

## PARAMÈTRES DE LIAISON DU 16 $\alpha$ , 17 $\beta$ -ESTRIOL AVEC DES IMMUNSÉRUMS ANTIESTRIOL HAUTEMENT SPÉCIFIQUES DE LAPINS ET DE BREBIS

L. SAVU, S. de LAUZON, P. ROMBAUTS\* and M.F. JAYLE

*Laboratoire de Biochimie Médicale, Laboratoire Associé 87 du CNRS UER des Saints Pères,  
45 rue des Saints Pères, 75-Paris 6e-France*

et

*\* INRA-CNRZ-78-Jouy-en-Josas, France*

Received 18 June 1973

The binding of 16  $\alpha$ , 17  $\beta$ -estriol to highly specific rabbit and ewe anti-estriol antisera is studied comparatively, with an equilibrium dialysis technique. The affinity indices, association constants and concentrations of binding sites are measured. These parameters are discussed in relation to some immunological characteristics of the sera, previously determined by radioimmunoassay.

### 1. Introduction

Nous avons décrit récemment [1] la préparation et quelques propriétés d'immunsérums anti-16  $\alpha$ , 17  $\beta$ -estriol, obtenus chez le lapin et la brebis par injection du produit de couplage du 16  $\alpha$ , 17  $\beta$ -estriol-6-*O* (carboxyméthyl)oxime avec la sérum albumine bovine. Un immunsérum similaire a été préparé par Lindner et col. [2].

Nous nous proposons ici de mesurer, au moyen d'une technique basée sur la dialyse à l'équilibre, les indices d'affinité, les constantes d'association moyennes et la concentration des sites caractérisant la liaison de l'estriol avec ces immunsérums. Les relations entre ces paramètres et les caractéristiques immunologiques déterminées antérieurement par radioimmuno-dosage seront également analysées.

### 2. Matériel et méthodes

#### 2.1. Préparation des immunsérums

Une brebis et deux lapines (L 1244 et L 1258) sont immunisées selon le procédé déjà décrit [1, 3], comportant l'injection sous-cutanée hebdomadaire

d'antigène, répétée pendant 32 semaines. Trois lapines, (L 8393, L 8398 et L 8401) sont immunisées selon un procédé modifié [4]: les animaux reçoivent une injection intradermique répartie en une cinquantaine de points et deux rappels.

#### 2.2. Stéroïdes

Estriol-16  $\alpha$ , 17  $\beta$ , 6, 7 [ $^3\text{H}$ ]NEN (42,2 Ci/mM).  
Estriol cristallisé Roussel UCLAF.

La solution de stéroïde radioactif utilisée dans toutes les expériences est un mélange d'estriol tritié et d'estriol non radioactif, ayant une concentration finale de 5 ng par millilitre de solution éthanolique.

#### 2.3. Comptage de la radioactivité

Pour 0,2 ml de solution analysée, on ajoute 5 ml d'un liquide scintillant à base de dioxane. La radioactivité est mesurée sur un Spectromètre à Scintillation Liquide Intertechnique. Rendement moyen: 45%.

2.4. Le dosage des protéines est effectué selon la méthode de Lowry et col. [5].

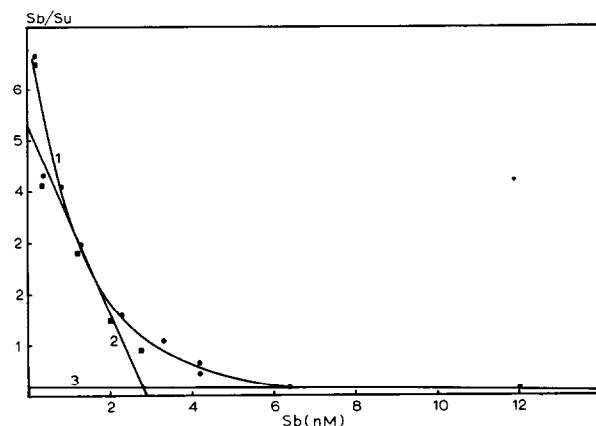


Fig. 1. Liaison de l'estriol par l'immunsérum antiestriol de la lapine L 8398: Courbe 1, points expérimentaux, représentation selon Scatchard; Courbe 2, correction d'après Rosenthal, correspondant à la liaison aux anticorps spécifiques.  $K_1 = 1,78 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ ;  $n_1 M_1 = 2,7 \times 10^{-9} / \text{L}$  dans le volume externe — ou  $n_1 M_1 = 0,14 \times 10^{-6} / \text{g}$  de protéines sériques. Courbe 3, Liaison non spécifique à l'albumine.

