



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

158f - 127 ref.

UNIVERSITE HENRI POINCARÉ – NANCY 1
ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE ET SANTE



N° attribué par la bibliothèque

0319

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARÉ - NANCY 1

Discipline : Génie Biologique et Médical

Présentée et soutenue publiquement

par

Laura Verónica PLA

Le 25 octobre 2000

**CONTRIBUTION A L'ETUDE DE L'AFFINITE DES ANTICORPS
MONOCLONAUX PAR DES METHODES D'OPTIQUE PHYSIQUE**

Président du jury :	Professeur J.-F. STOLTZ	U.H.P., Nancy
Membres du jury :	Professeur R.J. RASIA	U.N.R., Rosario, Argentine
	Professeur J.R. VALVERDE	U.N.R., Rosario, Argentine
	Docteur M.-L. VIRIOT	D.R., CNRS, INPL, Nancy
Rapporteurs :	Professeur R. SANTUS	INSERM, Paris
	Docteur B. SENGER	D.R., INSERM, Strasbourg
Directeur de Thèse :	Docteur S. MULLER	C.R., INSERM, Nancy

AVANT – PROPOS ET REMERCIEMENTS

Ce travail de thèse a été mené conjointement à Nancy (Laboratoire d'Angiohématologie - Hémothéologie, LEMTA - UMR CNRS 7563, Faculté de Médecine, UHP - Nancy 1) et à Rosario (Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmaceuticas, UNR) dans le cadre d'une convention Université Henri Poincaré - Faculté de Médecine de Nancy - Université Nationale de Rosario et aidé par l'Ambassade de France à Buenos Aires.

A ma mère

Je remercie très vivement Monsieur le Professeur **J.-F. STOLTZ**, Directeur du laboratoire, qui m'a fait l'honneur de m'y accueillir, pour l'intérêt continu qu'il a porté à mon travail et son soutien financier et scientifique.

J'exprime ma très profonde gratitude et mon estime à Madame le Professeur **J.R. VALVERDE** et à Monsieur le Professeur **R.J. RASIA** pour leur aide, leur disponibilité, leurs conseils, leur constante motivation et la confiance qu'ils m'ont témoignée à tout moment et en tout lieu.

Je suis reconnaissante à Madame le Docteur **M.-L. VIRIOT** pour m'avoir fait l'honneur d'être membre du jury de cette thèse.

Je remercie très sincèrement Monsieur le Professeur **R. SANTUS** pour avoir accepté, au dernier moment, d'être rapporteur de cette thèse.

J'exprime ma reconnaissance et mon profond respect à Monsieur le Docteur **B. SENGER** pour avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie très sincèrement Madame le Docteur **S. MULLER** pour son aide et son guide scientifique qui m'ont permis de mener à bien ce travail.

Je souhaite également exprimer ma reconnaissance à tous ceux qui m'ont aidé dans ce travail et notamment à :

Monique Gentils et **Ghislaine Cauchois** pour leur gentillesse, leur aide et leur disponibilité.

Véronique Regnault pour son aide et ses conseils techniques.

Tous les membres du laboratoire pour leur sympathie et leur soutien : **Brigitte, Dominique, Claude, Walter, Xiong, Pascale, Michel, Annie**, Monsieur **Maurice, Joëlle**, ainsi que toutes mes collègues : **Ruijuan, Vénus, Céline, Hong** et **Natalia**.
Mes collègues du laboratoire à Rosario particulièrement : **Marcela, Patricia, Luciana, Silvana, Valeria**.

Je remercie également tous les membres de l'Etablissement Français du Sang de Brabois ainsi que les donateurs de sang.

Je tiens à adresser mes sincères remerciements à **Nora Fernández** pour ses conseils en français et sa gentillesse.

Je tiens également à remercier toutes celles et tous ceux qui m'ont soutenue et encouragée pour finir ce travail.

A tous mes **amis** d'ici et de l'Argentine.

A ma **famille**.

A **Miguel**, en témoignage de tout mon amour.

A mon frère **Gabriel** et à **María Rosa, Natalia** et **Tomás** avec toute ma tendresse.

A la **France** pour m'avoir donné la possibilité de réaliser un rêve.



