

*Etude du marquage des anticorps par les dérivés de la 1H, 5H, 11H [1] benzopyrano-[6,7,8-ij] -2,3,6,7-tetrahydro -11-oxo-quinolizine (luminarines)*

**Falaye Traoré, Ahmadou Sadio Diallo, Georges Mahuzier**

*Journal de la Société Ouest-Africaine de Chimie*

*J. Soc. Ouest-Afr. Chim.*(2013), 036 : 26 - 34

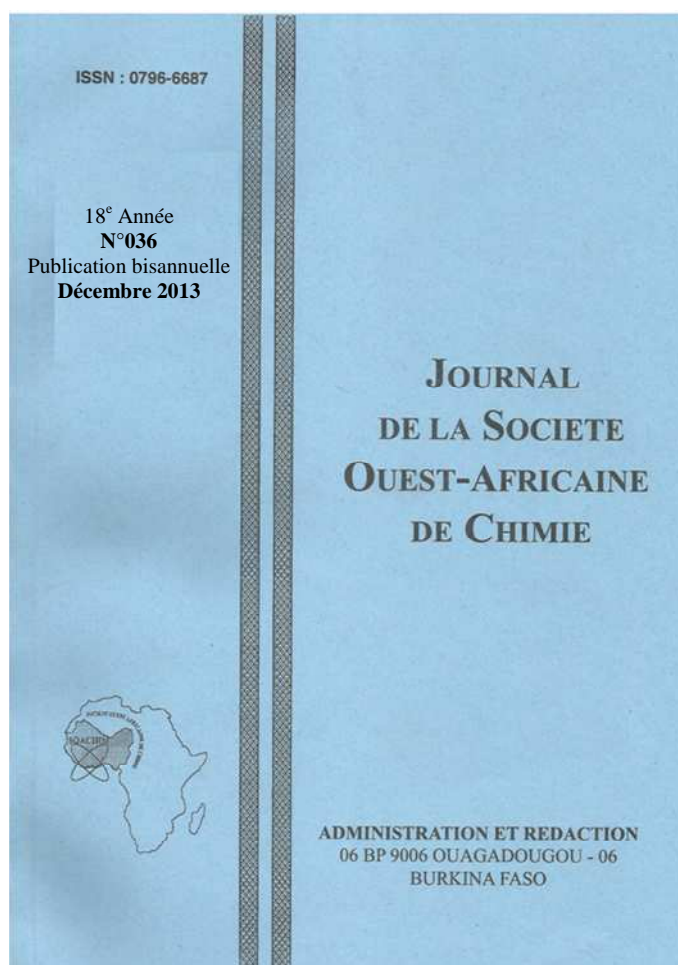
18<sup>ème</sup> Année, Décembre 2013

ISSN 0796-6687

Code Chemical Abstracts : JSOCF2

Cote INIST (CNRS France) : <27680>

Site Web: <http://www.soachim.org>



## **Etude du marquage des anticorps par les dérivés de la 1H, 5H, 11H [1] benzopyrano-[6,7,8-ij] -2,3,6,7-tetrahydro -11-oxo-quinolizine (luminarines)**

**Falaye Traoré<sup>1\*</sup>, Ahmadou Sadio Diallo<sup>2</sup>, Georges Mahuzier<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>*Laboratoire de chimie thérapeutique, Faculté de Médecine-Pharmacie-Odontostomatologie, Université Gamal Abdel Nasser de Conakry, B.P. 1147, CONAKRY, GUINEE*

<sup>2</sup>*Laboratoire de Biochimie, Faculté des Sciences, Université Gamal Abdel Nasser de Conakry, B.P. 1147, CONAKRY, GUINEE*

<sup>3</sup>*Laboratoire de Chimie analytique II, Faculté de Pharmacie, Université Paris XI, 5 rue Jean-Baptiste Clément 92296 CHATENAY-MALABRY, France*

(Reçu le 16/09/2013 – Accepté après corrections le 23 /11/2013)

**Résumé :** Le dosage des molécules d'intérêts biologique et thérapeutique s'avère important dans le diagnostic de certaines pathologies, les études pharmacocinétiques et toxicologiques, et le suivi thérapeutique de nombreux médicaments. Les méthodes analytiques courantes (chromatographie liquide et gazeuse), sont concurrencées par les méthodes immunologiques qui présentent deux qualités intrinsèques : sensibilité et sélectivité. Cependant, elles comportent des lacunes : la modification des chaînes latérales du reste des acides aminés et le manque de spécificité des réactions. Il en résulterait donc un marquage hétérogène, par conséquent une diminution voire perte de l'activité immunologique (affinité anticorps-antigène). Le fait que les immunoglobulines soient des glycoprotéines, il pourrait exister des méthodes spécifiques de modification des oligosaccharides présents sur les immunoglobulines, avec une possibilité d'obtention d'anticorps marqués, dont les sites actifs ne seront non seulement pas affectés, mais l'activité immunologique restera conservée. La présente étude permet donc l'utilisation des luminarines comme marqueurs luminescents des immunoglobulines en utilisant comme modèle, la  $\gamma$ -globuline bovine (IgG) pour étudier les conditions de la réaction de marquage et de purification, le taux de greffage et l'intensité de fluorescence des protéines marquées en fonction du taux de greffage. Les résultats obtenus montrent que les luminarines offrent de nouvelles perspectives d'innovation en immunologie.