## 2.5. Mesure des indices d'affinité et des constantes de liaison

Nous utilisons la technique de Pearlman et Crépy [6] basée sur la dialyse à l'équilibre en présence d'un gel de Séphadex G-25, en une série de tubes séparés.

L'indice d'affinité  $1/P$  (L/G) représente l'inverse de la concentration en protéines, dans le milieu de dialyse, pour laquelle le rapport stéroïde libre (Su)/stéroïde lié (Sb) est égal à l'unité. Il est mesuré en présence d'une quantité constante de la solution de stéroïde radioactif (environ 1 ng/tube) et de quantités croissantes de protéines sériques.

Pour la détermination, selon Scatchard [7], des constantes d'association moyennes  $K_a$  et des produits  $n_1 M_1$ , c'est-à-dire nombre de sites de liaison  $\times$  moles de protéines liantes, nous utilisons une variante de la méthode de Pearlman et Crépy [6]. Les dosages sont effectués en présence d'une quantité constante de protéines sériques (cette quantité est fonction du sérum utilisé: dans nos expériences, elle est d'environ 0,06 ou 0,012 mg de protéines par tube) et de quantités croissantes de stéroïde. Pour les concentrations les plus faibles, nous utilisons uniquement la solution de stéroïde radioactif définie ci-dessus (de 0,01 ng à 1 ng par tube); pour les concentrations les plus élevées, nous ajoutons à une quantité fixe de stéroïde tritié (1 ng) des quantités croissantes de stéroïde non radioactif (1,5 à 500 ng).

Tableau 1

Paramètres de liaison entre l'estriol et les immunsérums de brebis et de lapines, mesurées par dialyse à l'équilibre à 25°C. Indices d'affinité  $1/P$ , constantes d'association  $K_a$ , produits  $n_1 M_1$  ou nombre de sites de liaison  $\times$  moles de protéine liante rapportées au gramme de protéines sériques; titre et sensibilité des sérums mesurés par radioimmunosage.

Immunsérum	$1/P$ g/l	$K_a$ $10^9 \text{ M}^{-1}$	$n_1 M_1$ $10^{-6} / \text{g}$	Titre	Sensibilité pg
*Brebis 2038	150	0,9	4,3	1/1500	200
*Lapine 1244	48	2,1	0,02	1/700	20
*Lapine 1258	125	2,5	0,08	1/2000	20
**Lapine 8393	180	2,4	0,17	1/5000	20
**Lapine 8398	210	1,8	0,14	1/2500	50
**Lapine 8401	260	2,7	0,26	1/6000	10

\* Immunisation par injections sous-cutanées hebdomadaires durant 32 semaines.

\*\* Immunisation par 3 injections intradermiques.

Toutes les mesures sont effectuées dans un tampon phosphate 0,15 M, pH 7,4 à 25°C.

Les données obtenues sont traitées sur les calculatrices Programma Olivetti et multi 8 Inter technique. Les paramètres de la liaison sont calculées au moyen des méthodes graphiques de Scatchard [7] et de Rosenthal [8].

## 3. Résultats et discussion

Dans la fig. 1, nous reproduisons la courbe selon Scatchard et la correction de Rosenthal correspondant au sérum de lapine L 8398. La correction de Rosenthal est rendue nécessaire par l'existence d'une faible liaison de l'estriol à une protéine sérique différente des immunoglobulines, sans doute l'albumine. Des courbes similaires ont été obtenues pour tous les sérums testés.

Le tableau 1 présente l'ensemble des résultats concernant le sérum de brebis et les 5 sérums de lapines. Pour comparaison, nous reproduisons dans les deux dernières colonnes les indices mesurés par radioimmunosage. Rappelons que le titre est la dilution du sérum correspondant à 50% de liaison d'une quantité égale ou inférieure à 100 pg de stéroïde radioactif. La sensibilité est définie par la plus petite quantité de stéroïde non radioactif capable de déplacer environ

10% du stéroïde traceur de son complexe avec l'anticorps.

### 3.1. Incidence d'affinité $1/P$

On voit que les indices d'affinité  $1/P$  sont très élevés, dépassant quelquefois 200. A notre connaissance, on n'a pas encore mesuré ces paramètres dans un système antigène-anticorps. En ce qui concerne les indices  $1/P$  déterminés pour différents complexes stéroïdes—protéines, des valeurs comparables à celles que nous trouvons ici n'ont été rapportées que dans le cas de la liaison de l'estrone ou de l'estradiol par le sérum embryonnaire de rat [9].

