eqn 4):

$$k_{\text{Lev}} = C_{\text{bulk}}^{-1} \left(\frac{d\Gamma}{dt} \right)_{\text{Lev}} = 0.54 D^{2/3} \gamma^{1/3} z^{-1/3} \quad (4)$$

D represents the diffusion coefficient, equal to $4 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ for the IgG, γ is the shear rate, equal to 1.43 s^{-1} at the flow rate of this experiment ($2.48 \text{ cm}^3 \cdot \text{h}^{-1}$), and z is the distance to the tube entrance, equal to 10.75 cm at the center of the detector. We found $k_{\text{Lev}} = 1.5 \cdot 10^{-5} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$, which is about 25 times higher than the k_{exp} value. We can thus conclude that, at this shear rate, the process is not controlled by transport to the interface, but is surface controlled.

Hence, we chose to adsorb the IgG molecules at a bulk concentration of about 10 mg% (Figure 3), i.e. at $\Gamma \approx 0.5 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$, where the molecules are present on the surface in a mixture of both "side-on" and "end-on" conformations. From Figure 2a we see that, at the end of step 2, the signal begins to level off, i.e. to reach an equilibrium.

Desorption and exchange kinetics. We investigated first the dynamical behavior of the system under study in the long time range. Thus, for experiment 1 (Table I), the kinetics of desorption of IgG* molecules was analyzed over a period of ≈ 3 days by flowing PBS buffer into the silica tube (step 4, Figure 2a). The obtained data (Figure 4a) are a sampling of every ten points, and one can already observe that the process is rapid at the beginning of the signal, whereas it becomes much slower after a few hours.

At this point of our study, we tried to adjust the experimental data by the simple decreasing exponential function: $\Gamma^* = A \cdot \exp(-k \cdot t) + B$ (Γ^* being the rough signal), but this function fitted the data very badly at the short time period. On the other hand, the whole signal could be correctly adjusted with a double exponential function of the form (Eqn 5):

$$\Gamma^* = A \cdot \exp(-K_1 \cdot t) + B \cdot \exp(-K_2 \cdot t) + \Gamma_{\infty}^* \quad (5)$$

where A and B are constants, K_1 and K_2 two characteristic rate constants, and Γ_∞^* the signal which would be obtained at time $t = \infty$ (t_∞) (Figure 4a, continuous line). Parameter values are collected in Table II (Exp. 1).

Table I. Experimental data obtained from IgG*/Fib exchange experiments.

Exp	Γ_{IgG^*} ($\mu g \cdot cm^{-2}$)	$C_{bulkFib}$ (mg%)	K_1 (min^{-1})	K_2 (min^{-1})	Pop. 1 (%) ⁽¹⁾ : $\Gamma_1^{0*} \cdot 100 / (\Gamma_0^* - BN)$	Pop. 1 (%) ⁽²⁾ : $\Gamma_1^{0*} \cdot 100 / (\Gamma_0^* - \Gamma_\infty^*)$	Pops. 1+2 (%) ⁽³⁾ : $(\Gamma_0^* - \Gamma_\infty^*) \cdot 100 / (\Gamma_0^* - BN)$
1	0.46	0	0.006620	0.000376	7.5	20.1	36.4
2	0.48	0	0.006702		6.0	17.7	32.6
3	0.45	10.0	0.011447		12.8	38.2	32.5
4	0.45	26.4	0.012710		14.2	37.4	37.3
5	0.45	≈ 28.4	0.009991	0.000376	19.4	45.9	40.8
6	0.45	51.0	0.017658		14.5	35.6	39.9
7	0.50	76.3	0.019611		19.5	37.1	50.4
8	0.50	101.5	0.027338		21.1	29.5	68.7

K_1 and K_2 : exchange/desorption rate constants obtained by adjusting the signal with the function: $\Gamma_1^{0*} \cdot \exp(-K_1 t) + (\Gamma_0^* - \Gamma_1^{0*} - \Gamma_\infty^*) \cdot \exp(-K_2 t) + \Gamma_\infty^*$. ⁽¹⁾: Percentage of the initially adsorbed IgG* amount which is exchangeable and/or rapidly desorbable ("population 1" in the text). BN: background noise. ⁽²⁾: Percentage of the released amount of IgG* molecules at t_∞ represented by "population 1". Γ_1^{0*} and Γ_0^* are calculated at time $t = t_0 - 30$ min (see text explanations). ⁽³⁾: Percentage of the initially adsorbed IgG* amount which is released at t_∞ (sum of populations "1" and "2").

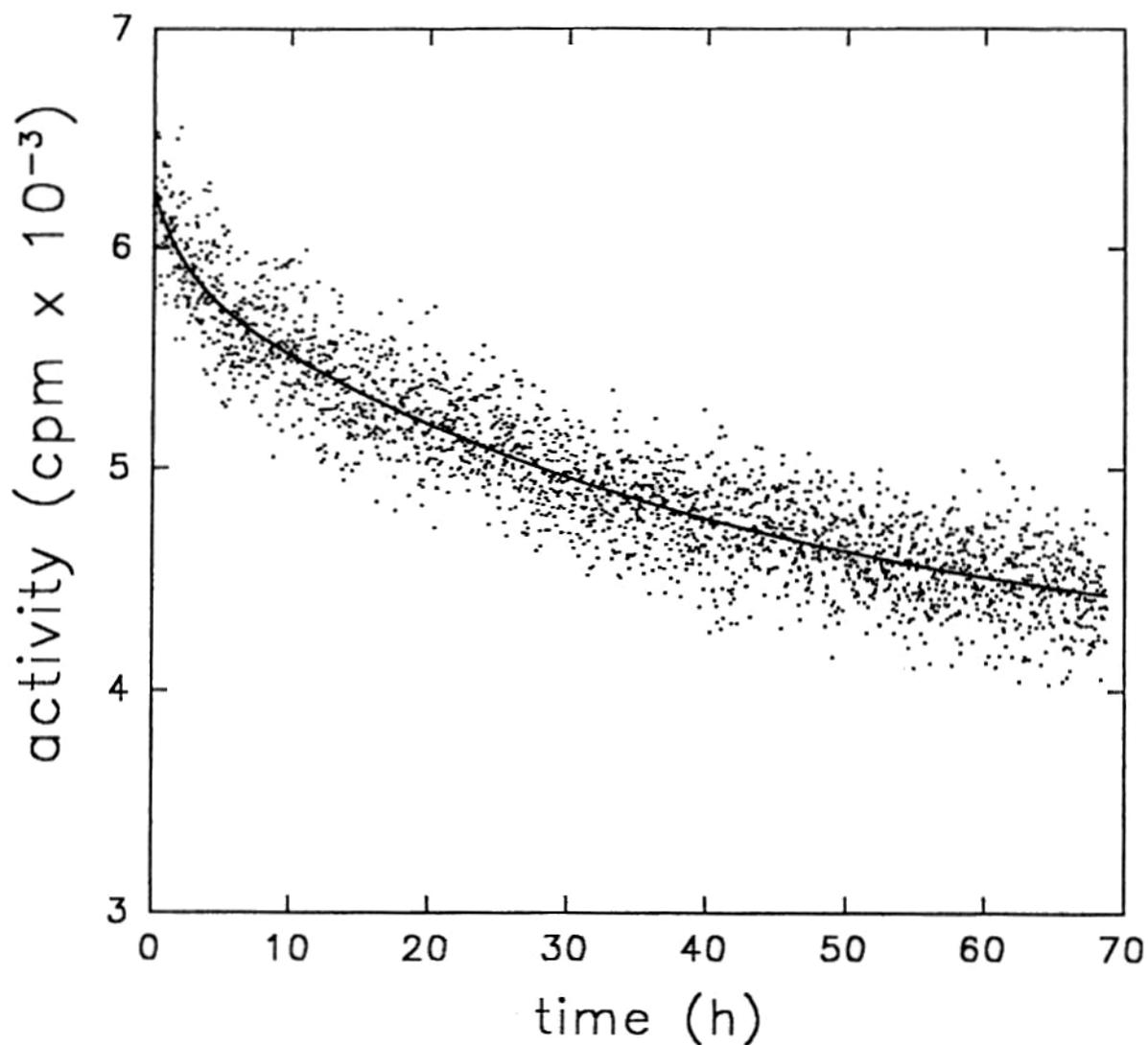


Figure 4a. Experiment 1 (Table I): kinetics of desorption of IgG* molecules. Pure PBS buffer was flowed into the silica tube over a period of ≈ 3 days (step 4, Figure 2a). The experimental data were adjusted with Eqns 5 and 7.