TABLE DE MATIERES

	Pages
Avant-propos et remerciements	2
Liste des articles et communications	10
Table des illustrations	14
INTRODUCTION GENERALE	20
Première partie : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES	26
I. LE SANG	27
A. Les érythrocytes	28
La membrane érythrocytaire	30
1. Les différentes parties de la membrane érythrocytaire	31
a) Les lipides	32
b) Les protéines	33
▪ Le squelette membranaire	34
▪ Les protéines intrinsèques	35
2. Rôle et fonction de la membrane érythrocytaire	37
a) Les fonctions mécaniques	37
▪ La déformabilité	37
▪ L'agrégation érythrocytaire	40
b) La fonction support : les antigènes de la membrane	48
B. Les groupes sanguins	48
Le système ABO	49
1. Immunologie et biochimie des antigènes ABH	49
2. Sous-groupe des antigènes A	53
3. Groupes A faibles	54

II.	LES IMMUNOGLOBULINES	55
	A. Structure des IgG	56
	B. Différentes classes d'immunoglobulines	60
	C. La reconnaissance des antigènes	62
III.	LES ANTICORPS MONOCLONAUX	66
	▪ Technique de production des anticorps monoclonaux	67
IV.	L'AGGLUTINATION ERYTHROCYTAIRE	69
	A. Facteurs de l'agglutination	70
	1. Surface des globules rouges	70
	2. Anticorps	70
	3. Milieu de réaction	71
	B. L'agglutination artificielle	74
V.	METHODES D'ANALYSE DE L'AGGLUTINATION	75
	1. Méthodes d'observation directe	75
	2. Méthodes optiques	77
	3. Autres méthodes	79
Deuxième partie : MATERIEL ET METHODES		80
I.	MATERIELS	81
	A. Echantillons sanguins	81
	B. Anticorps monoclonal	81
	C. Solutions et milieu de suspension	82
	▪ Tampon phosphate isotonique	82
	▪ Solution de suspension pour la chambre de flux	82
	▪ Solution de suspension pour l'érythroagrégamètre	83
II.	METHODES	84
	A. Préparation des échantillons	84
	▪ Préparation des suspensions érythrocytaires pour la chambre de flux	84

▪ Préparation des suspensions érythrocytaires pour l'érythroagrégamètre	84
B. Dosage des IgG par ELISA	85
▪ Principe	85
▪ Méthode	86
▪ Protocole	86
C. Chambre de flux	88
▪ Instrumentation	88
▪ Calibrage du microscope optique	91
▪ Méthode	92
▪ Détermination de la contrainte de cisaillement σ_{50}	94
▪ Détermination de l'énergie de dissociation	96
D. L'érythroagrégamètre	97
▪ Instrumentation	98
▪ Méthode	100
▪ Détermination des paramètres de dissociation	100
 Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION	 106
 I. APPROCHE MICROSCOPIQUE. CHAMBRE DE FLUX	 109
▪ Détermination de la contrainte de cisaillement σ_{50}	109
▪ Détermination de l'énergie de dissociation	116
 II. APPROCHE GLOBALE. ERYTHROAGREGAMETRE	 118
▪ Evaluation de la précision de l'appareil	119
▪ Evaluation de la sensibilité de la méthode	120
▪ Détermination des paramètres dynamiques de la dissociation	122
▪ Détermination de l'énergie de dissociation	129
 III. DISCUSSION	 132
 Quatrième partie : CONCLUSION ET PERSPECTIVES	 139
 BIBLIOGRAPHIE	 146

LISTE DES ARTICLES ET COMMUNICATIONS

LISTE DES ARTICLES ET COMMUNICATIONS



Publications internationales

J.F. Stoltz, R.J. Rasia, J.R. Valverde and **L. Plá**.

Rheological characterization of the dissociation of erythrocytes induced by lectins (1998). *Russian Journal of Biomechanics*, 1-2 : 45-52.

R.J. Rasia, J.R. Valverde, L. Almada, M. D'Arrigo and **L. Plá**.

Photonics in Immuno-Hemo-Rheology (2000). Dans : Medical Diagnostic Techniques and Procedures. M. Sing, S. Radhakrishnan, K.M. Patil, M.R.S. Reddy, Eds. Narosa Publishing House, New Delhi, 232-241.

R.J. Rasia, J.R. Valverde, J.F. Stoltz, **L. Plá** and D. Sondag

Inmuno-hemo-reología. Análisis termodinámico de la aglutinación eritrocitaria inmunológica (2000). *Rev. Arg. Transf.* 26, 2 : 113-123.

Stoltz J.F., Rasia R.J., Valverde J.R., **Plá L.**, Sondag D., Rapaille A., and Muller S.

A rheo-optical method for the study of aggregated particules : application to the characterization of ABO blood group monoclonal antibodies (2000). *Rheol. Acta* (sous presse).