Les indices  $1/P$  sont supérieurs chez les lapines immunisées avec trois injections intradermiques, par comparaison avec celles ayant reçu des injections sous-cutanées répétées pendant 32 semaines. Ces résultats concordent avec ceux de l'analyse par radio-immunodosage du titre des sérums. Toutefois, la concordance entre les indices  $1/P$  et les titres n'est pas parfaite: on observe par exemple que la brebis a un  $1/P$  légèrement plus élevé mais un titre un peu inférieur à ceux de la lapine L 1258.

### 3.2. Paramètres de liaison calculés à partir des courbes de Scatchard ( $K_a$ , $n_1M_1$ )

Les constantes d'association moyenne ont sensiblement la même valeur pour tous les sérums de lapines expérimentées et sont de l'ordre de  $2,3 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$  à  $25^\circ\text{C}$ . Par contre, les produits  $n_1M_1$  rapportés au gramme de protéines sériques, présentent entre les sérums des différentes lapines, des variations significatives. ' $n_1$ ' étant probablement égal à 2 dans tous les cas, les valeurs de  $n_1M_1$  reflètent la concentration des anticorps dans les sérums. On voit que cette concentration est nettement plus élevée quand les lapines ont été immunisées selon le procédé des 3 injections intradermiques. Il y a une bonne concordance entre les titres des sérums.

Les paramètres caractérisant la liaison de l'estriol par le sérum de la brebis diffèrent sensiblement de celles mesurées chez les lapines. La constante d'association moyenne est près de trois fois plus faible tandis que le produit  $n_1M_1$  est de 20 à 200 fois plus élevé. La valeur relativement faible de la constante d'association chez la brebis se traduit également dans la sensibilité réduite du sérum de brebis, par comparaison avec les sérums de lapines. Dans l'ensemble, on

constate une très bonne concordance entre les valeurs des constantes d'association mesurées par la méthode de dialyse à l'équilibre et les indices de sensibilité déterminés par radioimmunodosage.

Aucune corrélation n'a été trouvée entre les paramètres de liaison des différents sérums testés et leur degré de spécificité vis à vis de l'estriol. Mentionnons que l'immunsérum de la lapine L 1244, dont les indices  $1/P$  et  $n_1M_1$ /g de protéines sont les plus bas, présente la meilleure spécificité.

Les constantes d'association, de l'ordre de  $1$  à  $2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ , mesurées pour les immunsérums obtenus avec notre antigène sont beaucoup plus élevées que celles de  $1,1 \times 10^7$  (température non précisée) rapportée par Gross et col. pour un sérum antiestriol préparé au moyen d'un azo-dérivé de l'hormone [10]. Elles sont comparables à la constante d'association moyenne de l'ordre de  $4 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ , mesurée à  $4^\circ\text{C}$  dans le cas du sérum antiestradiol-17  $\beta$  décrit par Exley et col. [11].

Actuellement, nous étudions les paramètres thermodynamiques de la liaison entre l'estriol et les immunsérums, afin de mieux préciser la nature de cette interaction.

### Bibliographie

- [1] de Lauzon, S., Desfosses, B., Rombauts, P., Dray, F., Uhrich, F. et Jayle, M.F. (1972) *Comp. Rend.* 274, 3023.
- [2] Lindner, H.R., Perel, E., Friedlander, A., Zeitlin, A. (1972) *Steroids* 19, 357.
- [3] Zimmering, P.E., Lieberman, S. and Erlanger, B.F. (1967) *Biochemistry* 6, 154.
- [4] Vaitukaitis, J., Robbins, J.B., Nieschlag, E. and Ross, G.T. (1971) *J. Clin. Endocrinol.* 33, 988.
- [5] Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. et Randall, R.Y. (1957) *J. Biol. Chem.* 193, 265.
- [6] Pearlman, W.H. et Crépy, O. (1967) *J. Biol. Chem.* 142, 182.
- [7] Scatchard, G. (1949) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 51, 660.
- [8] Rosenthal, H.E. (1967) *Anal. Biochem.* 20, 525.
- [9] Nunez, E., Savu, L., Engelmann, F., Benassayag, C., Crépy, O. et Jayle, M.F. (1971) *Compt. Rend.* 273, 242.
- [10] Gross, S.G., Grant, J.D., Bennett, R., Wong, S.L.R. et Lomax, P. (1971) *Steroids* 18, 555.
- [11] Exley, D., Johnson, M.W. et Dean, P.D.G. (1971) *Steroids* 18, 605.