**Mots clés :** Luminarines; anticorps; antigènes; immunoglobulines G; marquage, absorbance.

### **Study of marking of antibody by derivatives 1H, 5H, 11H[1]benzopyrano-[6,7,8-ij]-2,3,6,7-tetrahydro-11-oxo-quinolizine (luminarines)**

**Abstract:** The assay of biological molecules and therapeutic interest is important in the diagnosis of some diseases, pharmacokinetic and toxicological studies and therapeutic monitoring of many drugs. Current analytical methods (liquid and gas chromatography) are rivaled by immunological methods have two intrinsic qualities: sensitivity and selectivity. However, they are flawed: the modification of the side chains of amino acids and is the lack of specificity of the reactions. This would result in a heterogeneous marking therefore a decrease or loss of immunological activity (antibody-antigen affinity). That immunoglobulins are glycoproteins there may be specific modification methods oligosaccharides present on immunoglobulins, with the possibility of obtaining labeled antibodies, including active sites not only not be affected and will remain but the immunological activity retained. This study allows the use of luminarines as luminescent markers of immunoglobulins using as a model the bovine  $\gamma$  globulin (IgG) to study the conditions of the labeling reaction and purification, the grafting rate and intensity of fluorescence labeled according to the rate of grafting proteins. The results show that luminarines offer new opportunities for innovation in immunology.

**Keywords :** Luminarines ; antibodies ; antigens ; immunoglobulin G; marking; absorbance.

---

\* Auteur de correspondance : [latraore2005@yahoo.fr](mailto:latraore2005@yahoo.fr)

## 1. Introduction

Les immunodosages regroupent l'ensemble des méthodes analytiques mettant en jeu la réaction antigène-anticorps. Pour la plupart de ces dosages on fait intervenir un troisième élément, le traceur. Celui-ci résulte de l'association de l'antigène ou de l'anticorps avec un « marqueur »<sup>[1]</sup>.

Parmi les méthodes immunologiques, la radioimmunologie basée sur l'utilisation d'un traceur radioactif a longtemps prédominé en raison de sa limite de sensibilité très basse et des qualités du signal (insensibilité aux modifications physicochimiques du milieu, absence d'interférences radioactives dans les échantillons biologiques)<sup>[2]</sup>. Malgré ses avantages, les inconvénients de la radioimmunologie liés principalement à la manipulation de radioisotopes ont favorisé le développement des méthodes non isotopiques et la recherche de nouveaux modes de greffage. Ainsi les traceurs enzymatiques<sup>[1,3]</sup> et luminescents<sup>[3-12]</sup> ont connu une très large expansion.

Cependant, la plupart des techniques de marquage des anticorps (ou d'antigène), basées sur la formation de liaison covalente entre le marqueur et l'anticorps, comportent une modification des chaînes secondaires des acides aminés présents dans ces molécules<sup>[1]</sup>.

Dans le cas particulier des anticorps, cette modification intervient au niveau des restes de tyrosine, le groupement ε-aminé de lysines, le groupement carboxylique des acides aspartique et glutamique, et les groupements sulfhydryles générés par réduction des restes cystines. Un facteur commun à toutes ces approches est le manque de

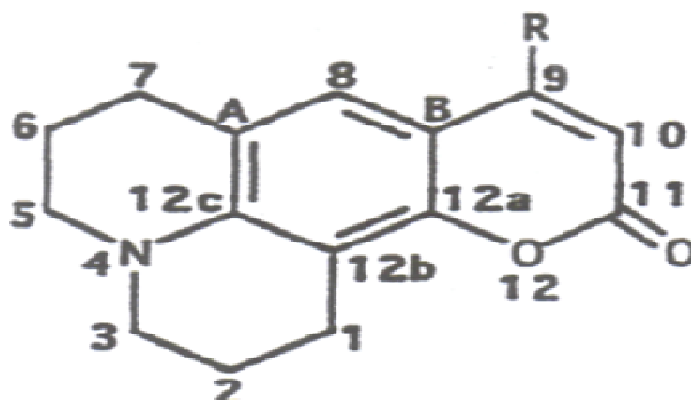
spécificité de ces réactions dans lesquelles le marqueur ne peut être dirigé sur un acide aminé spécifique à un site particulier de l'anticorps. Il en résulte un marquage assez hétérogène et par conséquent une diminution ou une perte complète de l'activité immunologique (affinité de l'anticorps vis-à-vis de l'antigène).

Ainsi, le fait que les immunoglobulines soient des glycoprotéines et qu'il existe des méthodes spécifiques de modification des oligosaccharides présents dans les glycoprotéines<sup>[13-17]</sup>, il est possible d'obtenir des anticorps marqués dont les sites actifs ne sont pas affectés et dont l'activité immunologique est par conséquent conservée.

L'oxydation des oligosaccharides présents au niveau du fragment Fc de l'immunoglobuline, en aldéhydes, par le periodate de sodium, constitue la méthode la plus utilisée. Dans des conditions douces, le periodate de sodium oxyde les fonctions hydroxyles pour former des aldéhydes sans affecter l'activité de l'anticorps. A pH 4 à 5, ces aldéhydes réagissent avec les marqueurs à propriétés nucléophiles (amines ou hydrazides par exemple) pour former des liaisons hydrazones reliant le marqueur à la région Fc de l'immunoglobuline<sup>[13-15]</sup>.

Notre travail a consisté à développer les propriétés spectrales d'absorbance et de fluorescence des réactifs de dérivation possédant le noyau quinolizinocoumarine « les Luminarines »<sup>[18-22]</sup>.

Les Luminarines possédant un groupement fonctionnel hydrazide « Luminarines 3 ; 11 et 12 » (Figure 1), ont été utilisées pour le greffage des immunoglobulines après oxydation par le periodate de sodium. Les performances de marquage ont été comparées à celle de la fluorescéine, réactif couramment utilisé pour le marquage des protéines<sup>[8-10, 23]</sup>.



