

## SUMMARY

1) The kinetics of the competitive reactions of three monochlorotriazine reactive dyes with water and with sorbitol have been investigated.

2) The reactions of the monochlorotriazine dyes with sorbitol anions and hydroxyl ions can be divided as follows: a) With dyes without a NH-group between the triazine nucleus and the other part of the molecule, the reaction follows the simple addition-elimination mechanism ( $A_{N_2}E$ ), in which the addition of the nucleophile is rate-limiting. b) The reactions of dyes containing a NH-group can be explained by assuming that more than one of the tautomeric isomers are reactive. With one isomer the addition of the nucleophile is the slowest step; with another the base-catalysed decomposition of the addition complex is rate-limiting.

3) The first acid dissociation constant of sorbitol is evaluated ( $pK_a = 13.14$ ;  $60^\circ$ ).

Technisch-chemisches Laboratorium,  
Eidgenössische Technische Hochschule  
Zürich

## LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Teil I: P. RYS & HCH. ZOLLINGER, *Helv.* **49**, 749 (1966); zugleich 1. Mitteilung über reaktionsmechanistische Untersuchungen an Reaktivfarbstoffen.  
 [2] Teil II: A. DATYNER, P. RYS & HCH. ZOLLINGER, *Helv.* **49**, 755 (1966); zugleich 2. Mitteilung über reaktionsmechanistische Untersuchungen an Reaktivfarbstoffen.  
 [3] C. D. HODGMAN, *Handbook of Chemistry and Physics*, **44**, Aufl. 1963, S. 1752.  
 [4] W. BECKMANN, D. HILDEBRAND & H. PESENECKER, *Melliand Textilber.* **43**, 1304 (1962).  
 [5] H. ACKERMANN & P. DUSSY, *Helv.* **45**, 1683 (1962).  
 [6] S. HORROBIN, *J. chem. Soc.* **1963**, 4130.

## 89. Propriétés physico-chimiques et immunologiques de $\gamma$ G-globulines couplées à un haptène par diazotation

par J. C. Jaton, H. J. Scholer et H. Isliker

(6 XII 65)

En vertu de leur spécificité sérologique, les  $\gamma$ G-globulines pourraient servir de vecteurs pour porter et délivrer des agents thérapeutiques sur des cellules «cibles» considérées comme antigènes spécifiques. Nous avons envisagé, dans la présente étude de coupler un sulfonamide (Fanasil<sup>1</sup>) aux  $\gamma$ G-globulines<sup>2</sup>) de lapin dirigées contre un micro-organisme, l'*Histoplasma capsulatum*<sup>3</sup>), par l'intermédiaire d'une liaison azoïque entre l'agent thérapeutique et la protéine. L'usage des  $\gamma$ G-globulines soulève une difficulté qui provient de l'affinité de la plupart des  $\gamma$ G-globulines pour les tissus.

<sup>1</sup>) Nom déposé par F. HOFFMANN-LA ROCHE pour la sulfanilamido-4-diméthoxy-5,6-pyrimidine; ce sulfonamide est particulièrement active contre *Histoplasma*.

<sup>2</sup>) Nomenclature proposée récemment par un Comité de l'Organisation mondiale de la Santé (OMS) [1].

<sup>3</sup>) Le champignon *Histoplasma capsulatum*, souche H2, fut utilisé sous sa forme levure.

PORTER [2] a montré que l'hydrolyse papaïnique des  $\gamma$ G-globulines d'un poids moléculaire d'environ 150000 libère 3 fragments de poids moléculaire 50000, séparables sur colonne de carboxyméthyl-cellulose. Les fragments Fab (antigen binding fragment<sup>2</sup>) I et II possèdent chacun un site de combinaison à l'antigène alors que le troisième fragment Fc (crystallizable fragment) est dépourvu d'activité d'anticorps et est responsable de la fixation non spécifique sur les tissus. Ainsi, il est préférable de faire usage des sous-unités Fab qui ne contiennent que les sites spécifiques de fixation à l'antigène. Ce mémoire décrit les modifications physico-chimiques et immunologiques d'anticorps résultant de leur conjugaison avec un médicament (Fanasil) ou avec l'acide sulfanilique.

**Résultats.** – *Couplage d'une  $\gamma$ G-globuline avec l'acide sulfanilique diazoté.* Nous avons pu faire varier la quantité du composé aromatique fixé entre 1 et 70 restes par molécule de  $\gamma$ G-globuline. Une  $\gamma$ G-globuline de Bouc anti-sérum de Lapin est conjuguée avec de l'acide sulfanilique. Ce dernier, comme la sulfanilamido-4-diméthoxy-5,6-pyrimidine (Fanasil), porte à pH 8,6 des charges négatives. La conjugaison entraîne une augmentation de la solubilité de l'azoprotéine ainsi formée à ce pH; le point isoélectrique est abaissé. La quantité d'acide sulfanilique lié à la protéine peut être estimée lorsqu'on connaît le rapport de sulfanilate diazoté à protéine dans le mélange réactionnel. En effet, le tableau I montre que le rendement de conjugaison, c'est-à-dire le nombre de groupements fixés à la protéine par rapport au nombre de

Tableau I. Nombre de molécules de diazosulfanilate couplées par molécule de  $\gamma$ G-globuline<sup>a</sup>), en fonction de la quantité de diazosulfanilate introduite dans la réaction avec la protéine

Rapport molaire diazosulfanilate à $\gamma$ G-globuline dans le mélange réactionnel	restes d'acide sulfanilique couplés par molécule de $\gamma$ G-globuline <sup>b</sup> )	rendement de couplage
10:1	3	30%
20:1	6,5	32%
40:1	12,3	31%
100:1	30	30%
200:1	68	34%

<sup>a</sup>)  $\gamma$ G-globuline de Bouc anti-sérum de Lapin (poids moléculaire: 150000).

<sup>b</sup>) Déterminé par colorimétrie après scission réductrice du pont azoïque (voir partie expérimentale); moyennes de 3 déterminations.

groupements introduits dans la réaction, est de l'ordre de 30% et ceci jusqu'à un rapport molaire réactif: protéine de 200:1.