Table II. Values of the parameters corresponding to the adjustment of the data of Exps 1 and 5 with Eqn 6.

Parameter	Exp. 1	Exp. 5
A (cpm)	371	534
B (cpm)	1824	960
K_1 (min^{-1})	0.006585	0.010040
K_2 (min^{-1})	0.000375	0.000377
Γ_{∞}^* (cpm)	4035	2653

We see that K_1 is about 18 times greater than K_2 , revealing that two distinct regimes arise. This shows that two distinct populations of IgG molecules are present on the surface: a loosely associated fraction, representing a few percent of the total desorbable material, and a second more tightly anchored IgG population. This observation is in agreement with the results of Beissinger and Leonard (BEIS80).

The same conclusions could be drawn in an experiment in which we studied the kinetics of desorption of IgG* molecules in the presence of Fib molecules, over long times (Exp. 5, Table I): instead of PBS buffer, the unlabeled Fib solution was flowed into the silica tube at a mean C_{bulk} of 28.4 mg%. Every ≈ 16 hours, corresponding to a volume of ≈ 40 ml injected, a Fib solution was freshly prepared and flowed without interruption. At $t = t_0 + 65.5$ h, pure PBS buffer was injected during 8 hours (at the same flow rate as for Fib), to measure if this would cause an apparent change in the behavior of the signal, what was not the case. Again, a fast and a slow mechanism could be distinguished (Figure 4b). As in Exp. 1, the data were adjusted with Eqn 5 (Figure 4b, continuous line) and parameter values are given in Table II (Exp. 5). K_1 is here about 27 times larger than K_2 . Hence, we can conclude that in the presence of Fib molecules too, there are two desorption processes, a rapid and a slow one, defined by two characteristic times. Furthermore, and even if one experiment is not sufficient, this result is compatible with the two exponential function given in Eqn 5, which comes very close to explaining the whole phenomenon.

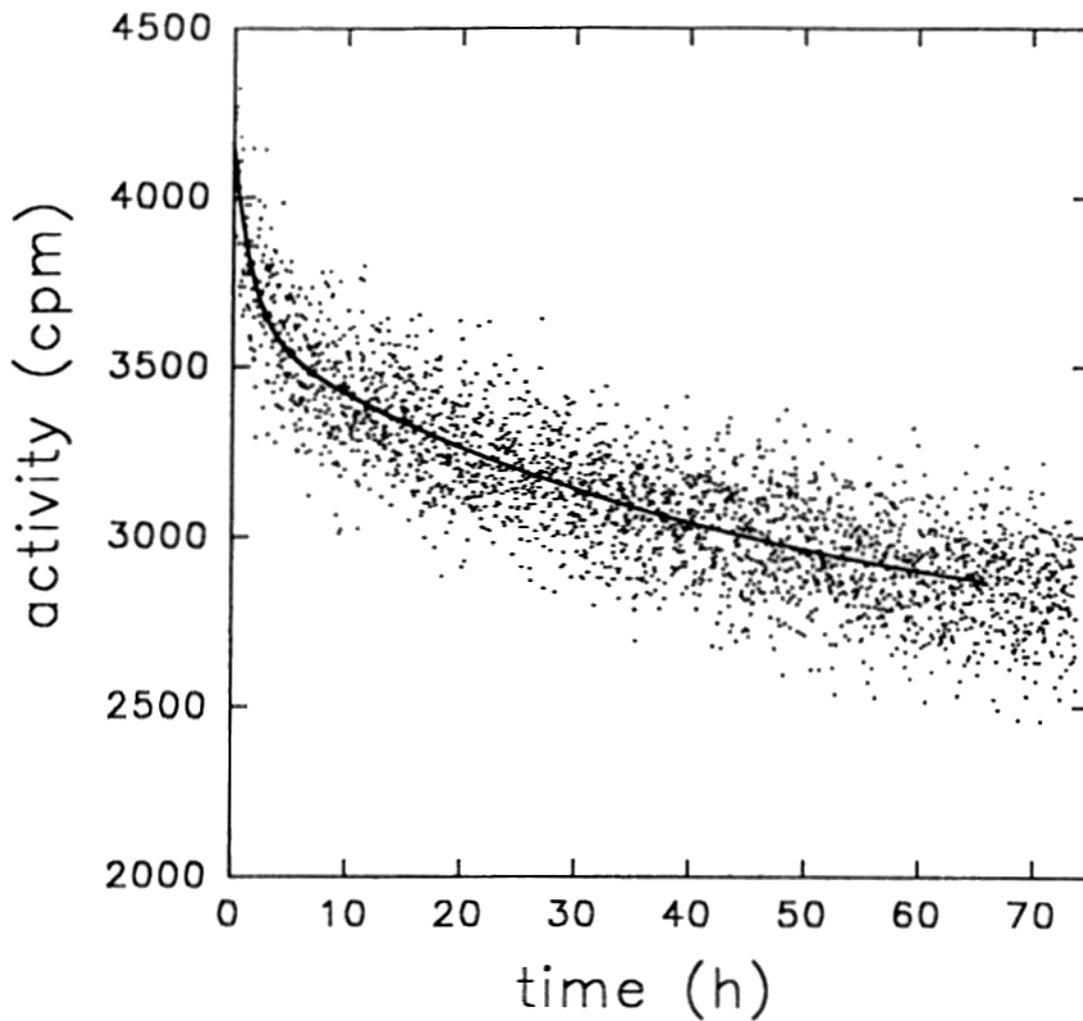


Figure 4b. Experiment 5 (Table I): kinetics of desorption-exchange of IgG* molecules. The unlabeled Fib solution ($C_{\text{bulk}} \approx 28.4 \text{ mg}\%$) was flowed into the silica tube over a period of ≈ 3 days. At $t = t_0 + 65.5 \text{ h}$ (end of continuous line), injection was followed by pure PBS buffer (same flow rate) during 8 hours, what seemed not to affect the evolution of the process. *Continuous line:* data were adjusted with Eqns 5 and 7 in the interval of time $t_0 - 65.5 \text{ h}$. *Figures 4a and 4b:* K_1 and K_2 parameter values are given in Table I or II. Only one over 10 points is represented. The shown activity is corrected by taking into account the natural radioactive decrease of ^{125}I .

As it appears in Table II, these experiments lead to two important results: (i) for the long time periods, the characteristic time K_2 is the same (mean value: $0.000376 \text{ min}^{-1}$) in the presence or absence of Fib molecules. This reveals that exchange happens during the first few hours, i.e. is entirely contained in the rapid process, followed by a slow desorption mechanism independent of the Fib solution concentration. The corresponding relaxation time $\tau_2 = 1/K_2 \approx 44$ hours. We could imagine that for Exp. 5, K_2 is a slow exchange rate constant, with a "desorption-like" profile of the signal, but the two equal K_2 values we obtained make this hypothesis highly improbable. Nevertheless, readsorption of Fib may occur on the sites made free by desorption of the IgG*. (ii) The characteristic time for the rapid process is shorter in the presence of Fib molecules: let us focus our attention on this particular aspect.