R: CH<sub>2</sub>-CO-NH-NH<sub>2</sub>

(Lu3)

R: (CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-CO-NH-NH<sub>2</sub>

(Lu11)

R: CH<sub>2</sub>O-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO-NH-NH<sub>2</sub>

(Lu12)

**Figure 1:** Structure des luminarines hydrazides

## 2. Matériel et méthodes

### 2.1. Réactifs et matériel

Tous les réactifs utilisés sont de qualité analytique.

- Le tampon acétate a été préparé selon la formule de Walpole (Tables scientifiques CIBA GEIGY, 1962) :
- Solution A : 0,2M d'acide acétique (12g/l)
- Solution B : 0,2M d'acétate de sodium (16,4g/l d'acétate de sodium)

Dans une fiole jaugée de 100 ml, introduire successivement 8,8 ml de solution A, puis 41,2 ml de solution B et compléter le volume à 100 ml. On obtient ainsi une solution tampon acétate à pH 5,4. Diluer cette dernière au demi pour avoir une solution 100 mM.

- La  $\gamma$  globuline bovine (Cohn fraction II) a été obtenue chez SIGMA (St Louis, MO, USA). Préparer une solution contenant approximativement 2 à 2,5 mg de  $\gamma$ -globuline bovine par ml de tampon acétate (100 mM, pH 5,4). Dans ce travail, nous avons préparé des solutions à 2,4 mg/ml soit 37,5 nmoles de  $\gamma$ -globuline par tube.
- Les luminarines sont obtenues chez EUROBIO (Les Ulis, France). Préparer une solution  $2,5 \times 10^{-2}$  M dans le diméthylsulfoxyde.
- Periodate de sodium (JANSEN CHIMICA, Belgique) ; préparer une solution 0,5M soit 107 mg/ml d'eau.
- Glycérol (PROLABO, France) ; préparer une solution aqueuse 1,5M soit 138,14 mg/ml d'eau. Procéder systématiquement par pesée car le glycérol est un solvant très visqueux ( $d = 1,26$ ).
- Les colonnes de purification des protéines sont de type colonne PD-10 contenant du Sephadex 25-M gonflé dans de l'eau distillée contenant 0,15% de Kathon®CG comme conservateur (PHARMACIA, St. Quentin Les Yvelines, France). Ces colonnes ont un volume et une hauteur de 9,1 ml et 5 cm respectivement.
- Les mesures d'absorbance et de fluorescence ont été réalisées en utilisant respectivement un spectrophotomètre UV-Visible (SHIMADZU Modèle UV-2100) et un spectrofluorimètre (PERKIN ELMER Modèle LS 50).

### 2.2. Méthodes

#### 2.2.1. Réaction de marquage et purification des immunoglobulines marquées

- Equilibrer la colonne PD-10 par 25 ml de

tampon acétate 100 mM (pH 5,4). Bien boucher la colonne par le bas et introduire 2,5 ml du même tampon.

- Dans un tube réactivial® de 5 ml, introduire 2,5 ml de solution de  $\gamma$ -globuline. Ajouter 50  $\mu$ l de solution de periodate de sodium 0,5M, ce qui correspond à 10 mM de periodate de sodium par tube. Bien boucher le tube, l'incuber dans un bain de glace (0°C environ) à l'obscurité et sous agitation magnétique pendant 30 minutes.
- Eliminer l'excès du periodate de sodium par addition de 37,5  $\mu$ l de solution de glycérol 1,5M, ce qui correspond à 15 mM de glycérol par tube. Le periodate de sodium doit être éliminé rapidement pour éviter l'oxydation de l'immunoglobuline elle-même. Bien boucher le tube et laisser sous agitation magnétique à température ambiante pendant 5 à 10 minutes environ.
- Homogénéiser le mélange réactionnel par agitation, puis le passer entièrement sur la colonne PD-10 préalablement équilibrée. Si le volume de l'échantillon est inférieur à 2,5 ml, le compléter par du tampon acétate 100 mM (pH 5,4). En revanche, si le volume est supérieur à 2,5 ml, procéder par des étapes successives de purification à raison de 2,5 ml par étape. En effet, sur recommandation du fabricant de la colonne, les meilleurs rendements et puretés sont obtenus avec les échantillons de faible volume.
- Laisser couler 2,5 ml et jeter l'éluat.
- Eluer les composés à poids moléculaire supérieure à 5000 (IgG par exemple) par 3,5 ml de tampon acétate 100 mM, pH 5,4. Récupérer la totalité de cet éluat dans un tube à essai de 10 ml. Homogénéiser au vortex.
- Ajouter la solution de luminarine hydrazide. Différents rapports molaires (luminarine hydrazide/ $\gamma$ -globuline) ont été utilisés au cours de cette étude :
- Rapport molaire théorique = 5 ; soit 7,5  $\mu$ l de solution de luminarine hydrazide (187,5 nmoles) pour 37,5 nmoles de  $\gamma$ -globuline.
- Rapport molaire théorique = 10 ; soit 15  $\mu$ l de solution de luminarine hydrazide (375 nmoles) pour 37,5 nmoles de  $\gamma$ -globuline.
- Rapport molaire théorique = 20 ; soit 30  $\mu$ l de solution de luminarine hydrazide (750 nmoles) pour 37,5 nmoles de  $\gamma$ -globuline.
- Rapport molaire = 40 ; soit 60  $\mu$ l de solution de luminarine hydrazide (1500 nmoles) pour 37,5 nmoles de  $\gamma$ -globuline.
- Homogénéiser au vortex, puis incuber à la température ambiante et à l'obscurité pendant 120 minutes.

- Purifier la  $\gamma$ -globuline marquée en procédant de la même manière comme décrit ci-dessus.
- Procéder aux différentes déterminations.