*Variation de la mobilité immuno-électrophorétique [3] de la  $\gamma$ G-globuline de Lapin anti-Histoplasma en fonction du degré de copulation avec le Fanasil.* La vitesse de migration immuno-électrophorétique des conjugués à pH 8,6, comparée à celle de la  $\gamma$ G-globuline non couplée, marque une nette augmentation de la mobilité vers l'anode; cette augmentation est sensiblement proportionnelle au niveau de conjugaison) Elle est due à l'augmentation de la charge nette (par unité de surface moléculaire.

par suite de l'introduction de charges négatives apportées par la sulfanilamido-4-diméthoxy-5,6-pyrimidine (Fig. 1).

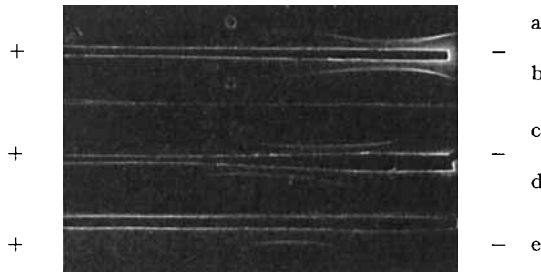


Fig. 1. *Analyse immuno-électrophorétique de conjugués à différents degrés de couplage*

- a)  $\gamma$ G-globuline de Lapin anti-*Histoplasma* non couplée (première fraction chromatographique sur DEAE-cellulose).
- b)  $\gamma$ G-globuline-azo-Fanasil: 1 reste de Fanasil par molécule de globuline
- c)  $\gamma$ G-globuline-azo-Fanasil: 6 restes de Fanasil par molécule de globuline
- d)  $\gamma$ G-globuline-azo-Fanasil: 12 restes de Fanasil par molécule de globuline
- e)  $\gamma$ G-globuline-azo-Fanasil: 31 restes de Fanasil par molécule de globuline

Antisérums: sérum de Bouc anti-sérum de Lapin.

*Analyse chromatographique d'azo- $\gamma$ G-globulines de Lapin sur colonne de DEAE-cellulose.* Nous avons purifié les  $\gamma$ G-globulines anti-*Histoplasma* sur colonne chromatographique DEAE afin d'isoler la fraction dont la charge négative est la plus faible: cette fraction se trouve contenue dans le premier pic élué avec la solution tampon phosphates 0,01M, pH 8,0 de départ. Le pic est symétrique (Fig. 2). Cette fraction ne révèle à l'immuno-électrophorèse qu'une ligne dans la région des  $\gamma$ G-globulines de faible mobilité. Une portion de ces globulines est couplée avec le Fanasil diazoté; la solution d'azo- $\gamma$ G-globulines obtenue est ultracentrifugée pour enlever des traces d'agrégats de haut poids moléculaire, puis chromatographiée dans les conditions utilisées pour la purification des  $\gamma$ G-globulines natives. Contrairement au comportement des  $\gamma$ G-globulines non couplées, l'allure du chromatogramme montre une résolution en de multiples composants (Fig. 3). En moyenne, 5 à 6 fractions sont séparées. Le premier pic contient une fraction émergeant avec la solution tampon phosphates 0,01M à pH 8,0; elle est très peu couplée: un reste de Fanasil par molécule de  $\gamma$ G-globuline, donc peu différente de la protéine non traitée. Les pics suivants, du fait de l'augmentation de la charge négative de la protéine couplée, contiennent des fractions éluées avec du tampon de force ionique supérieure à celle du tampon phosphates initial. Même à l'aide de NaCl 1M ou de solution tampon acétate 0,9M à pH 4,5, nous ne sommes pas parvenus à éluer complètement les dérivés conjugués: une ou plusieurs fractions restent adsorbées sur la DEAE-cellulose. En général, nous avons constaté que la quantité de sulfonamide lié à la  $\gamma$ G-globuline augmente de la fraction I à la fraction IV (tableau II). Cette observation est confirmée par l'augmentation de la mobilité immuno-électrophorétique vers l'anode des fractions I à V (Fig. 4). Exceptionnellement, quoique la mobilité immuno-électrophorétique des fractions augmente suivant l'ordre d'élué, une de celles-ci contient moins de Fanasil que la fraction

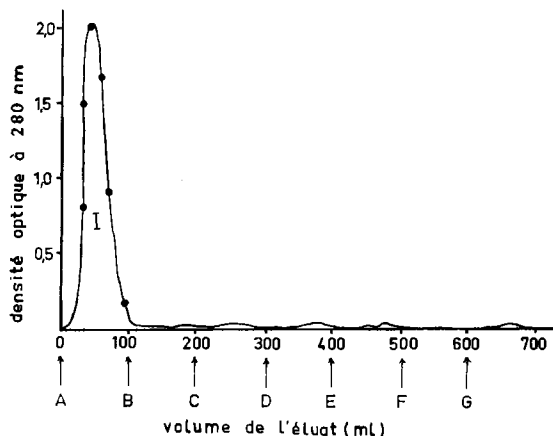


Fig. 2. *Rechromatographie sur colonne de DEAE-cellulose (2×40 cm) de la première fraction de  $\gamma$ G-globulines (150 mg) éluée avec le tampon phosphates 0,01 M à pH 8,0 sur le même adsorbant*

L'éluion a été faite par paliers au moyen des tampons suivants:

A	100 ml de solution tampon $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$	0,01 M pH 8,0
B	100 ml de solution tampon $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$	0,05 M pH 6,3
C	100 ml de solution tampon $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$	0,10 M pH 6,3
D	100 ml de solution tampon $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$	0,20 M pH 6,3
E	100 ml de solution tampon $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$	0,50 M pH 6,3
F	100 ml de NaCl	1,0 M pH 6,3
G	100 ml de solution tampon acétate de sodium-acide acétique	0,90 M pH 4,3