We have seen that the use of two exponentials allows to describe our experimental data. We propose a model (that we shall develop precisely at the end of this discussion) in which the rapid desorption or desorption/exchange process can be distinguished from the slow one enough to consider that the resulting signal is the sum of both contributions. Hence, we have supposed that the signal of the population of rapidly desorbable or exchangeable IgG* molecules ("population 1") starts from Γ_1^{0*} and tends towards zero, whereas for the slow mechanism ("population 2"), the signal starts from $\Gamma^{0*} - \Gamma_1^{0*}$ and tends towards Γ_{∞}^* , with Γ^{0*} the signal corresponding to the initial amount of IgG* molecules adsorbed on the surface. On the basis of this scheme, the following rate equation can be written (Eqn 6):

$$\frac{d\Gamma^*}{dt} = \frac{d\Delta\Gamma_1^*}{dt} + \frac{d\Delta\Gamma_2^*}{dt} = -K_1 \cdot \Delta\Gamma_1^* - K_2 \cdot \Delta\Gamma_2^* \quad (6)$$

where $\Gamma^* = \Delta\Gamma_1^* + \Delta\Gamma_2^* + \Gamma_{\infty}^*$, $\Delta\Gamma_1^*$ and $\Delta\Gamma_2^*$ being fractions of populations 1 and 2 remaining at time t. The preceding analysis allows us then to integrate each term of Eqn 6 separately, as a sum of two distinct evolutions (even if they are perhaps not to be considered as totally independent). With the definition of the boundary conditions we made, we obtain (Eqn 7):

$$\Gamma^* = \Gamma_1^{0*} \cdot \exp(-K_1 \cdot t) + (\Gamma^{0*} - \Gamma_1^{0*} - \Gamma_{\infty}^*) \cdot \exp(-K_2 \cdot t) + \Gamma_{\infty}^* \quad (7)$$

the preexponential factors replacing A and B in Eqn 5. This is the relation that we used to adjust all the experimental desorption/exchange data obtained at various Fib bulk concentrations. The two studies realized over 3 days (desorption, Exp. 1, Table I, and desorption/exchange, Exp. 5, Table I), are shown in Figures 4a and 4b with their respective curve fit realized with Eqn 7, which superimposed on the one realized with Eqn 5. An adjustment was made on the entire sampling of points (the figures only show one over 10 points, in a concern for clarity). The parameter values (K_1 and K_2 values are reported in Table I) were thus determined with great precision.

For all the other experiments we performed, we concentrated our attention on the study of the desorption/exchange process over a period of about 190 min, starting from t_0 . The data were adjusted using Eqn 7, by imposing for K_2 the found value $0.000376 \text{ min}^{-1}$. Γ_{∞}^* being

badly defined, the degree of freedom on Γ_1^{0*} and Γ_∞^* was high. This could, however, not affect the value of K_1 , because the parameters Γ_1^{0*} and Γ_∞^* compensated mutually in a way the data had to be fitted correctly, with the given K_2 . The curvature of the signal taken in the first hours is of course well representative of K_1 .

The values of the first rate constant K_1 determined at various Fib bulk concentrations are reported in Table I. The corresponding relaxation times $\tau_1 = 1/K_1$ are comprised in the interval 0.6-2.5 hours. These results are plotted in Figure 5. The straight line corresponds to a least-squares fit realized within a confidence interval of 95% (the two dotted lines define the limits): this shows that K_1 varies linearly with the Fib solution concentration.

The lack of precision in the preexponential parameters in Eqn 7 implies that population 1 could not be estimated precisely, except for experiments 1 and 5. Hence, in order to refine the value of these parameters, we adjusted again the signals of Exps 1-8 by imposing the value of K_1 extrapolated from the line obtained in Figure 5, at each corresponding C_{Fib} value of an experiment (K_2 was fixed at its found value). With these new values, we calculated then the value of the parameters Γ^{0*} and Γ_1^{0*} , with the help of Eqn 7, at time $t = -30$ min, i.e. 30 min before t_0 . This time is an evaluation of the real time at which the IgG* desorption process begins, after a time interval necessary for the Fib solution to enter the tube and to attain the bulk equilibrium concentration.

This allowed us to estimate accurately the percentages of the initially adsorbed IgG* amount which is exchangeable and/or rapidly desorbable (population 1) ($(^1)$, Table I) as well as the percentage of the released amount of IgG* molecules at t_∞ ($(^2)$, Table I) represented by this population, for all experiments. We see that it is difficult to analyze these values, despite the refinement of the parameters. However, if we compare the values obtained in the presence of Fib to the ones obtained when $C_{\text{Fib}} = 0$, we find mean percentages of 37% and 19%, respectively, when population 1 is compared to the total released IgG* amounts at t_∞ . On the other hand, if one compares the variation of population 1 ($(^1)$, Table I) and of the sum of populations 1 and 2 (total amount of IgG* released at t_∞ , $(^3)$, Table I) as a function of Fib concentration, with respect to the initially adsorbed IgG* amount, we remark a correlated increase of the percentages.

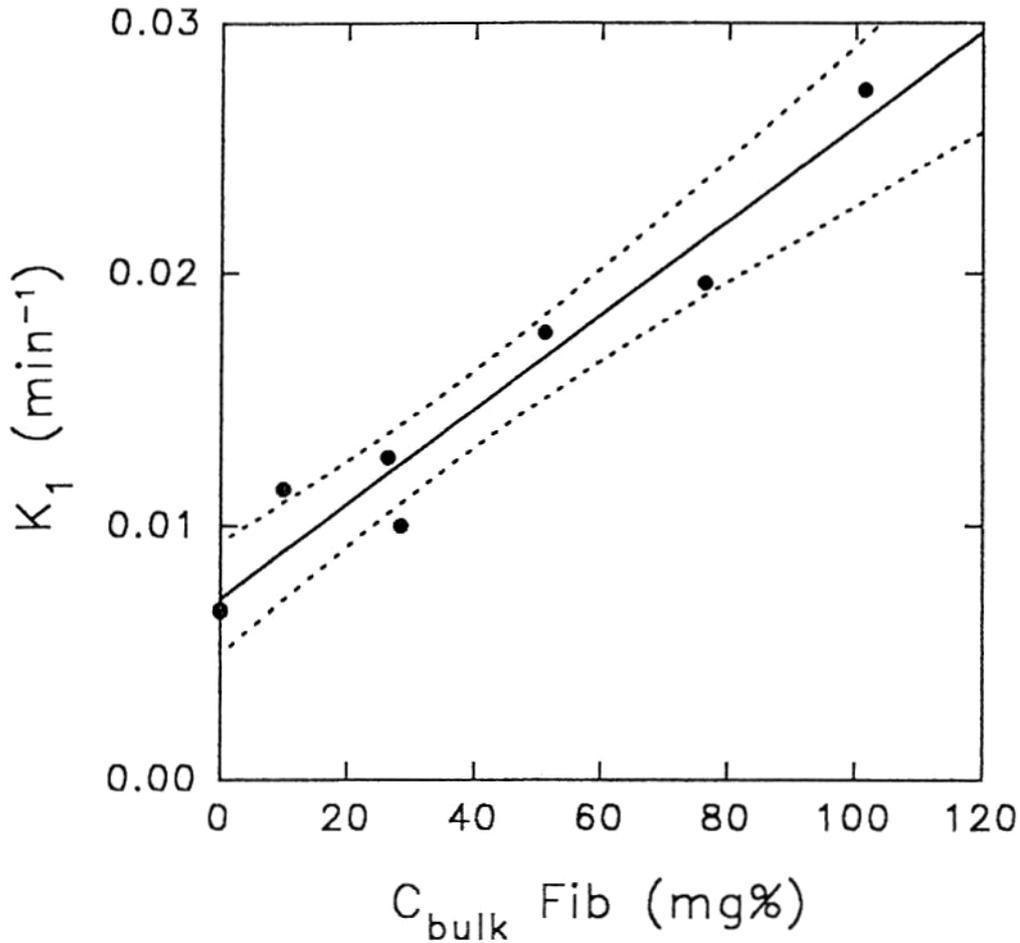


Figure 5. Linear variation of K_1 versus $C_{\text{bulk}} \text{ Fib}$. Straight line: least-squares fit. Limit lines: confidence interval of 95%.

In order to evaluate the signification of the Fib bulk dependence on K_1 , let us write a model based on the present results. As we already have seen, we can consider, for both desorption and exchange mechanisms, two distinct IgG^* populations: one easily desorbable and/or exchangeable (denoted by the indice 1), and the other more tightly bound to the surface (denoted by the indice 2). All the following reactions may be considered as totally irreversible, since the flux carries the desorbed IgG^* molecules out of the tube. Thus, the reverse paths are neglected in the equilibria.