### 2.2.2. Détermination du taux de greffage

- La méthode utilisée s'inspire des travaux de Griffoul et coll.,<sup>[24]</sup>.
- Le taux de greffage des anticorps par la luminarine hydrazide est déterminé par le rapport de leurs concentrations molaires, mesurées par leur absorbance.

$$\text{Taux de greffage} = \frac{\text{Concentration molaire en luminarine}}{\text{Concentration molaire en protéine}}$$

Dans le cas de la  $\gamma$ -globuline bovine, une gamme d'étalonnage dans le tampon acétate 100 mM (pH 5,4) est réalisée pour les concentrations suivantes : 0 ; 0,5 ; 1 ; 2 ; 4 et 5  $\mu\text{M}$ . L'absorbance est mesurée à 280 nm. Le coefficient d'absorption molaire est de  $352790 \pm 2,86\%$  ( $1 \text{ mole}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ).

Pour chacune des trois luminarines hydrazides étudiées (luminarine 3, 11 et 12), une gamme d'étalonnage dans le tampon acétate 100 mM (pH 5,4) comportant les points 0 ; 10 ; 20 ; 40 ; 60 ; 80 et 100 mM est réalisée. L'absorbance est mesurée à 280 nm et à la longueur d'onde correspondant au maximum d'absorption de la luminarine hydrazide dans le tampon acétate 100 mM, pH 5,4.

- luminarine 3 ( $\lambda_{\text{ex}} = 409 \text{ nm}$  ;  $\lambda_{\text{em}} = 501 \text{ nm}$ )
- luminarine 11 ( $\lambda_{\text{ex}} = 399 \text{ nm}$  ;  $\lambda_{\text{em}} = 482 \text{ nm}$ )
- luminarine 12 ( $\lambda_{\text{ex}} = 404 \text{ nm}$  ;  $\lambda_{\text{em}} = 510 \text{ nm}$ )

Pour la mesure de la concentration molaire en protéine et en luminarine de l'immunoglobuline marquée, procéder à une dilution dans le tampon acétate 100 mM (pH 5,4) pour avoir une concentration de l'ordre de la micromolaire. Mesurer les absorbances de cette solution à  $\lambda_{280}$  et à  $\lambda_{\text{max}}$  de la luminarine hydrazide fixée sur la protéine. L'absorbance à  $\lambda_{\text{max}}$ , comparée à la gamme d'étalonnage correspondante, fournit la concentration de la luminarine hydrazide.

L'absorbance à  $\lambda_{280}$  est d'abord corrigée pour tenir compte de l'absorbance de la luminarine hydrazide à cette longueur d'onde. La correction d'absorbance à  $\lambda_{280}$  a été établie à partir du rapport des pentes des deux gammes d'étalonnages de luminarine hydrazide mesurées à  $\lambda_{280}$  et  $\lambda_{\text{max}}$  (en nm).

$$A_{\lambda_{280}} \text{ corrigée} = A_{\lambda_{280}} \text{ lue} - (B/B') \times A_{\lambda_{\text{max}}} \text{ lue}$$

$A_{\lambda_{280}} \text{ corrigé}$  : absorbance à  $\lambda_{280}$  corrigée

$A_{\lambda_{280}} \text{ lue}$  : absorbance à  $\lambda_{280}$  lue au spectrophotomètre

$A_{\lambda_{\text{max}}}$  : absorbance à  $\lambda_{\text{max}}$  lue au spectrophotomètre  
 B : pente de la droite de régression de la solution de luminarine hydrazide à  $\lambda_{280}$

B' : pente de la droite de régression de la solution de luminarine hydrazide à  $\lambda_{\text{max}}$

Dans le cas des trois luminarines hydrazides utilisées, on obtient respectivement :

$A_{\lambda_{280}} \text{ corrigée} = A_{\lambda_{280}} \text{ lue} - 0,29 \times A_{409} \text{ lue}$  (pour la  $\gamma$ -globuline marquée avec la luminarine 3)

$A_{\lambda_{280}} \text{ corrigée} = A_{\lambda_{280}} \text{ lue} - 0,26 \times A_{\lambda_{399}} \text{ lue}$  (pour la  $\gamma$ -globuline marquée avec la luminarine 11)

$A_{\lambda_{280}} \text{ corrigée} = A_{\lambda_{280}} \text{ lue} - 0,31 \times A_{\lambda_{409}} \text{ lue}$  (pour la  $\gamma$ -globuline marquée avec la luminarine 12)

En se rapportant à la courbe d'étalonnage de la protéine, l'absorbance corrigée donne la concentration correspondante. Le taux de greffage est calculé par le rapport de la concentration molaire en luminarine hydrazide sur la concentration molaire en protéine, comme nous le soulignons précédemment.

### 3. Résultats et discussion

Le but de cette étude a été essentiellement de présenter une méthode de marquage des anticorps par les luminarines hydrazides.

Une des méthodes couramment utilisées pour analyser les glycoprotéines et les polysaccharides emploie l'oxydation, par voie chimique (periodate de sodium) ou enzymatique (galactose oxydase) des sucres, suivie par la réaction des aldéhydes formés avec un marqueur approprié possédant des propriétés nucléophiles (hydrazides, amines)<sup>[15, 25-27]</sup>.

Dans la pratique, les marqueurs à groupement fonctionnel hydrazide sont préférés aux marqueurs à groupement fonctionnel amine pour deux raisons principales :

- les groupements amines primaires des restes de lysine (groupement  $\epsilon$ -amino) présents dans la molécule d'immunoglobuline sont capables de réagir avec les aldéhydes formés au niveau du fragment Fc après oxydation par le periodate. Il en résulte une compétition entre le marqueur et les groupements amines primaires des restes de lysine.
- le groupement imine (base de Schiff), formé à la suite de la réaction entre une amine et un aldéhyde, est instable et doit être réduit de préférence avec le cyanoborohydrure de sodium, en amine secondaire plus stable.