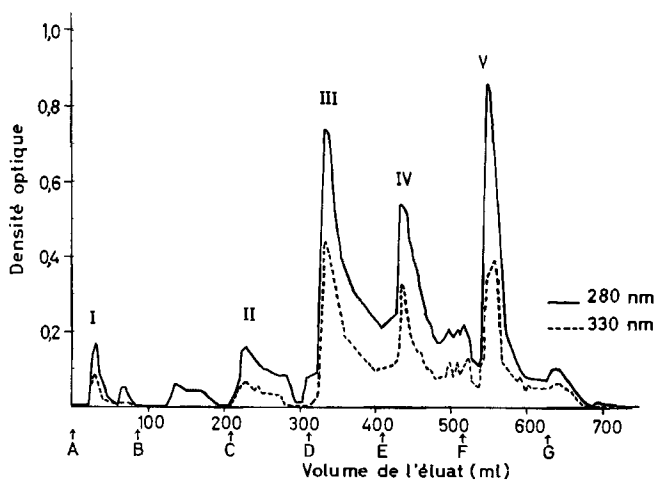


Fig. 3. *Chromatographie sur DEAE-cellulose d'un conjugué Fanasil-azo- $\gamma$ G-globuline anti-Histoplasma*

35 mg de conjugué (17 restes de Fanasil en moyenne par molécule de  $\gamma$ G-globuline), ultracentrifugés 2 h à 35000 t/min sont chromatographiés sur colonne de DEAE (1×40 cm). Conditions d'éluion par paliers, voir légende de la Fig. 2. Mesures de densité optique effectuées à 280 nm et 330 nm (maximum d'absorption de l'azoïque).

Tableau II. Analyse des fractions d'azo- $\gamma$ G-globulines après chromatographie sur DEAE-cellulose

Désignation des pics <sup>a)</sup>	protéines récupérées dans l'éluat (mg)	rapport molaire Fanasil à protéine
I	1	1
II	1,5	4,5
III	9	8
IV	8	9
V	6	7

Total des protéines récupérées: 25,5 mg sur 35 mg mis en œuvre, soit 73%.

<sup>a)</sup> Selon Fig. 3.

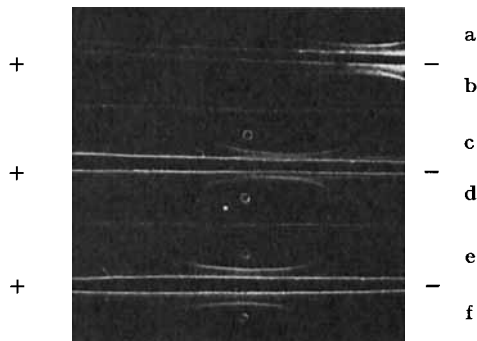


Fig. 4. Analyse immuno-électrophorétique des fractions chromatographiques du conjugué

a)  $\gamma$ G-globuline, première fraction chromatographique séparée sur DEAE-cellulose.

b) pic I; c) pic II; d) pic III; e) pic IV; f) pic V (voir Fig. 3).

Antisérums: sérum de Bouc anti-sérum de Lapin.

précédente. Ce phénomène n'est pas surprenant si l'on admet que les  $\gamma$ G-globulines non couplées contiennent une petite proportion de molécules de mobilité immuno-électrophorétique plus grande. Les résultats montrent que l'hétérogénéité de la préparation d'azo- $\gamma$ G-globulines apparaît par suite de la réaction de couplage (voir Discussion).

*Propriétés immunologiques de  $\gamma$ G-globulines de Lapin anti-Histoplasma, de leurs fragments papainiques et des azo-conjugués correspondants.* Avant d'étudier le comportement d'un anticorps modifié, vis-à-vis de son antigène, il convient de rechercher tout d'abord les conditions optimales de réactivité de cet anticorps pour son antigène. La détermination de la quantité d'anticorps lorsque ce dernier est ajouté en quantité croissante à une dose fixe d'antigène, permet de préciser si l'on se trouve dans la zone, respectivement de défaut d'anticorps, d'équivalence ou d'excès d'anticorps. Dans ce but, nous avons construit une courbe de saturation de l'*Histoplasma* par la  $\gamma$ G-globuline homologue. La Fig. 5 montre la nette différence de fixation entre les  $\gamma$ G-globulines immunes et non immunes. Dans nos conditions d'expérience, nous nous rapprochons de la saturation de l'antigène en incubant  $4 \cdot 10^7$  cellules d'*Histoplasma* avec  $250 \mu\text{g}$  de  $\gamma$ G-globulines anti-*Histoplasma*.

Pour réaliser les expériences suivantes, nous avons arbitrairement choisi d'incuber 250  $\mu\text{g}$  de  $\gamma\text{G}$ -globulines immunes avec une dose d'*Histoplasma* de  $4 \cdot 10^7$  cellules. Les immun-complexes ainsi préparés renferment environ 6  $\mu\text{g}$  de  $\gamma\text{G}$ -globulines anti-*Histoplasma* fixés sur 20  $\mu\text{g}$  d'azote de l'antigène (voir Fig. 5).

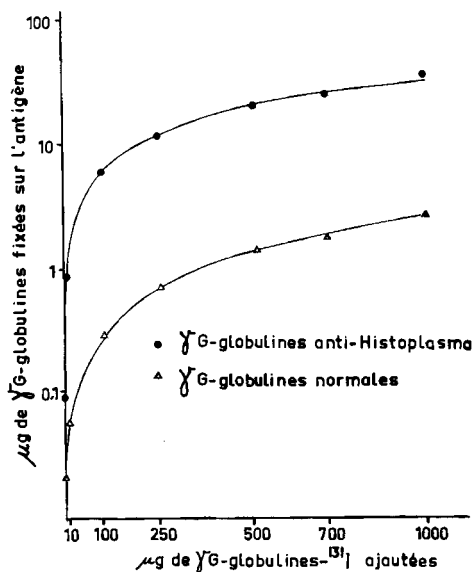


Fig. 5. Courbe de saturation de l'*Histoplasma* par son anticorps homologue

Dose constante d'*Histoplasma capsulatum*: 0,1 ml de suspension dans du tampon phosphate salin à pH 7,3 ( $4 \cdot 10^7$  cellules correspondant à environ 40  $\mu\text{g}$  d'azote). Les globulines immunes et non immunes sont iodées selon HELMKAMP et coll. [20] à raison de 0,8 atome d'iode par molécule de  $\gamma\text{G}$ -globuline, et ajoutées à l'antigène dans un volume final de 0,6 ml. L'incubation dure 14 h à 2° sans agitation; l'immun-complexe est lavé 4 fois avec 1,0 ml de tampon phosphate salin. Le pourcentage de la fixation sur l'*Histoplasma* se calcule par le rapport de la radioactivité du complexe lavé, à la radioactivité totale des  $\gamma\text{G}$ -globulines ajoutées. Chaque point du graphique représente une moyenne de 2 déterminations.