The desorption and exchange processes can be described by the following two reactions (Eqns 8 and 9):



with k_{d1} and k_{d2} the rapid and slow desorption rate constants, respectively, and k_e the exchange rate constant. The indice "ads" denotes a molecule in its adsorbed state. n can be a fractional number, only a part of the bulk Fib molecule being thus implied in the exchange process with an adsorbed IgG* molecule, i.e. one Fib would interact with more than one IgG* on the surface. An IgG* released bulk molecule can be in different states, i.e. more or less denatured, depending on its time residence on the surface, its initial conformation, and for exchange, on the kind of interactions with a Fib molecule. The total amount of desorbable ((des)) molecules, which tends towards zero at t_{∞} , varies as (Eqn 10):

$$\frac{d\Delta\Gamma_{\text{IgG}^*}(\text{des})}{dt} = \frac{d\Delta\Gamma_{\text{IgG}_1^*}(\text{des})}{dt} + \frac{d\Delta\Gamma_{\text{IgG}_2^*}(\text{des})}{dt} = -k_{d1} \cdot \Delta\Gamma_{\text{IgG}_1^*} - k_{d2} \cdot \Delta\Gamma_{\text{IgG}_2^*} \quad (10)$$

whereas the rate equation for exchange ((exch)) is (Eqn 11):

$$\frac{d\Delta\Gamma_{\text{IgG}^*}(\text{exch})}{dt} = \frac{d\Delta\Gamma_{\text{IgG}_1^*}(\text{exch})}{dt} = -k_e \cdot C_{\text{Fib}}^n \cdot \Delta\Gamma_{\text{IgG}_1^*} \quad (11)$$

Hence, the total variation of the signal is described by the sum of these desorption and exchange rates, i.e. (Eqn 12):

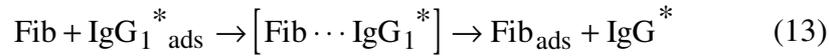
$$\frac{d\Delta\Gamma_{\text{IgG}^*}}{dt} = -\left(k_{d1} + k_e \cdot C_{\text{Fib}}^n\right) \Delta\Gamma_{\text{IgG}_1^*} - k_{d2} \cdot \Delta\Gamma_{\text{IgG}_2^*} \quad (12)$$

We see that Eqn 12 is the analytical expression of Eqn 6, accounting for the qualitative meaning of the two parameters K_1 and K_2 ($K_2 = k_{d2}$, as demonstrated in experiments 1 and 5). Let us return now to Figure 5: the variation is, as represented, clearly linear. This proves that n , the order of the exchange reaction with respect to the Fib molecules in solution, is one. The slope of the line in Figure 5 allows to calculate the value of k_e , the exchange rate constant, which can be estimated at $(384 \pm 5) \times 10^3 \text{ liter}\cdot\text{mol}^{-1}\text{h}^{-1}$, for an initial Γ_{IgG^*} value of $\approx 0.50 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$. This result is to be compared with the one obtained for the homogeneous exchange process whereby γIgG molecules adsorbed onto latex particles were replaced by γIgG molecules from the bulk solution, where the kinetic constant k_e could be estimated at $(5.8 \pm 1.0) \times 10^3 \text{ liter}\cdot\text{mol}^{-1}\text{h}^{-1}$, for about the same initial Γ_{IgG^*} value (BALL94).

Furthermore, the order of the exchange reaction with respect to the adsorbed IgG molecules has to be one, since the form of the integrated rate equation is a double exponential:

this means that the process is governed by two regimes, each one being of order one with respect to the adsorbed molecules.

Consequently, the mechanism of exchange here implies the formation of a bimolecular transition Fib/IgG complex on the surface (Eqn 13):



k_e being the rate constant of the limiting step of this reaction.

Fixed Fib and exchanged IgG amounts at a given time.

We present in Figure 6 the results of the IgG/Fib* exchange experiments, and for comparison, the adsorption isotherm of Fib* onto the bare silica surface. For this isotherm, labeled Fib was injected at a flow rate of 2.4 cm³·h⁻¹ during 3.45 h, followed by a PBS rinse of 1.30 h at 4.8 cm³·h⁻¹. These conditions are slightly different from those of exchange experiments, but the evolution of the signal for Fib* adsorption was such that, at least for the high concentrations, there was no great difference in the signal within the last one hour time interval. Thus, this upper curve gives amounts of Fib* molecules that adsorb on the bare surface, which can be compared to the amounts adsorbed on a preadsorbed cold IgG layer (lower curve).

We adjusted the experimental data of the lower curve with the two exponential function (Eqn 14):

$$\Gamma_{\text{Fib}^*} = C - [A \cdot \exp(-(k_{d1} + k_{e1} \cdot C_{\text{Fib}^*}) \cdot (t_i + \Delta t)) + B \cdot \exp(-K_2 \cdot (t_i + \Delta t))] \quad (14)$$

where C, A and B are three constants, k_{d1} the origin ordinate (0.007125 min⁻¹) and k_{e1} the slope of the line in Figure 5 (0.000188 mg%⁻¹ min⁻¹), t_i the time of injection of the Fib* solutions (143 min) and Δt a time interval. Since the adsorption of Fib* molecules may go on a certain time during the rinsing step with buffer (step 5, Figure 1), and in order to take into account the influence of this further unknown time adsorption on the value of the parameters, we chose $\Delta t = 30$ min, i.e. 1/3 of the rinsing time. We made the assumption that the rate constant of the adsorption of Fib* molecules on the IgG layer is K_1 for a rapid process, and K_2 for a slow one, i.e. that the Fib* molecules adsorb at the same rates at which we found the IgG* molecules were released, for both regimes. This hypothesis is compatible with our results. The adjustment of the data (Figure 6) with Eqn 14 gives parameter values: A = 0.582, B = 0.872 and C = 1.12. The fact that B is significantly non equal to zero indicates that at long times, the Fib molecules adsorb on the surface sites made free after desorption of the IgG* molecules.