Ainsi, l'utilisation des marqueurs à fonction amine peut avoir un effet de suppression de l'activité biologique de l'anticorps. Une meilleure façon de préserver cette activité biologique consiste donc à utiliser les marqueurs à groupement fonctionnel hydrazide qui semble être plus spécifiques que ceux à groupement fonctionnel amine [13-15].

Ceci pourrait s'expliquer d'une part, par les valeurs de pK plus basses des hydrazides (pK~3) comparées à celles des amines (pK~ 9-10). D'autre part, les amines et les hydrazides ne réagissent avec les aldéhydes que lorsqu'ils ne sont pas sous la forme protonée ; la grande différence des valeurs de pK entre ces groupes de composés montre que la formation de bases de Schiff entre les aldéhydes formés, après oxydation par le periodate de l'IgG, et les groupements amines primaires des restes de lysine de ces mêmes IgG ne peut avoir lieu en milieu acide. De plus, l'hydrazone formée, comme produit de la réaction entre aldéhyde et hydrazide, est plus stable.

### 3.1. Formation des aldéhydes par oxydation avec le periodate

L'oxydation des hydrates de carbone par le periodate de sodium est une réaction qui dépend de plusieurs facteurs dont : la concentration de l'oxydant, le pH, la température et le temps de réaction.

L'un des risques majeurs de l'oxydation des sucres des glycoprotéines par le periodate est d'oxyder conjointement certains acides aminés de la partie protéinique, particulièrement la cystéine, la cystine,

la méthionine, le tryptophane, la tyrosine et l'histidine. La sérine et la thréonine peuvent également être oxydées lorsqu'elles sont placées en position latérale des chaînes [15]. Toutefois, les études sur les glycoprotéines s'accordent sur le fait que les acides aminés sont moins sensibles à l'oxydation par le periodate lorsqu'ils sont présents dans une chaîne peptidique.

Les conditions optimales retenues par la plupart des auteurs en vue d'une application en routine sont : periodate de sodium 5-10 mM, pH 5,5, température 0°C et temps de réaction 30 minutes.

Dans ces conditions, l'oxydation des acides aminés, même si elle se produit, reste minime. Quoiqu'il en soit, le marquage des oligosaccharides, du fragment Fc de l'immunoglobuline, n'a pas d'effet mesurable sur l'affinité de l'anticorps pour l'antigène [13-15].

C'est donc ces conditions que nous avons utilisées au cours de ce travail.

### 3.2. Influence de l'excès de luminarine hydrazide

Pour chaque luminarine hydrazide, un essai a été réalisé avec la  $\gamma$ -globuline bovine, dans les conditions décrites ci-dessus, en présence de différents excès molaire de luminarine hydrazide : 5, 10, 20 et 40. Les résultats présentés dans les Tableaux I à III montrent que plus l'excès de luminarine hydrazide est important, plus grand est le taux de greffage de la  $\gamma$ -globuline. Toutefois cette relation n'est pas linéaire, comme en témoigne le pourcentage de luminarine hydrazide fixé sur la  $\gamma$ -globuline. Ce dernier diminue en raison inverse de l'excès de luminarine hydrazide.

**Tableau I:** Influence de l'excès de luminarine 3 sur le taux de greffage de la  $\gamma$ -globuline bovine et le pourcentage de luminarine 3 fixé sur la  $\gamma$ -globuline

Excès de Lu.3 (mole)	Conc.de Lu.3 ( $\mu$ M)	Conc. de globuline ( $\mu$ M)	Taux de greffage	Intensité de fluorescence(U.A.)	Pourcentage de Lu.3 fixé <sup>a</sup> (%)
5	16,19	3,77	4,29	830	85,80
10	18,35	3,84	4,78	1070	47,80
20	33,40	4,20	7,95	1420	39,75
40	37,44	4,13	9,07	1530	22,68

<sup>a</sup>Pourcentage de Lu.3 fixé sur la  $\gamma$ -globuline = (Taux de greffage/Excès de Lu.3) x 100

**Tableau II:** Influence de l'excès de luminarine 11 sur le taux de greffage de la  $\gamma$ -globuline bovine et le pourcentage de luminarine 11 fixé sur la  $\gamma$ -globuline

Excès de Lu.11 (mole)	Conc.de Lu.11 ( $\mu$ M)	Conc. de $\gamma$ -globuline ( $\mu$ M)	Taux de greffage	Intensité de fluorescence(U.A.)	Pourcentage de Lu.11 fixé <sup>a</sup> (%)
5	18,73	4,47	4,19	1150	83,80
10	39,03	5,05	7,73	1760	77,30
20	45,96	4,78	9,62	1870	48,10
40	51,05	4,47	11,42	1910	28,55

<sup>a</sup>Pourcentage de Lu.11 fixé sur la  $\gamma$ -globuline = (Taux de greffage/Excès de Lu.11) x 100

**Tableau III:** Influence de l'excès de luminarine 12 sur le taux de greffage de la  $\gamma$ -globuline bovine et le pourcentage de luminarine 12 fixé sur la  $\gamma$ -globuline

Excès de Lu.12 (mole)	Conc.de Lu.12 ( $\mu$ M)	Conc. de $\gamma$ -globuline ( $\mu$ M)	Taux de greffage	Intensité de fluorescence(U.A.)	Pourcentage de Lu.12 fixé <sup>a</sup> (%)
5	8,26	3,54	2,33	460	46,60
10	15,26	3,65	4,18	580	41,80
20	24,40	4,50	5,42	900	27,10
40	28,91	4,53	6,38	1010	15,95

<sup>a</sup>Pourcentage de Lu.12 fixé sur la  $\gamma$ -globuline = (Taux de greffage/Excès de Lu.12) x 100

D'une manière générale, le taux de greffage mesuré est légèrement inférieur au taux théorique. Des taux de marquage similaires ont été déjà obtenus avec l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) en utilisant une autre technique de marquage [8-10, 23]. Avec un rapport molaire théorique FITC/Protéine de 2 et 24, des taux de marquage de 1,3 et 7,3 et un pourcentage de FITC lié aux protéines de 70 et 30% sont rapportés [8-10, 23].