L'expérience consignée dans le tableau III permet de mesurer l'affinité des trois fragments d'anticorps anti-*Histoplasma* comparée à celle des sous-unités de  $\gamma\text{G}$ -globulines non immunes vis-à-vis du même antigène. Alors que les fragments univalents spécifiques Fab (I et II) déplacent les anticorps marqués au  $^{131}\text{I}$  dans la même mesure que la  $\gamma\text{G}$ -globuline native, le fragment Fc dépourvu d'activité d'anticorps ne possède pas cette propriété. Le contrôle avec le système non immun confirme que la fixation non spécifique est bien due au fragment Fc.

Il est important de connaître l'altération de structure tertiaire des anticorps, qui peut résulter des différentes manipulations chimiques. Comme la tyrosine est impliquée dans le site actif de l'anticorps et que le sulfonamide diazoté est attaché d'une façon covalente, principalement sur cet acide aminé, la forme de ce site peut être modifiée par la copulation sur une plus ou moins grande étendue si bien que l'activité immunologique pourrait être perturbée [4]. Nous avons vérifié ce point en mesurant

Tableau III. *Elution d'anticorps anti-Histoplasma marqués au <sup>131</sup>I, fixés sur l'antigène, par des  $\gamma$ G-globulines et leurs fragments, immuns et non immuns<sup>a)</sup>*

Systèmes	éluants	% de $\gamma$ G-globulines-[ <sup>131</sup> I] anti- <i>Histoplasma</i> éluées de l'antigène après incubation de 2 h à 37°	
Système immun	$\gamma$ G-globuline	29,1	29,2 b)
	Fab (I)	27,6	27,0
	Fab (II)	28,7	29,7
	Fc (III)	9,6	8,5
Système non immun	$\gamma$ G-globuline	5,0	4,1
	Fab (I)	0,05	0,06
	Fab (II)	1,5	0,9
	Fc (III)	4,5	4,3

Elution de 6  $\mu$ g d'anticorps marqués au <sup>131</sup>I, fixés sur 20  $\mu$ g d'azote de l'antigène par 400  $\mu$ g d'éluant ajouté dans un volume de 0,2 ml.

a) Fragments produits par l'action de la papaïne selon PORTER [2].

b) Moyennes de 2 expériences parallèles.

l'effet de fragments d'anticorps anti-*Histoplasma* couplés au Fanasil sur l'éluion de  $\gamma$ G-globulines anti-*Histoplasma* marquées au <sup>131</sup>I (tableau IV). Les fragments Fab couplés au Fanasil conservent la capacité d'éluier autant de  $\gamma$ G-globulines anti-*Histoplasma* que les fragments natifs. Selon ces expériences *in vitro*, on peut conclure que la conjugaison du sulfonamide à la  $\gamma$ G-globuline n'a pas notablement altéré les propriétés immunologiques de l'anticorps; en particulier, son pouvoir de fixation à l'antigène est maintenu.

Bien qu'en apparence, le pouvoir de fixation de la globuline anti-*Histoplasma* et de ses fragments couplés soit conservé, nous nous sommes demandé si cette fixation est aussi spécifique que celle observée dans le cas de la  $\gamma$ G-globuline immune non cou-

Tableau IV. *Elution par déplacement d'anticorps anti-Histoplasma marqués au <sup>131</sup>I, fixés sur l'antigène, par des fragments d'anticorps couplés et non couplés au Fanasil*

Eluants	% de $\gamma$ G-globulines-[ <sup>131</sup> I] déplacées de l'antigène après éluion à 37° pendant	
	2 h	6 h
	$s_{\bar{x}}$	$s_{\bar{x}}^c)$
Fab (I)	19,5 $\pm$ 2,4	27,8 $\pm$ 1,5
Fab (I)-azo-Fanasil <sup>a)</sup>	19,6 $\pm$ 2,1	28,9 $\pm$ 0,6
Fab (II)	24,1 $\pm$ 2,0	32,2 $\pm$ 1,0
Fab (II)-azo-Fanasil <sup>b)</sup>	22,0 $\pm$ 2,2	27,3 $\pm$ 0,5
Fc	6,6 $\pm$ 1,8	13,5 $\pm$ 0,1

Traitement d'un immun-complexe de 4  $\mu$ g de  $\gamma$ G-globulines-[<sup>131</sup>I] anti-*Histoplasma* fixés sur 26  $\mu$ g d'azote de l'antigène par 0,5 ml d'éluant contenant 500  $\mu$ g de fragment ou de conjugué.

a) Le conjugué renferme 9 restes de Fanasil par molécule de Fab spécifique.

b) Le conjugué renferme 24 restes de Fanasil par molécule de Fab spécifique.

c)  $s_{\bar{x}}$  = erreur moyenne de la moyenne pour un nombre de déterminations n = 4.

plée et si l'altération résultant du couplage n'entraîne pas une modification de la fixation non spécifique. Nous avons alors déterminé la capacité de fixation à l'antigène de  $\gamma$ G-globulines- $^{131}\text{I}$  anti-*Histoplasma* couplées au Fanasil à divers degrés de conjugaison. Parallèlement, nous avons étudié le même système non immun. Les résultats (tableau V) indiquent que l'augmentation de la fixation est non spécifique et résulte de la dénaturation des  $\gamma$ G-globulines par couplage. Elle est du même ordre de gran-

Tableau V. Capacité de fixation sur l'*Histoplasma* de  $\gamma$ G-globulines- $^{131}\text{I}$  immunes et non immunes copulées à différents degrés avec le Fanasil diazoté

Préparations testées (nombre de restes de Fanasil par molécule de $\gamma$ G-globuline)	% de fixation de la dose initiale	
	système immun	système non immun
$\gamma$ G-globuline native	$14,7 \pm 0,3$	$3,9 \pm 0,2$ <sup>a)</sup>
Conjugué à 3 restes par mol.	$14,9 \pm 0,9$	$5,6 \pm 0,75$
Conjugué à 6 restes par mol.	$15,4 \pm 0,7$	$5,6 \pm 0,5$
Conjugué à 16 restes par mol.	$18,5 \pm 1,0$	$7,5 \pm 0,9$
Conjugué à 20 restes par mol.	$21,1 \pm 0,6$	$9,4 \pm 0,8$