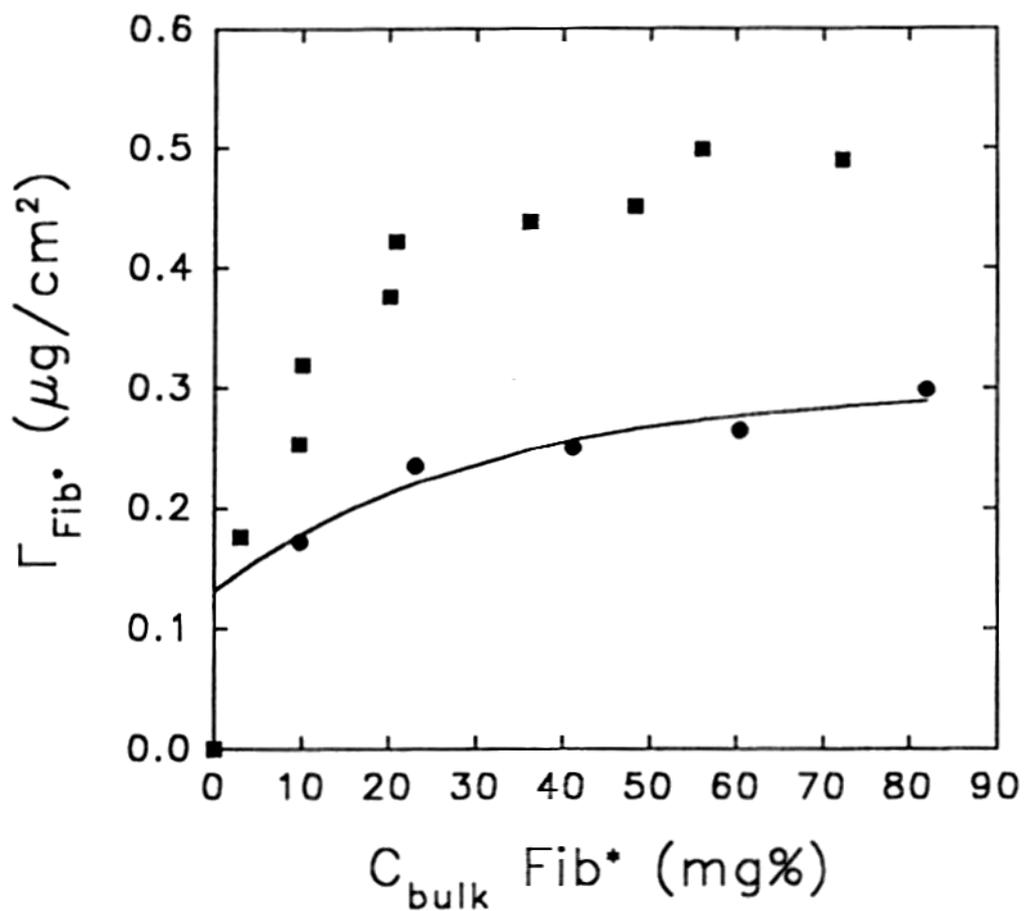


Figure 6. ■ : Adsorption isotherm of human Fib onto silica at a flow rate of $2.4 \text{ cm}^3 \cdot \text{h}^{-1}$ during 3.45 h (followed by a PBS rinse of 1.30 h at $4.8 \text{ cm}^3 \cdot \text{h}^{-1}$). ● : Amounts of labeled Fib molecules adsorbed on a cold IgG layer. The experimental procedure is those described in Figure 1. Data were adjusted by Eqn 14. Parameter values are: $A = 0.582$, $B = 0.872$ and $C = 1.12$. In both curves, each point results from an independent experiment.

An approach of the ratio between arriving Fib and leaving IgG molecules (F/I) consists in the comparison of the overall corresponding quantities of Fib and IgG implied in the exchange process at a given time. We performed a series of experiments in which we determined the amounts of IgG* molecules released from the surface by exchange or desorption, under exactly the same conditions as in the experiments realized with labeled Fib (Figure 6, lower curve). Data are given in Table III. Using Eqn 14, we can calculate, for each precise C_{bulk} value of Fib at which an experimental point was obtained, the corresponding amount of fixed Fib*. Hence, by taking into account the respective IgG and Fib molecular weights, we found a mean value F/I of the order of 1.2.

Table III. Ratio of arriving Fib* on leaving IgG* molecules (F/I).

$C_{\text{bulk}}\text{Fib}^*$ (mg%)	ΓFib^* ($\text{pmol}\cdot\text{cm}^{-2}$)	$\Delta\Gamma\text{IgG}^*$ ($\text{pmol}\cdot\text{cm}^{-2}$)	F/I
25.0	0.66	0.60	1.1
47.9	0.76	0.57	1.3
53.3	0.78	0.85	0.92
61.7	0.81	0.58	1.4

(*): Fib molecules are labeled or not (see text for experimental procedure). $F/I = \Gamma\text{Fib}^*/\Delta\Gamma\text{IgG}^*$.

Conclusion

In the present work, we have focused our attention on the study of the mechanism of exchange in the protein heterogeneous system IgG/Fibrinogen, under flow and on a hydrophilic silica surface. According to the presented model, three important conclusions can be drawn: (i) exchange occurs rapidly in the first few hours of the process, and despite the presence of the molecules in solution, is followed by a slow desorption mechanism governing the process. Exchange at long times thus seems to correspond to a desorption/adsorption mechanism. A rapid and a slow regime are observed too in the desorption signal; (ii) the order of the exchange reaction with respect to the Fib molecules in solution is one, and (iii) the order of the exchange reaction with respect to the IgG adsorbed molecules is one, implying the formation of a bimolecular transition complex on the surface. The value of k_e , the exchange rate constant, could be estimated at $(384 \pm 5) \times 10^3 \text{ liter}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. This result was reinforced by the analysis at a given time of the ratio F/I between arriving Fib and leaving IgG molecules, which was found to be of the order of 1. However, one has to keep in mind that these desorption and exchange rate constants are a function of Γ_{IgG^*} , the initial interfacial concentration of IgG* molecules, of which depend lateral interactions between them, as well as of the flow rate, i.e. the shear rate at the wall. Furthermore, K_1 may be a function of time, i.e. the time residence of the IgG* on the surface before injection of the Fib molecules. We proposed the existence of two distinct IgG* populations at the interface, but a continuum of IgG* populations present in various states or conformations could be imagined, the profile of which varying with time. All these dependencies will have to be defined in further experiments. Finally, the structure of the intervening molecules, the nature of the sorbent surface and all the physico-chemical parameters of an experiment are of great importance in such processes.

Conclusion générale

L'ensemble des travaux présentés dans ce mémoire a conduit à préciser un certain nombre de résultats concernant la réactivité de molécules d'anticorps vis-à-vis de leur antigène, lorsque celui-ci est adsorbé soit directement sur une surface de silice, soit par échange avec une protéine préadsorbée.

Dans le cas où l'antigène est adsorbé directement, nous sommes parvenus aux résultats suivants: par la technique de réflectométrie, nous avons obtenu pour les systèmes IgG/IgY, IgG/anti-IgG et Fib/anti-Fib des rapports molaires respectifs de 1:0.8, 1:1 et 1:5 ou 1:8. Cette technique nous a également fourni des renseignements qualitatifs sur la structure des couches protéiques adsorbées, comme par exemple la compaction de celles-ci lors du remplacement de la solution protéique par du tampon.

La réflectométrie à balayage angulaire est bien adaptée, grâce à l'information de l'épaisseur d'une couche de protéines adsorbées, à une évaluation qualitative de la réactivité entre des macromolécules biologiques. Ainsi, si l'anticorps réagit avec l'antigène, l'évolution du signal le démontre clairement et sans ambiguïté. Une telle information qualitative n'est pas directement accessible par la technique du marquage, mais celle-ci est parfaitement appropriée à une quantification précise de réactions indépendantes de la réaction proprement dite et influant sur le signal dans la détermination des rapports de réactivité molaires: par exemple la désorption des molécules d'antigène adsorbées, de façon spontanée ou par échange avec des anticorps de la solution, ou l'adsorption directe de ces derniers sur les sites libres de la surface, phénomènes difficiles, voire impossibles à détecter en réflectométrie.

Grâce à la technique du radiomarquage, nous avons pu quantifier de façon précise ces effets, et en prenant en compte la contribution des réactions secondaires, nous avons ainsi obtenu des rapports molaires de réactivité de 1:1.2 et 1.7, 1:0.3 et 0.56, ou 1:0 pour trois différentes solutions d'anti-Fib. Ces résultats ont par ailleurs mis en évidence un problème lié au radiomarquage lui-même. En effet, il s'avère que la méthode de couplage à l'iode de McFarlane altère la réactivité des anticorps de lapin par fixation covalente de l'iode 125 sur un résidu tyrosyle localisé sur le fragment Fab, la région impliquée dans la reconnaissance de l'antigène. Cette perte de réactivité a été confirmée par des tests d'immunoprécipitation en milieu liquide.

Dans le cas où l'antigène est adsorbé par échange, les résultats les plus démonstratifs ont été obtenus pour le système Fib/anti-Fib, pour lequel les premières molécules protéiques adsorbées étaient des molécules d'IgG. Nous trouvons que la réactivité de l'anticorps vis-à-vis de l'antigène échangé est conservée. L'approche par radioactivité au niveau du tube a été d'autant plus difficile à analyser quantitativement que le signal est fortement affecté par le problème du marquage soulevé précédemment. Par contre, cette propriété a été clairement établie par la technique de réflectométrie.

Ce résultat est en contradiction avec les conclusions proposées dans un travail antérieur (LUTA92), où une perte de réactivité entre IgG et IgY était notée lorsque les premiers atteignaient la surface par un processus d'échange avec de l'albumine humaine. Nous avons répété cette expérience en remplaçant les IgY par des IgG anti-IgG. A nouveau, une réactivité comparable à celle du système Fib/anti-Fib a été obtenue. Cette différence dans la réactivité détectée sur nos systèmes par rapport à celui d'E. Lutanie pourrait très bien être liée à des problèmes concernant l'état de la surface solide, lequel est difficilement reproductible.