Quant à l'intensité de fluorescence de la  $\gamma$ -globuline marquée, elle n'augmente pas proportionnellement au taux de greffage mais tend plutôt vers une limite. Les résultats obtenus restent toutefois satisfaisants compte tenu de l'usage

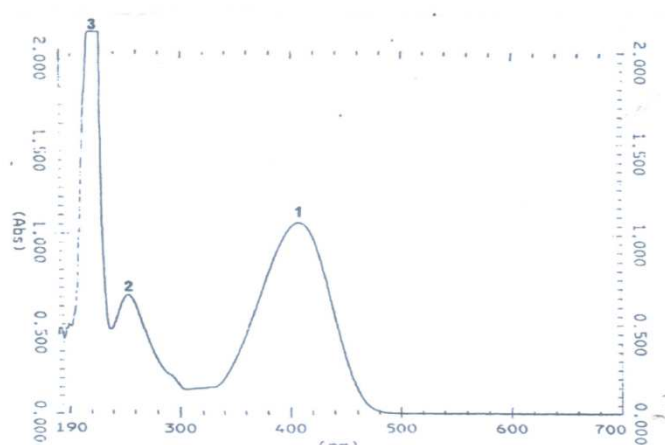
### 3.3. Purification de la $\gamma$ -globuline marquée par chromatographie d'exclusion

Pour étudier la purification de la  $\gamma$ -globuline marquée, une expérience préliminaire a été réalisée à partir d'un excès de luminarine hydrazide, par rapport à la  $\gamma$ -globuline, égale à 40. Les différents éluats sont recueillis par fractions de 500  $\mu$ l, et deux microlitres de chaque fraction sont déposés sur une plaque de silice. La protéine marquée est alors visualisée à 254 nm et à 366 nm. Il en résulte que quel que soit la luminarine hydrazide utilisée, la  $\gamma$ -globuline marquée se retrouve concentrée dans les fractions 6, 7 et 8. La première fraction contient probablement de la  $\gamma$ -globuline non ou faiblement marquée par les luminarines hydrazides. A partir de la deuxième fraction, on observe une augmentation de l'intensité du dépôt et ceci de façon croissante jusqu'à la huitième fraction. Puis, cette intensité diminue jusqu'à la douzième et dernière fraction. Ceci nous amène à supposer que les molécules de  $\gamma$ -globuline ne sont pas marquées au même degré. C'est pourquoi, nous avons préféré effectuer les différentes déterminations sur la totalité des fractions. Ainsi, les taux de greffage obtenus représentent un taux moyen de greffage. L'emploi des colonnes d'extraction du type Sephadex 25-M, pour la purification de la  $\gamma$ -globuline oxydée et

marquée respectivement par leperiodate de sodium et les luminarines hydrazides, montre que le taux de recouvrement est fonction du taux de greffage. Les faibles taux de greffage donnent lieu au plus haut taux de recouvrement.

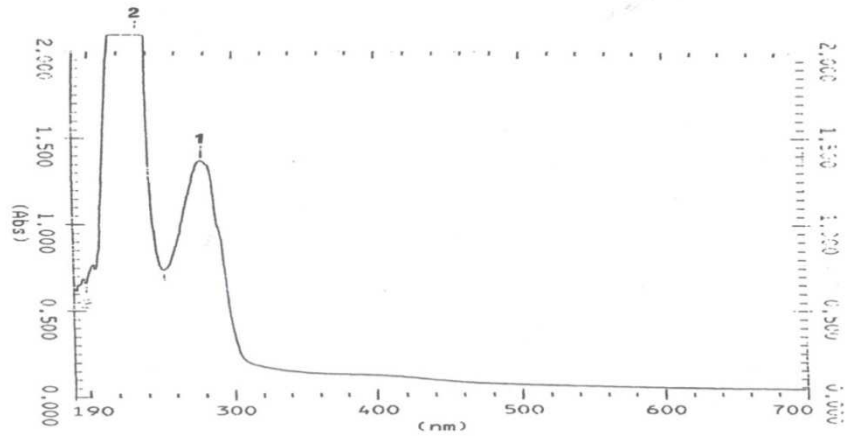
La spécificité de la réaction de marquage de la  $\gamma$ -globuline, ainsi que la qualité de la purification de la protéine marquée ont été confirmées comme nous le montrent, à titre d'exemples, les **Figures 2-6**. Il apparait clairement sur ces figures que :

- le spectre d'absorption de la luminarine 3 comporte un maximum à 409 nm (**Figure 2**) ;
- le spectre d'absorption de la  $\gamma$ -globuline ne présente pas de bande à 409 nm (**Figure 3**) ;
- le spectre d'absorption de la  $\gamma$ -globuline non oxydée par le periodate de sodium mais après ajout de luminarine 3 ne présente pas de bande correspondant au maximum de la luminarine 3 à 409 nm (**Figure 4**) ;
- le spectre de la  $\gamma$ -globuline oxydée par le periodate de sodium après ajout de la luminarine 3, en excès de 10 (**Figure 5**) et de 40 (**Figure 6**) présente un maximum à 406 et 405 nm respectivement.