Les  $\gamma$ G-globulines spécifiques et non spécifiques sont iodées selon HELMKAMP et coll. à raison de 1 atome d'iode par molécule [20]; une portion de ces globulines est ensuite conjuguée avec le Fanasil diazoté, à divers degrés de copulation. Nous avons mis en contact 25  $\mu\text{g}$  de protéines marquées au  $^{131}\text{I}$  (0,05 ml) couplées et non couplées, avec  $4 \cdot 10^7$  cellules d'*Histoplasma*. Le volume final est de 0,2 ml, et le temps d'incubation, de 12 h à 2°.

<sup>a)</sup> Erreur moyenne de la moyenne ( $s_{\bar{x}}$ ) pour un nombre de déterminations  $n = 9$ .

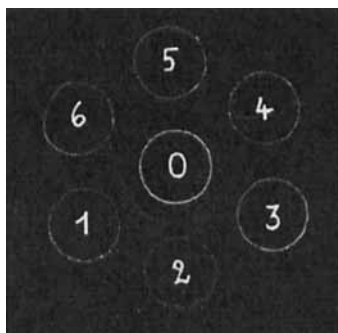


Fig. 6. Diminution de l'activité précipitante, en gélose, de  $\gamma$ G-globulines de Bouc anti-sérum de Lapin, après copulation avec l'acide sulfanilique diazoté

Le trou central (0) contient l'antigène:  $\gamma$ G-globulines normales de Lapin à 2%. Les trous périphériques renferment les anticorps (solutions à 1,2% en protéines):  $\gamma$ G-globulines de Bouc anti-sérum de Lapin, couplées à l'acide sulfanilique diazoté dans les rapports suivants:

1. 3 restes d'acide sulfanilique par molécule de  $\gamma$ G-globuline
2. 12 restes d'acide sulfanilique par molécule de  $\gamma$ G-globuline
3. 30 restes d'acide sulfanilique par molécule de  $\gamma$ G-globuline
4. 68 restes d'acide sulfanilique par molécule de  $\gamma$ G-globuline
5. 75 restes d'acide sulfanilique par molécule de  $\gamma$ G-globuline
6. plus de 75 restes d'acide sulfanilique par molécule de  $\gamma$ G-globuline



deur dans les deux systèmes. Le calcul de l'incertitude sur chaque détermination montre qu'il n'y a pas d'augmentation significative lorsqu'on compare les valeurs immédiatement voisines. Cependant, cette élévation devient évidente lorsqu'on compare un conjugué peu couplé avec le même fortement chargé.

*Diminution de l'activité précipitante, en gélose, d'une  $\gamma$ G-globuline de Bouc anti-sérum de Lapin, copulée avec l'acide sulfanilique diazoté.* A partir de  $\gamma$ G-globulines de Bouc anti-sérum de Lapin, nous avons préparé une série de sulfanyl-azo-conjugués dont nous avons examiné l'activité précipitante en présence de  $\gamma$ G-globulines de Lapin, à l'aide de la technique de double diffusion en gélose selon OUCHTERLONY [5]. Une ligne d'immuno-précipitation apparaît qui tend à devenir de plus en plus faible lorsque l'antigène réagit avec son anticorps d'autant plus dénaturé qu'il est plus fortement couplé. Il est également concevable qu'une inhibition de la précipitation résulte de l'empêchement stérique causé par la présence de restes d'acide sulfanilique à la surface de l'anticorps. Comme le montre la Fig. 6, la ligne de précipitation est à peine visible lorsque le degré de couplage de la protéine atteint 30 restes d'acide sulfanilique par molécule de  $\gamma$ G-globuline.

**Discussion.** - Il est prévisible que la conjugaison d'une protéine avec n'importe quelle molécule organique, acides sulfanilique, arsanilique, *p*-aminobenzoïque, entraînera une altération plus ou moins prononcée de ses propriétés physico-chimiques et biologiques. Les caractères physiques tels que la structure tertiaire ou le point isoélectrique sont modifiés par l'introduction, sur la molécule protéique, de charges négatives apportées par l'une ou l'autre de ces substances.

Nous avons constaté une inhomogénéité des préparations de Fanasil-azo- $\gamma$ G-globulines. Il est vraisemblable que cette hétérogénéité provienne à la fois des  $\gamma$ G-globulines, dont la complexité de structure primaire a été mise en évidence [6], et de la réaction de copulation. En effet, la diazoreaction crée, comme le souligne SINGER [7], un type d'hétérogénéité consécutif à la modification des molécules protéiques par leur conjugaison avec un haptène. Dans notre étude, le sulfonamide diazoté couplé à la protéine peut être considéré comme un véritable *haptène*, au même titre que les groupements azo-benzène-arsonate ou dinitrophényle par exemple [8]. Les composés diazonium peuvent réagir avec les résidus d'acides aminés tels que la tyrosine, l'histidine et peut-être d'autres encore [9]. La nature différente de ces acides aminés, auxquels viendront s'attacher les groupements azo, peut expliquer en partie cette hétérogénéité. D'autre part, puisque la plupart des conjugués haptènes-protéines contiennent plusieurs groupes hapténiques par molécule de protéine, chaque haptène doit se trouver lui-même dans un environnement local différent sur la surface de la molécule protéique. En outre, les haptènes peuvent être plus ou moins « orientés » à la surface de la protéine suivant la nature des liaisons non covalentes entre l'haptène et les groupements voisins du site d'attachement covalent de l'haptène sur la surface. Une variété de positions peut être envisagée entre les deux extrêmes, à savoir la « projection » de l'haptène hors de la molécule ou sa fixation *dans* la surface.