Dans la dernière partie de notre travail, nous avons étudié le processus d'échange hétérogène dans lequel des molécules d'IgG adsorbées sur la surface de silice sont remplacées par des molécules de fibrinogène en solution. Grâce à la technique de radiomarquage à l'iode 125, les mécanismes de désorption et/ou d'échange ont été analysés *in situ* en employant soit des IgG marquées et du Fib non marqué, soit l'inverse. Une étude cinétique réalisée sur le signal des molécules d'IgG quittant la surface a démontré que (i) deux régimes existent, que l'on retrouve aussi bien dans les expériences de désorption que d'échange: un régime lent et un régime rapide, et dans le cas où des molécules de Fib sont présentes en solution, le

processus est gouverné par un mécanisme de désorption pure aux temps longs. Ceci semble indiquer qu'à ces temps, l'échange correspond à un mécanisme de désorption/adsorption; (ii) le processus de l'échange suit une loi cinétique du premier ordre, aussi bien par rapport aux molécules adsorbées que par rapport aux molécules en solution. La valeur de la constante de vitesse d'échange, k_e , ainsi obtenue, est: $(384 \pm 5) \times 10^3$ litre·mol⁻¹·h⁻¹. Nous avons complété cette étude par l'analyse à un temps donné du rapport entre la quantité de Fib arrivant sur la surface et la quantité correspondante d'IgG désorbées, lequel est égal à environ 1.2.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ABSO87 Absolom, D.R., Zingg, W. & Neumann, A.W. (1987) *J. Biomed. Mat. Res.* **21**, 161.
- AKAI79 Akaibe, T. & Sakurai, Y. (1979) *Polym. Prepr. Amer. Chem. Soc. Div. Polym. Chem.* **20**, 581.
- AMIT86 Amit, A. *et al.* (1986) *Science* , **233**, 747.
- ANDR85 Andrade, J.D., in « *Surface and Interfacial Aspects of Biomedical Polymers* » (J.D. Andrade, Ed.), Vol. 2, p.1, Plenum, New York, 1985.
- ANDR86 Andrade, J.D., and Hlady, V. (1986) *Adv. Polym. Sci.* **79**, 1.
- ARAI90 Arai, T. and Norde, W. (1990), *Colloids Surf.* **51**, 1.
- BALL94 Ball, V., Huetz, Ph., Elaïssari, A., Cazenave, J.-P., Voegel, J.-C. & Schaaf, P. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 7330-7334.
- BEIS80 Beissinger, R. L. and Leonard, E.F. (1980) *American Society for Artificial Internal Organs Journal* **3**, 160-175.
- BERG74 Bergmeyer, H.U., Bernt, E., Gawehn, K. & Michal, G. (1974), in *Methods of Enzymatic Analysis* , 2nd Ed., Bergmeyer, H.U. (ed.), Academic Press, New York, **1**, 169.
- BOCK78 Bock, P.E. & Frieden, C. (1978) *Trends Biochem. Sci.* **3**, 100.
- BOLT73 Bolton, A.E. & Hunter, W.M. (1973) *Biochem. J.* **133**, 529.
- BORC71 Borch, R.F., Bernstein, M.D. & Durst, H.D. (1971) *Journal of the American Chemical Society* **93:12**, 2897.
- BOUM92 Boumaza, F., Déjardin, Ph., Yan, F., Bauduin, F. & Holl, Y. (1992) *Biophys. Chem.* **42**, 87.
- BRAN44 Brand *et al* (1944) *J. Clin. Invest.* **23**, 439.
- BRAS69 Brash, J.L., Lyman, D.J. (1969) *J. Biomed. Mater. Res.* **3**, 175.
- BRAS79 Brash, J.L., Uniyal S. (1979) *J. Polym. Sci. Part C*, **66**, 377.
- BRAS83 Brash, J.L., Uniyal, S., Pusineri, C. & Schmitt, A. (1983) *J. Colloid Interface Sci.* **95**, 28.
- BRAS87 *Proteins at interfaces: Physico-chemical and Biochemical Studies* (J. L. Brash and T.A. Horbett, Eds.), ACS Symposium, Vol. 343. Amer. Chem. Soc., Washington, DC, 1987.
- CALD94 Caldwell, K.D., *Proceedings of the 207th ACS National Meeting*, « *Proteins at Interfaces* » , San Diego, 1994, à paraître.
- CAPE68 Capet-Antonini, F. (1968) *Contribution à l'étude de la structure du fibrinogène* , Thèse, Orsay, Paris.
- CASP54 Caspary, E.A. et Kekwick (1954) *Biochem. J.* **56**, XXXV.
- CHAN81 Chan, B.M.C., Brash, J.L. (1981) *J. Colloid Interface Sci.* **82**, 217.
- CHAR78 Charm, S.E. & Wong, B.L. (1978) *Biotechnol. Bioeng.* **20**, 451.
- COHN50 Cohn, E.J. *et al* (1950) *J. Am. Chem. Soc.* **72**, 465.
- COHNm50 Cohn, M.L., Deutsch, H.F. et Wetter, L.R. (1950) *J. Immunol.* **64**, 381.
- CREI89 « *Protein Function, a practical approach* » , Edited by T.E. Creighton, IRL Press, Oxford-New York-Tokyo (1989).
- CRUM63 Crumpton, M.J. et Wilkinson, J.M. (1963) *Biochem. J.* **88**, 228.
- DATH90 Dathe, M., Gast, K., Zirwer, D., Welfle, H. and Mehlis, B. (1990) *Int. J. Peptide Protein Res.* **36**, 344-349.
- DeBA83 De Baillou, N. (1983) *Thesis* , Strasbourg.
- DeFE78 De Feijter, J.A., Benjamins, J. & Veer, F.A. (1978) *Biopolymers* **17**, 1759.
- DeGE85 De Gennes, P.-G. (1985) *C. R. Acad. Sci. Paris II* **301**, 1399.
- DEJA94 Déjardin, Ph. (1994) *Colloids and Surfaces*, sous presse.