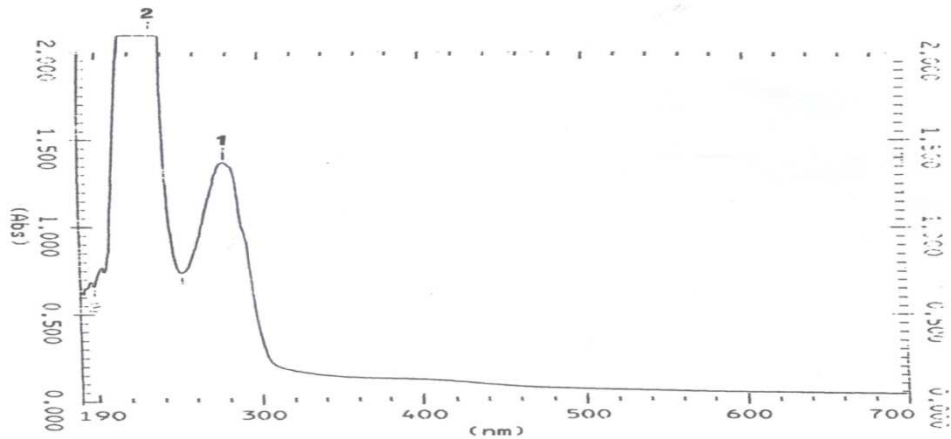


**Figure 2:** Spectre d'absorption de la luminarine 3 dans le tampon acétate 100 mM, pH 5,4.

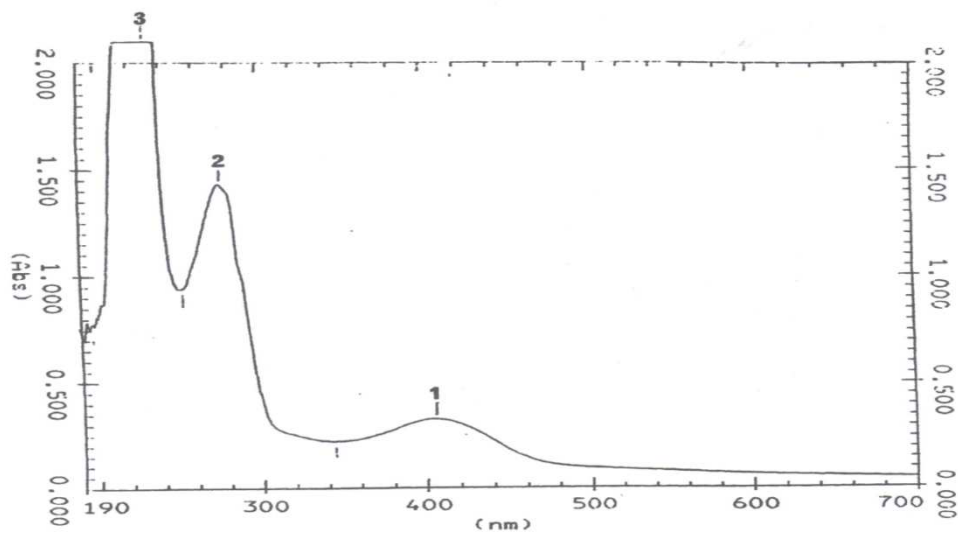
1 =  $\lambda$  409 nm ; 2 =  $\lambda$  254 nm ; 3 =  $\lambda$  224 nm



**Figure 3:** Spectre d'absorption de la  $\gamma$ -globuline pure dans le tampon acétate 100 mM, pH 5,4.  
1=  $\lambda$  279 nm ; 2=  $\lambda$  231 nm

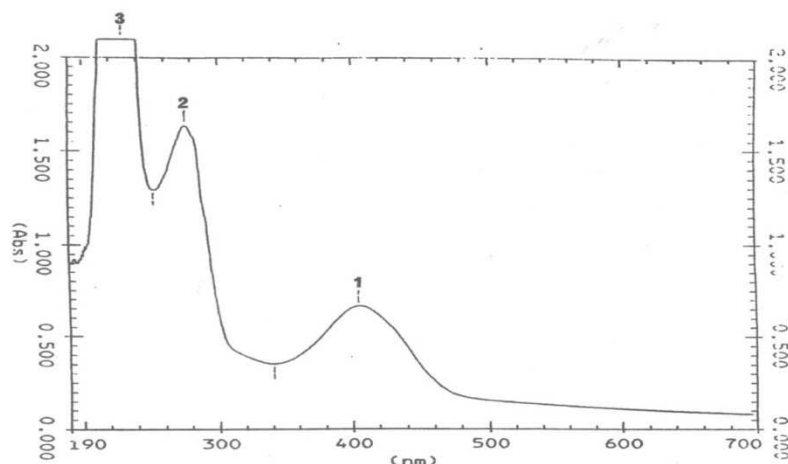


**Figure 4:** Spectre d'absorption de la  $\gamma$ -globuline, non oxydée par le periodate de sodium, qu'on a fait réagir avec la luminarine 3 en excès de 40, dans le tampon acétate 100 mM, pH 5,4.  
1=  $\lambda$  278 nm ; 2=  $\lambda$  233nm



**Figure 5:** Spectre d'absorption de la  $\gamma$ -globuline, oxydée par le periodate de sodium, qu'on a fait réagir avec la luminarine 3 en excès de 10, dans le tampon acétate 100 mM, pH 5,4.  
1=  $\lambda$  406 nm ; 2=  $\lambda$  277nm ; 3=  $\lambda$  231 nm





**Figure 6:** Spectre d'absorption de la  $\gamma$ -globuline, oxydée par le periodate de sodium, qu'on a fait réagir avec la luminarine 3 en excès de 40, dans le tampon acétate 100 mM, pH 5,4.