Les propriétés immunologiques des anticorps couplés varient selon les systèmes étudiés: l'activité précipitante, en gélose, d'un anticorps de Bouc anti-sérum de Lapin est presque complètement abolie dès que le degré de couplage est égal ou supérieur à 30 restes de sulfanilate par molécule de  $\gamma$ G-globuline (Fig. 6). Dans le cas de l'anti-

corps anti-*Trichomonas foetus*, l'activité agglutinante est sensiblement réduite lorsque le degré de conjugaison atteint 20 à 30 restes de sulfanilate par molécule de globuline [10]. Cependant, le pouvoir de fixation sur l'antigène des anticorps couplés est maintenu *in vitro*. Dans le système *Histoplasma*, les fragments d'anticorps actifs Fab couplés au sulfonamide éluent les globulines immunes fixées sur l'antigène, dans la même mesure que les fragments non couplés (tableau IV). Les résultats (tableau V) indiquent que l'anticorps fortement chargé (20 restes de Fansil par molécule de  $\gamma$ G-globuline) se fixe plus intensément qu'un conjugué peu chargé (3 restes de Fansil par molécule de  $\gamma$ G-globuline). Ainsi, le pouvoir de fixation d'un conjugué dépend du degré de couplage de l'anticorps. On peut admettre que cette augmentation de la capacité de fixation – qui devient non spécifique – traduit un état de dénaturation partielle du matériel protéique, qui sera d'autant plus prononcé que l'anticorps sera plus fortement couplé. En conclusion, bien que les anticorps couplés perdent une partie de leur spécificité biologique, ils possèdent toujours la capacité de se fixer sur l'antigène correspondant.

Cette dernière propriété suggère la possibilité de concentrer une quantité appréciable de médicament sur le micro-organisme considéré comme antigène. Une étude de l'inhibition de la croissance d'*Histoplasma capsulatum in vitro* et *in vivo*, par des conjugués Fansil-azo- $\gamma$ G-globulines anti-*Histoplasma*, sera présentée ailleurs [10].

### Partie expérimentale

Avec la collaboration de Mlle C. BERNARD

**A. Méthodes chimiques.** – *Couplage de l'acide sulfanilique ou du Fansil à une  $\gamma$ G-globuline par diazotation*: selon le degré de couplage désiré, nous avons travaillé avec les rapports molaires sulfonamide ou acide sulfanilique à protéine suivants: 10:1; 20:1; 40:1; 100:1; 200:1.

*Diazotation et copulation* [9]: nous dissolvons le nombre de  $\mu$ moles désirées d'acide sulfanilique ou de Fansil dans 5 à 10 ml d'HCl 0,25N. Nous ajoutons à la solution refroidie à 0° dans un bain de glace, successivement une solution de NaBr 0,01M (1  $\mu$ mole pour 5  $\mu$ moles d'acide sulfanilique ou de Fansil, afin de catalyser la réaction [11] et de prévenir l'auto-copulation [12]) puis goutte à goutte, sous agitation magnétique, une solution de nitrite de sodium 0,1N en faible excès. Après la dernière adjonction nous contrôlons la présence d'un excès de nitrite au moyen de papier iodoamidonné. La solution de diazotation ainsi préparée est abandonnée 2 h à 0°.

*Copulation avec la  $\gamma$ G-globuline*: la solution du sel de diazonium est introduite goutte à goutte dans la solution protéique tamponnée à pH 9,0 au moyen d'une solution d'hydrogencarbonate de sodium 0,1M. L'opération s'effectue à l'aide du pH-stat; le pH est maintenu à 9,0 par adjonction continue de NaOH 1N. Le sel de diazonium qui n'a pas réagi est éliminé par dialyse pendant 12 h contre une solution tampon borax- $H_3BO_3$  (0,05M en borax et 0,2M en  $H_3BO_3$ ) à pH 8,2, puis par filtration sur gel de Sephadex G-25 équilibré avec le même tampon. La solution de l'azoprotéine est concentrée à petit volume par dialyse contre de la polyvinylpyrrolidone à 40%, puis dialysée pendant 48 h contre du tampon phosphate salin à pH 7,3 (0,01M en  $Na_2HPO_4-NaH_2PO_4$  et 0,15M en NaCl [13]). Par ultracentrifugation de 2 h à 35000 t/min à 0°, nous éliminons une petite portion de protéines agrégées, fortement couplées, qui se déposent au fond du tube à centrifuger en une masse gélinifiée (2 à 5% du conjugué total).

*Dosage du conjugué sulfonamide-azo-protéine*: la teneur en protéine est dosée par micro-KJELDAHL [14]; l'azote total comprend l'azote du reste sulfamidique et du groupement azoïque. La quantité de sulfonamide (ou d'acide sulfanilique) couplé est évaluée par dosage colorimétrique après réduction du pont azoïque comme suit: dans un petit bécher, nous ajoutons à une prise de conjugué (1 à 1,5 mg de protéine dans 0,1 à 0,5 ml), 5 ml de  $SnCl_2$  0,1N dans HCl 5N. L'air contenu dans le bécher est remplacé par de l'azote. La solution se décolore instantanément et une légère opalescence se produit (précipitation de la partie protidique).  $Sn^{4+}$  et l'excès d'ions  $Sn^{2+}$

sont éliminés par précipitation à pH 6 au moyen de NaOH 5N. Après filtration sur double papier-filtre et lavage du précipité, le filtrat limpide contenant le sulfonamide (ou l'acide sulfanilique) régénéré est porté à 100 ml, puis on y dose le composé aromatique colorimétriquement selon BRATTON & MARSHALL [15].

**B. Méthodes immunologiques.** – *Antigène*: les cellules formolinisées et lyophilisées de la souche d'*Histoplasma capsulatum* (forme levure) sont conservées à  $-20^{\circ}$  dans des ampoules scellées. Au moment de l'emploi, l'antigène est mis en suspension dans du tampon phosphate salin [13] à pH 7,3 à une concentration d'environ  $4 \cdot 10^8$  cellules par ml. Le comptage s'effectue à l'aide de la chambre THOMAS.

*Antisérums*: les lapins (Füllinsdorfer Hasenkaninchen) reçoivent 15 injections i.-v., à raison de 3 par semaine, d'environ  $10^9$  cellules d'*Histoplasma* tuées par formolinisation et chauffage. Ils sont saignés le 40<sup>e</sup> jour après la première injection; les sérums sont réunis si le titre des anticorps déterminé par fixation du complément n'est pas inférieure à 1:1024.