- DONO74 Donovan J.W., Mihalyi, E. (1974) *Proc. Nat. Acad. Sci., USA* , **71**, 4125.
- DOOL80 Doolittle, R.F., « Fibrinogen », *CRC Handbook Series in Clinical Laboratory Science* , section I: Hematology, vol. III, Seligson, D. et Schmidt, R.M. eds (1980) 3-14 (CRC Press, Florida).
- DOOL81 Doolittle, R.F. (1981) *Sci. Amer.* **245**, 126.
- ELDR64 Eldridge, J.S. & Crowther, P. (1964) *Nucleonics* **22**, 56.
- ELLI91 Ellingsen, J.E. (1991) *Biomaterials* **12**, 593.
- ENGV71 Engvall, E. & Perlmann, P. (1971) *Immunochemistry* **8**, 871.
- ESTI80 Estis, L.F., Haschenmeyer, R.H. (1980) *Proc. Nat. Acad. Sci., USA* **77**, 3139.
- FLOR67 Florkin, M. & Stolz, E.H. (eds) (1967) *Comprehensive Biochemistry* , Vol. **27**, Elsevier, Amsterdam.
- FOWL79 Fowler, W.E., Erickson, H.P. (1979) *J. Mol. Biol.* **134**, 241.
- FRAA91 Fraaije, J.G.E.M., Murriss, R.M., Norde, W. and Lyklema, J. (1991) *Biophysical Chemistry* **40**, I: 303-315, II: 317-327, III: Fraaije, J.G.E.M., Norde, W. and Lyklema, J. **41**, 263-276.
- GMEL31 Gmelin, L. (1931) *Handbuch der Anorganischen Chemie* : Jod, 8e Ed., Verlag Chemie G.m.b.H, Berlin, p. 442.
- GRAN77 Grant W.H., Smith L.E., and Stromberg R.R. (1977) *J. Biomed. Mater. Res. Symposium* **8**, 33-38.
- HALL59 Hall, C.E. & Slayter, H.S. (1959) *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **5**, 11.
- HAYN Haynes, C.A. and Norde, W., *Colloids Surf.: Biointerfaces*, in press.
- HAYN94 Haynes, C.A., Sliwinsky, E. and Norde, W. (1994) *J. of Colloid and Interface Sci.* **164**, 394-409.
- HEIM64 Heimburger, N. *et al* (1964) *Clin. Chim. Acta* **10**, 293.
- HIEM86 Hiemenz P.C., *Principles of colloid and surface chemistry* , Marcel Dekker, New York and Basel, 311 (1986).
- HOLL93 Holler, M. (1993) *Tetrahedron Letters* **34**:20, 3291.
- HURU80 Huru, A.L. & Chantler, S.M. (1980) *Methods Enzymol.* **70**, 104.
- HURW79 Hurwitz, F.I., Ph. D. Thesis, Case Western Reserve University, Cleveland, 1979.
- ISHI83 Ishikawa, E. *et al.* (1983) *J. Immunoassay* , **4** (3) 209.
- ISRA74 Israelachvili, J.N. (1974) *Q. Rev. Biophys.* **6**, 341-387.
- IVAR86 Ivarsson, B. and Lundström, I. (1986) *CRC Crit. Rev. Biocompatibility* **2**, No.1.
- JOHN82 Johnstone, A. et Thorpe, R., in *Immunochemistry in Practice* , Blackwell Scientific Publications (1982) p. 2.
- JÖNS82 Jönsson, U., Ivarsson, B., Lundström, I., Berghem, L. (1982) *J. Colloid Interface Sci.* **90**, 148.
- KEAR79 Kearney, J.F. *et al.* (1979) *Immunology* **123**, 1548.
- KOSH63a Koshland, M.E., Englberger, F.M., Erwin, M.J. & Gaddone, S.M. (1963) *J. Biol. Chem.* **238**, 1343.
- KOSH63b Koshland, M.E., Englberger, F.M. & Gaddone, S.M. (1963) *J. Biol. Chem.* **238**, 1349.
- KURR94 Kurrat R., Ramsden J.J. and Prenosil J.E., *Kinetic model for serum albumin adsorption: experimental verification*, à paraître.
- LAPA78 Lapanje, S. (1978) *Physicochemical Aspects of Protein Denaturation* , J. Wiley, New York.
- LEDE67 Lederer, C.M., Hollander, J.M., Perlman, I., *Table of isotopes*, John Wiley, 1967.

- LEON87 *Blood in Contact with Natural and Artificial Surfaces* (E. F. Leonard, V. T. Turitto, and L. Vroman, Eds.), Annals of the New York Academy of Sciences, Vol. 516. N.Y. Acad. Sci., New York, 1987.
- LEVE28 Lévêque, M. A. (1928) *Ann. Mines* **13**, 256-284.
- LUND85 Lundström, I. (1985) *Progress in Colloid & Polymer Science* **70**, 76-82.
- LUND90 Lundström, I. and Elwing, H. (1990) *J. of Colloid and Interface Sci.* **136**, 68-84.
- LUTA92 Lutanie, E., Voegel, J.-C., Schaaf P., Freund M., Casenave, J.-P. & Schmitt, A. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 9890.
- LUTA92a Lutanie, E. (1992) *Etude de l'adsorption d'immunoglobulines G sur la silice*, Thèse, Strasbourg.
- LY74 Ly, B. & Kierulf, P. (1974) *Thromb. Res.* **5**, 327.
- LYKL84 Lyklema, J. (1984) *Colloids and Surfaces* **10**, 33-42.
- MARK82 Markwell, M.A.K. (1982) *Anal. Biochem.* **125**, 427.
- MAYB70 Mayberry, W.E. & Hockert, T.J. (1970) *J. Biol. Chem.* **245**, 697.
- McFA58 McFarlane, A.S. (1958) *Nature* **182**, 53.
- McFA63 McFarlane, A.S. (1963) *J. Clin. Invest.* **42**, 346.
- McKI87 McKinney, M.M. & Parkinson, A. (1987) *J. Immunol. Methods* **96**, 271.
- McME52 McMeekin, T.L. et Marshall, K. (1952) *Science* **116**, 142.
- McMI74 McMillin, C.R., Saito, H., Ratnoff, O.D. & Walton, A.G. (1974) *J. Clin. Invest.* **54**, 1312.
- McRI72 MacRitchie, F. (1972) *J. Colloid Interface Sci.* **38**, 484.
- McRI78 F. MacRitchie (1978) *Adv. Prot. Chem.* **32**, 283.
- MIRA93 Miras, B. (1993) *La réflectométrie appliquée à l'adsorption de protéines sur la silice en vue de l'étude des réactions antigène/anticorps*, Mémoire de D.E.A., Paris VII et V.
- MORR71 Morrison, M., Bayse, G.S. & Webster, R.G. (1971) *Immunochemistry* **8**, 289.
- NORDa78 Norde, W. and Lyklema, J. (1978) *J. Colloid Interface Sci.* **66**, 257.
- NORDb78 Norde, W. and Lyklema, J. (1978) *J. Colloid Interface Sci.* **66**, 266.
- NORDc78 Norde, W. and Lyklema, J. (1978) *J. Colloid Interface Sci.* **66**, 277.
- NORDd78 Norde, W. and Lyklema, J. (1978) *J. Colloid Interface Sci.* **66**, 285.
- NORDe78 Norde, W. and Lyklema, J. (1978) *J. Colloid Interface Sci.* **66**, 295.
- NORD79 Norde, W. and Lyklema, J. (1979) *J. Colloid Interface Sci.* **71**, 350.
- NORD84 Norde, W. (1984) *Colloids and Surfaces* **10**, 21-31.
- NORD91 Norde, W. and Lyklema, J. (1991) *J. Biomater. Sci. Polymer Edn* **2**, 183-202.
- NORD92 Norde, W. & Favier, J.P. (1992) *Colloids and Surfaces* **65**, 17.
- ONCL47 Oncley, J.L., Scatchard, G. et Brown, A. (1947) *J. Phys. Colloid Chem.* **51**, 184.
- O'SU79 O'Sullivan, M.J. *et al.* (1979) *Ann. Clin. Biochem.* **16**, 221.
- PACK69 Packham, M.A., Evans, G., Glynn, M.F., Mustard, J.F. (1969) *J. Lab. Clin. Med.* **73**, 686.
- PEFF83 Pefferkorn, E., Carroy, A. & Varoqui, R. (1983) *J. Polym. Sci. Polym. Phys. Ed.* **23**, 1997.
- PHEL60 Phelps, R.A. et Putnam, F.W., in F.W. Putnam Ed., *The plasma proteins*, Vol.I, Academic Press, New York, 1960, p. 143.
- PORT85 Portsmann, B. *et al.* (1985) *J. Immunol. Methods* **79**, 27.
- PRES51 Pressman, D. & Sternberger, L.A. (1951) *J. Immunol.* **66**, 609.
- PRES66 Press, E.M. & Porter, R.R., in *Glycoproteins, Their Composition, Structure and Function*, B.B.A. Library, Vol. 5, Ed. by A. Gottschalk, Elsevier Publishing Company, Amsterdam-London-New-York (1966).