1=  $\lambda$  405 nm ; 2=  $\lambda$  277nm ; 3=  $\lambda$  230 nm

Ceci prouve qu'il faut que la partie glucidique de l'immunoglobuline (fraction Fc) soit oxydée pour que la luminarine se fixe dessus.

Enfin, le marquage de la  $\gamma$ -globuline par les luminarines hydrazides ne modifie pas ses caractéristiques de migration en électrophorèse. Après marquage, on observe par rapport au témoin IgG une même bande homogène, ce qui laisse suggérer l'absence d'artéfacts entraînés par le marquage. Ceci peut être intéressant pour l'application en immunoelectrophorèse.

#### 4. Conclusion

L'ensemble de ces travaux permet d'envisager le marquage d'un anticorps monoclonal. La spécificité de la réaction de marquage, ainsi que la qualité de la purification et la mobilité électrophorétique de l'immunoglobuline ont été confirmées.

Il reste cependant à étudier la stabilité de la protéine marquée ainsi que l'hétérogénéité du taux de greffage par chromatographie liquide par exemple, afin de parfaire la caractérisation de la protéine.

Cette méthode de marquage des immunoglobulines par les luminarines hydrazides ouvre de nouvelles perspectives d'application pour ces marqueurs, particulièrement en immunodosages et en détection par immunofluorescence.

#### Bibliographie

[1]. Barbier Y., Les immunodosages : de la théorie à la pratique. Editions de l'ACOMEN, 1989.  
 [2]. Bourdon R. et Bourdon-Ranisteano S., *Analisis* (1983) 11 ; 309-326.  
 [3]. Gosling J.P., *Clin. Chem.*, (1990) 36; 1408-1427.

[4]. Karnes H.T., O'Neal J.S and Schulman S.G., Part 1 (Chemical Analysis), Ed. S.G.SCHULMAN, Wiley and Sons, New York-Chichester-Brisbane-Toronto-Singapore, (1985) 77; 717-779.

[5]. Hemmila I., Malminen O., Mikola H. and Lovgren T., *Clin. Chem.*, (1988) 43; 2320-2322.

[6]. Bador R., Dechaud H., Claustrat F. and Desuzinges C., *Clin. Chem.*, (1987) 33; 48-51.

[7]. Valeur B., *Invitation à la Fluorescence Moléculaire*. De Boeck, 2004, Bruxelles

[8]. Valeur B., *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*, Editions Wiley-VCH, 2002

[9]. Haugland, R., *The Handbook: A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*, 10th ed., Molecular Probes Intvitrogen, 2005.

[10]. Horobin, R. W. Kiernan, J. A., *Conn's Biological Stains (10th edition). A Handbook of dyes, stains and fluorochromes for use in biology and medicine*. Garland Sciences, 2002, London.

[11]. Lamb, D.C., Muller, B.K., Brauchle, C., *Curr. Pharm. Biotechnol.*, (2005) 6, 405-14.

[12]. Bolte S, Talbot C, Boutte Y, Catrice O, Read ND, Satiat-Jeunemaitre B., *J. Microscopy*, (2004)214, 159-173

[13]. O'Shannessy D.J., Dobersen M.J. and Quarles R.H., *Immonol. Lett.*, (1984) 8, 273-277.

[14]. O'Shannessy D.J. and Quarles R.H., *J.Appl.Biochem.*, (1985) 7, 347-355.

[15]. O'Shannessy D.J. and Quarles R.H., *J.Immunol.Methods*, (1987) 99, 153-161.

[16]. Wilchek M. and Bayer E.A., *Methods Enzymol.*, (1987) 138, 429-442.

[17]. Vanstraelen M., Baloban M., Da Ines O., Cultrone A., Lammens T., Boudolf V., Brown SC., De Veylder L., Mergaert P., Kondorosi E. *APC/*, (2009). *PNAS* 106 (28): 11806-11811

[18]. FalayeTraoré, Patrice Prognon and Georges Mahuzier, *Anal. Chim. Acta*, (1994) 294, 75-84.

- [19]. F. Traoré, C. Fente, P. Prognon and Georges Mahuzier, *Anal. Chim. Acta*, (1994) 290, 94-102.
- [20]. FalayeTraoré, Robert Farinotti and Georges Mahuzier, *J. Chromatogr.*, (1993) 648, 111-118.
- [21]. F. Traoré, G. A. Pianetti, L. Dallery, M.Tod, J. Chalom, R. Farinotti and G. Mahuzier, *Chromatographia*, (1993) 36, 96-104.
- [22]. F. Traoré, M. Tod, J. Chalom, R. Farinotti and Georges Mahuzier, *Anal. Chim. Acta*, (1992) 269, 211-222.
- [23]. The T.H. and Feltkamp T.E.W., *Immunology*, (1970) 18, 865-873.
- [24]. Griffoul C., Tod M. and Chalom J., *Etude du marquage d'anticorps par la luminarine 2. Mémoire de Diplôme d'Université de Chimie thérapeutique de l'Université Paris XI, ChatenayMalabry*, 1991.
- [25]. O'Shannessy D.J., Voorstad P.J. and Quarles R.H., *Anal. Biochem.*, (1987) 163, 204-209.
- [26]. Bayer E.A., Ben-Hur H. and Wilchek M., *Anal. Biochem.*, (1988) 170, 271-281.
- [27]. Wilchek M. and Bayer E.A., *Methods Enzymol.*, (1987) 138, 429-442.