*Isolement des  $\gamma$ G-globulines de Lapin et de Bouc*: les sérums normaux de Lapin et anti-*Histoplasma* ainsi que le sérum de Bouc anti-sérum de Lapin sont précipités par le sulfate d'ammonium à une concentration finale de 40%. Les précipités, lavés deux fois avec la même solution saline, sont dissous dans 10 ml de solution tampon phosphate salin, dialysés contre l'eau courante pendant 12 h puis finalement dialysés contre 2 l de solution tampon  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,01M à pH 7,3. Les préparations de  $\gamma$ G-globulines sont alors purifiées par chromatographie sur diéthylamino-éthyl-cellulose (DEAE) selon FAHEY et coll. [16]. La première fraction éluee avec le tampon phosphates 0,01M à pH 7,3 est concentrée par dialyse contre la solution de polyvinylpyrrolidone à 40% tamponnée à pH 7,3, puis dialysée à nouveau contre du tampon phosphate salin à ce même pH.

Les détails relatifs à la chromatographie d'azo- $\gamma$ G-globulines anti-*Histoplasma* sur DEAE-cellulose figurent plus haut sous Résultats.

*Immuno-électrophorèse*: la première fraction chromatographique est analysée à l'aide d'un sérum de Bouc anti-sérum de Lapin selon la micro-méthode de SCHEIDEGGER [17]. Aucune contamination par d'autres constituants n'est apparente. L'analyse immuno-électrophorétique des préparations d'azoprotéines est exécutée selon la même technique.

*Analyse par immuno-diffusion dans l'agar selon OUCHTERLONY* [5]: les préparations d'anticorps de Bouc anti-sérum de Lapin conjugués à différents degrés de couplage avec l'acide sulfanilique sont analysés contre une  $\gamma$ G-globuline normale de Lapin.

*Digestion des  $\gamma$ G-globulines*: Les  $\gamma$ G-globulines normales de Lapin et anti-*Histoplasma* sont hydrolysées par la mercuri-papaïne (WORTHINGTON BIOCHEMICAL CORPORATION, Freehold, New Jersey) en présence d'EDTA et de cystéine [18]; les fragments obtenus Fab (I et II) et Fc sont séparés sur colonne de carboxyméthyl-cellulose selon PORTER [2].

*Ultracentrifugation*: les  $\gamma$ G-globulines de lapin et leurs fragments papainiques Fab et Fc sont examinés à l'ultracentrifugeuse analytique (BECKMAN SPINCO, modèle E); ils migrent comme des pics symétriques dont les coefficients de sédimentation sont respectivement de 6,5 S pour les  $\gamma$ G-globulines et 3,5 S pour leurs fragments.

*Iodation*: les  $\gamma$ G-globulines immunes et non immunes sont marquées par l'iode 131 selon la technique de McFARLANE [19], modifiée par HELMKAMP et coll. [20], à raison de 0,8 atome d'iode par molécule de  $\gamma$ G-globuline. Les préparations contiennent de minimes quantités de iode fixé par des liaisons non covalentes (moins de 1% de la radioactivité totale de la protéine marquée). La radioactivité est mesurée dans un compteur à cristal, type NUCLEAR Chicago, modèle 1810.

*Saturation de l'*Histoplasma capsulatum* par la  $\gamma$ G-globuline de Lapin immune et non immune*: nous employons une dose constante d'antigène:  $4 \cdot 10^7$  cellules dans 0,1 ml de tampon phosphate salin à pH 7,3 (correspondant à environ 40  $\mu$ g d'azote). 0,5 ml de globulines immunes ou non immunes marquées au  $^{131}\text{I}$ , en concentration croissante, sont incubées pendant 14 h à  $2^{\circ}$  sans agitation avec 0,1 ml de la suspension d'antigène. Après 4 lavages du complexe à  $0^{\circ}$ , chaque fois avec 1,0 ml de tampon phosphate salin à pH 7,3, le culot de centrifugation des cellules (volume: 0,1 ml) est transféré dans un tube à compter et l'on détermine le pourcentage de fixation sur l'*Histoplasma* de la dose de globuline mise en œuvre.

*Préparation des immun-complexes*: nous incubons  $4 \cdot 10^7$  cellules d'*Histoplasma* avec 250  $\mu\text{g}$  de  $\gamma\text{G}$ -globulines spécifiques marquées au  $^{131}\text{I}$ . Le 4,7% de la dose initiale reste fixé après 4 lavages du complexe. Ce rapport antigène- anticorps correspond à un début de saturation de l'*Histoplasma* (voir Fig. 5). Nous avons donc dans un volume de 0,1 ml, environ 12  $\mu\text{g}$  d'anticorps marqués fixés sur  $4 \cdot 10^7$  cellules soit 6  $\mu\text{g}$  d'anticorps- $^{131}\text{I}$  fixés sur 20  $\mu\text{g}$  d'azote de l'antigène dans un volume de 0,05 ml.

*Elution d'anticorps- $^{131}\text{I}$  fixés sur l'antigène par des  $\gamma\text{G}$ -globulines de Lapin immunes ou non des conjugués avec le Fanasil et des fragments de ces protéines natives*: nous répartissons dans une série de petits tubes de 1 ml, 0,05 ml de la suspension de l'immun-complexe ci-dessus, de radio-activité connue (6  $\mu\text{g}$  d'anticorps marqués, fixés sur 20  $\mu\text{g}$  d'azote de l'antigène). Nous ajoutons à chaque tube un large excès (400 à 500  $\mu\text{g}$ ) de  $\gamma\text{G}$ -globulines, de fragments ou de globulines couplées au Fanasil, non marqués. Le volume final est complété à 1,0 ml avec le tampon phosphate salin à pH 7,3. Les tubes sont alors incubés à 37° pendant un temps variable selon les essais, sans agitation. La mesure de la radioactivité restant dans le culot de cellules (ou apparaissant dans le surnageant) après élution et lavages permet de calculer la proportion de  $\gamma\text{G}$ -globulines- $^{131}\text{I}$  éluées de l'antigène.