- PUTN52 Putnam, F.W. et Udin, B. (1952) *J. Biol. Chem.* **202**, 727.
- QUAS78 Quash, G., Roch, A.-M., Niveleau, A., Grange, J., Keolouangkhot, T. & Huppert, J. (1978) *J. Immunol. Methods* **22**, 165.
- QUAS89 Quash, G.A.; Rodwell, J.D.; in *Covalently Modified Antigens and Antibodies in Diagnosis and Therapy*; Marcel Dekker, Inc.: New York, Basel, 1989; p. 156.
- REGO84 Regoeczi, E. (1984) *Iodine-labeled plasma proteins*, Vol. I, CRC Press Inc., Boca Raton, Floride.
- ROIT90 Roitt, I. (1990) *Immunologie*, Eds Pradel, Paris.
- ROWL66 Rowland, F.W., Eirich, F.R. (1966) *J. Polym. Sci. A1* **4**, 2401.
- SCHA87 Schaaf, P., Déjardin, Ph., and Schmitt A. (1987) *Langmuir* **3**, 1131.
- SCHA87a Schaaf, P. (1987) *La technique de réflectométrie: sa mise en oeuvre et son application à l'étude de l'adsorption de macromolécules à une interface solide/solution*, thèse, Strasbourg.
- SCHE57 Scheraga, H.A. et Laskowski, M. Jr. (1957) *Advances in Protein Chem.* **12**, 1.
- SCHE61 Scheraga H.A. (1961) *Protein Structure*, Acad. Press, NY and London, in « *Molecular biology, An International Series of Monographs and Textbooks* ».
- SCHI73 Schiffer et al (1973) *Biochemistry* **12**, 4620.
- SCHM83 Schmitt, A., Varoqui, R., Uniyal, S., Brash, J.L. & Pusineri, C. (1983) *J. Colloid and Interface Sci.* **92**, 25.
- SCHÖ55 Schönenberger, M. (1955) *Z. Naturforsch.* **10b**, 474.
- SCHO62 Schottek, W. (1962) *Aerzt. Lab.* **8**, 289.
- SCHU55 Schultze, H.E. et al (1955) *Z. Naturforsch.* **10b**, 463.
- SCHU58 Schultze, H.E. et al. (1958) *Biochem. Z.* **329**, 490.
- SCHU59 Schultze, H.E. et Schwick, G. (1959) *Clin. Chim. Acta* **4**, 15.
- SCHU60 Schultze, H.E. et Heide, K., in K. Fr. Bauer Ed., *Medizinische Grundlagenforschung* Vol.III, Georg Thieme, Stuttgart, 1960, p.351.
- SCHW81 Schwimmer, S. (1981) *Source Book of Food Enzymology*, Avi Publishing, Westport.
- SCOT91 Scott, C. (1991) *J. Biomater. Sci. Polymer Edn* **2**, 173.
- SHEP54 Sheppard, E. et Wright, I.S. (1954) *Arch. Biochem. Biophys.* **52**, 414.
- SHUL53 Shulman, S. (1953) *J. Am. Chem. Soc.* **75**, 5846.
- SILV77 Silverton E.W., Navia M.A. & Davies J.R. (1977) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **74**, 5140.
- SODE80 Soderquist, M.E. & Walton, A.G. (1980) *J. of Colloid and Interface Sci.* **75**, 386.
- SUSC66 Suscillon, M. (1966) *Contribution à l'étude du fibrinogène et de la sérum-albumine plasmatiques - Effets de l'irradiation*, Thèse, Grenoble.
- TELF80 Telford, J.N., Nagy, J.A., Hatcher, P.A., Sheraga, H.A. (1980) *Proc. Nat. Acad. Sci., USA* **77**, 2372.
- THIE76 Thies, C. (1976) *J. Phys. Chem.* **70**, 3783.
- VdSC78 Van der Scheer, A., Feijan, J., Elhorst, J.K., Krugers Degreaux, P.G.L.C. & Smolders, C.A. (1978) *Colloid Interface Sci.* **66**, 136.
- VERP92 Van Erp, R., Linders, Y.E.M., van Sommeren, A.P.G. and Gribnau, T.C.J., (1992) *Journal of Immunological Methods* **152**, 191-199.
- VOEG85 Voegel, J.-C., de Baillou, N. & Schmitt, A. (1985) *Colloids and Surfaces* **16**, 289.
- VROM69 Vroman, L. & Adams, A.L. (1969) *J. Biomed. Mat. Res.* **3**, 43-67.
- WALT79 Walton, A.G., Solomon, D.D., Rao, P. & Hurwitz, F. (1979) *Polym. Prepr. Amer. Chem. Soc. Div. Polym. Chem.* **20**, 82.
- WALT80 Walton, A.G. and Soderquist, M.E. (1980) *Croatica Chemica Acta* **53**, 363.

- WEIL90 Weil, J.-H. (1990) *Biochimie générale*, Eds Masson, Paris.
- WILS78 Wilson, M.B. & Nakane, P.K., in *Immunofluorescence and related staining techniques* (Knapp, W., Kolubar, K., Wick, G., eds) (1978), p. 215, Elsevier/North Holland, Amsterdam.
- WOJC91 Wojciechowski, P. & Brash, J.L. (1991) *J. Biomater. Sci. Polymer Edn* **2**, 203.
- YAMA77 Yamamoto, O. (1977) *Adv. Exp. Med. Biol.* **86A**, 509.
- YAN91 Yan, F. & Déjardin, Ph. (1991) *Langmuir* **7**, 2230.
- YON69 Yon, J. (1969) *Structure et dynamique conformationnelle des protéines*, Hermann Paris, Coll. Méthodes.

BIBLIOGRAPHIE

Colowick, Sidney P. and Kaplan, Nathan O., *Methods in Enzymology*, Vol. **70**: Immunochemical Techniques, Part A, Edited by Helen Van Vunakis & John J. Langone, Academic Press, 1980.

Antibodies, Vol. **I** and **II**: a practical approach, Edited by D. Catty, IRL Press, 1988.

Proteins at Interfaces: Physicochemical and Biochemical Studies, ACS Symposium Series 343, John L. Brash and Thomas A. Horbett Editors, 192nd Meeting of the ACS (Division of Colloid and Surface Chemistry), Anaheim, California, September 7-12, 1986. Series Editor: M. Joan Comstock (1987).

Ecole d'été: *Colloïdes et interfaces*, Aussois - France, 6-17 septembre 1983, Les éditions de physique, Ecole publiée avec le concours du CNRS.

Surface and Interfacial Aspects of Biomedical Polymers, Vol. **2**, Protein Adsorption, Edited by Joseph D. Andrade, Plenum Press, 1985.

J. Lyklema, *Fundamentals of Interface and Colloid Science*, Vol. **I**: Fundamentals, Academic Press, 1991.

Israelachvili, Jacob, *Intermolecular & Surface Forces*, Second Edition, Academic Press, 1991.

Fowles, Grant R., *Introduction to modern optics*, Second Edition, Dover Publications, Inc., New York, 1975.

Cantor, Charles R. and Schimmel, Paul R., *Biophysical Chemistry*, Part I: *The conformation of biological macromolecules*, Part II: *Techniques for the study of biological structure and function*, Part III: *The behavior of biological macromolecules*, W.H. Freeman and Company, New York, 1980.

Daune, Michel, *Biophysique moléculaire*, Structures en mouvement, InterEditions, 1993.

Atkins, P.W., *Physical Chemistry*, Fifth Edition, Oxford University Press, 1990.

Roitt, Ivan, *Immunologie*, Editions Pradel, 1990.

Handbook of Mathematical Functions, with Formulas, Graphs, and Mathematical Tables, edited by Milton Abramowitz and Irene A. Stegun, Dover Publications, Inc., New York, 1972.

Hiemenz, Paul C., *Principles of colloid and surface chemistry*, Second Edition, Marcel Dekker, Inc., New York and Basel, 1986.

Landau, L. & Lifchitz, E., *Physique théorique*, Tome **6**: Mécanique des fluides, Editions MIR, 2e Edition, 1989.

Sir Horace Lamb, *Hydrodynamics*, Cambridge Mathematical Library, Sixth Edition, Cambridge University Press, 1993.

Weil, J.-H., *Biochimie générale*, 7e Edition, Masson, 1994.

Reif, Frederick, *Physique statistique*, Cours de physique de Berkeley, Vol. 5, Librairie Armand Colin, Paris, 1972.

Morse, P. M. and Feshbach, H., *Methods of theoretical physics*, International Series in Pure and Applied Physics, Vol. I: Part I, Vol. II: Part II, McGraw-Hill Publishing Company, 1953.

Grossetête, B., Pastor, L., Zeitoun-Fakiris, A., *La représentation des phénomènes physiques*, Les opérateurs vectoriels appliqués à la physique, Vol. 18, Masson, 1981.

Callen, Herbert B., *Thermodynamics and an introduction to Thermostatistics*, Second Edition, John Wiley and Sons, 1985.

Morlaës, P. et Morlaës, J.-C., *Solutions aqueuses*, Exercices avec solutions, Mathématiques supérieures et spéciales, Librairie Vuibert, 1987.