### RÉSUMÉ

Ce travail traite des modifications physico-chimiques et immunologiques d'anticorps, résultant de leur copulation avec un sulfonamide (Fanasil) et avec l'acide sulfanilique diaotés. La réaction de couplage permet d'introduire à volonté 1 à 70 restes d'haptène par molécule de  $\gamma\text{G}$ -globuline. Bien que la  $\gamma\text{G}$ -globuline native avant couplage soit homogène, les azo- $\gamma\text{G}$ -globulines obtenues par copulation se comportent comme des substances hétérogènes en chromatographie sur DEAE-cellulose. Les  $\gamma\text{G}$ -globulines anti-*Histoplasma capsulatum*, couplées au Fanasil conservent leur pouvoir de fixation à l'antigène. Cette propriété suggère la possibilité de concentrer spécifiquement une quantité appréciable de médicament sur le micro-organisme *Histoplasma*.

Institut de Biochimie de l'Université de Lausanne  
et Département de Médecine expérimentale  
de F. HOFFMANN-LA ROCHE, S. A. (Bâle)

### BIBLIOGRAPHIE

- [1] Bull. Org. mond. Santé 30, 447 (1964).
- [2] R. R. PORTER, Biochem. J. 73, 119 (1959).
- [3] P. GRABAR, J. URIEL & J. COURCON, Ann. Inst. Pasteur 99, 13 (1960).
- [4] A. L. GROSSBERG, G. RADZIMSKI & D. PRESSMAN, Biochemistry 1, 391 (1962).
- [5] O. OUCHTERLONY, Acta pathol. microbiol. scand. 26, 507 (1949).
- [6] B. A. ASKONAS, J. H. HUMPHREY & R. R. PORTER, Biochem. J. 63, 412 (1956); A. SOLOMON, J. L. FAHEY & R. A. MALMGREN, Blood 27, 403 (1963); S. COHEN & R. R. PORTER, Biochem. J. 90, 278 (1964).
- [7] S. J. SINGER, Immunochemistry 1, 15 (1964).
- [8] K. LANDSTEINER, «The Specificity of Serological Reactions», Harvard University Press, Cambridge Mass. 1945.
- [9] M. TABACHNICK & H. SOBOTKA, J. biol. Chemistry 234, 1726 (1959).
- [10] J. C. JATON, Résultats à publier.
- [11] E. D. HUGHES & T. H. RIDD, J. chem. Soc. 1958, 82.
- [12] R. P. BROWN, H. C. DUFFIN, J. C. MAYNARD & J. H. RIDD, J. chem. Soc. 1953, 3937.
- [13] G. GOMORI, «Methods in Enzymology», I, 143, Academic Press Inc., New York 1955.
- [14] E. A. KABAT & M. M. MAYER, «Experimental Immunochemistry», 2nd ed., p. 476, C. C. Thomas, Springfield Ill. 1961.

- [15] A. C. BRATTON & E. K. JR. MARSHALL, *J. biol. Chemistry* 128, 537 (1939).  
 [16] J. L. FAHEY & A. P. HORBETT, *J. biol. Chemistry* 234, 2645 (1959).  
 [17] J. J. SCHEIDEGGER, *Int. Arch. Allergy appl. Immunol.* 7, 103 (1955).  
 [18] F. W. PUTNAM, M. TAN, L. T. LYNN, C. W. EASLEY & S. MIGITA, *J. biol. Chemistry* 237, 717 (1962).  
 [19] A. S. MCFARLANE, *Nature* 182, 53 (1958).  
 [20] R. W. HELMKAMP, R. L. GOODLAND, W. F. BALE, I. L. SPAR & L. E. MUTSCHLER, *Cancer Res.* 20, 1495 (1960).

## 90. Exposition à la lumière de plaques cristallines de bromure d'argent, au cours de leur développement électrolytique

par R. Steiger<sup>1)</sup> et Ch. G. Boissonnas<sup>2)</sup>

(26 XI 65)

L'un de nous a décrit, dans deux publications préliminaires [1] [2], des observations effectuées au cours du développement de plaques polycristallines de bromure d'argent pur, d'épaisseur comprise entre 50 et 200 microns et de 2 cm de diamètre environ.

Le dispositif est reproduit schématiquement sur la fig. 1. La plaque de bromure d'argent flotte sur de l'eau. Un fil de platine est en contact avec la face supérieure. Une goutte d'eau recouvre le point de contact. Afin d'obtenir une différence de potentiel permettant le développement d'un grain d'argent, on place un révélateur photographique dans le récipient de gauche, un pont ionique au nitrate de potassium faisant communiquer les deux récipients. On peut aussi brancher une batterie sur le conducteur métallique si on désire obtenir une réduction plus rapide, le pôle négatif se trouvant du côté du contact platine-bromure d'argent (ce dernier dispositif n'est pas représenté sur la figure). Dans ces conditions on obtient, comme on sait, un grain d'argent s'étendant à partir du point de contact et, lors d'une électrolyse prolongée, traversant la plaque.

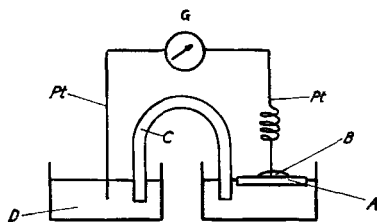


Fig. 1.

*Dispositif schématique d'expérimentation*

- A: Plaque de AgBr flottant sur l'eau  
 B: Goutte de révélateur ou de solvant  
 C: Pont ionique ( $\text{KNO}_3$ )  
 D: Révélateur  
 G: Galvanomètre

Dans la première communication [1] il a été montré que l'intensité du courant d'électrolyse est déterminée par le nombre d'ions bromure quittant le cristal pour passer en solution. Dans la deuxième communication il a été constaté que, si au cours du développement le cristal est exposé à la lumière d'un éclair électronique<sup>3)</sup>, l'intensité du courant s'abaisse brusquement, parfois d'un tiers ou même de la moitié de sa valeur, pour reprendre lentement, après une durée qui peut atteindre 20 minutes, la

<sup>1)</sup> CIBA PHOTOCHEMIE S.A., Fribourg.

<sup>2)</sup> Institut de chimie, Université de Neuchâtel.

<sup>3)</sup> BRAUN BABY F 60, env.  $10^8$  lux pendant  $1/1000$  s.