L. Plá, R.J. Rasia, J.R. Valverde, S. Muller and J.-F. Stoltz.

Evaluation of the energy of red blood cell agglutination by monoclonal antibodies (2000). *Biochemical and Biophysical Research Communications* (sous presse).

R.J. Rasia, J.R. Valverde, D. Sondag, A. Rapaille, **L. Plá** and J.F. Stoltz.

Functional characterization of monoclonal antibodies applying a rheo-optical method (soumis à *Journal of Immunological methods*).

L. Piá, R.J. Rasia, J.C. Humbert, J.R. Valverde, E. De Maistre and J.F. Stoltz.
Erythroaggregometer: a rheo-optical device to aid in the diagnosis of autoimmune hemolytic anemias (en préparation).

Communications à des congrès

L. Piá, M. D'Arrigo, P. Foresto, J.R. Valverde and R.J. Rasia.

Effect of sialic acid digestion by trypsin on the morphology of erythrocyte aggregates. 10th International Congress of Biorheology, 3th International Conference on Clinical Hemorheology, Pecs, Hungary, July 1999. *Biorheology* (1999) 36 : résumé p 168.

L. Piá, M. D'Arrigo, P. Foresto, L. Carreras, R. Etchepare Cuezco, J.R. Valverde and R.J. Rasia.

Abnormal morphology of erythrocyte aggregates in diabetes by processing digitized microscopic images. 10th International Congress of Biorheology, 3th International Conference on Clinical Hemorheology, Pecs, Hungary, July 1999. *Biorheology* (1999) 36 : résumé p 167.

L. Piá, R.J. Rasia, J.R. Valverde, S. Muller and J.-F. Stoltz.

Evaluation of the energy of red blood cell agglutination by monoclonal antibodies. 10th International Congress of Biorheology, 3th International Conference on Clinical Hemorheology, Pecs, Hungary, July 1999. *Biorheology* (1999) 36 : résumé p 179.

J.-F. Stoltz, R.J. Rasia, J.R. Valverde and **L. Piá**.

Rheological characterization of vegetal lectins by dissociation of induced erythrocyte agglutinates. 10th International Congress of Biorheology, 3th International Conference on Clinical Hemorheology, Pecs, Hungary, July 1999. *Biorheology* (1999) 36 : résumé p 179.

M. García Rosasco, **L. Piá**, R.J. Rasia, J.R. Valverde and J.-F. Stoltz.

Effects of vegetal lectins on erythrocyte membrane rheology. 10th International Congress of Biorheology, 3th International Conference on Clinical Hemorheology, Pecs, Hungary, July 1999. *Biorheology* (1999) 36 : résumé p 180.



L. Piá, R.J. Rasia, J.R. Valverde, S. Muller and J.-F. Stoltz.

Evaluación de la energía de aglutinación eritrocitaria mediada por anticuerpos monoclonales. 1^{er} Congreso Internacional de Microcirculación y Hemorreología, Buenos Aires, 1999. Résumé p 66-72.

Prix « Sociedad Argentina de Microcirculación y Hemorreología », Aire expérimentale.

Rasia, R.J., Valverde, J.R., Sondag, D., Rapaille, A., **Piá, L.** and Stoltz, J.-F.

Functional characterization of monoclonal antibodies by mechanical dissociation of erythrocyte agglutinates. 11th European Conference on Clinical Hemorheology, Rouen, septembre 2000. *Journal des Maladies Vasculaires* (2000) 25: résumé p 170.

Piá, L., Rasia, R.J., Valverde, J.R., Humbert, J.C., De Maistre, E. and Stoltz, J.-F.

Rheo-optical approach of auto-immune hemolytic anemias caused by cold agglutinins. 11th European Conference on Clinical Hemorheology, Rouen, septembre 2000. *Journal des Maladies Vasculaires* (2000) 25: résumé p 157.

TABLE DES ILLUSTRATIONS

LISTE DES FIGURES

	Pages
Figure 1 : Géométrie d'une hématie humaine normale.	29
Figure 2 : Représentation schématique de la membrane et du squelette érythrocytaire.	30
Figure 3 : Schéma de la production et caractérisation des amas érythrocytaires.	41
Figure 4 : Schéma simplifié du mécanisme d'agrégation érythrocytaire par pontage macromoléculaire.	43
Figure 5 : Modèle de la déplétion de l'agrégation érythrocytaire.	44
Figure 6 : Voie de biosynthèse des antigènes H, A et B.	52
Figure 7 : Représentation schématique d'une molécule d'anticorps IgG typique.	57
Figure 8 : Domaines des immunoglobulines	58
Figure 9 : Structure repliée d'une molécule d'anticorps IgG.	59
Figure 10 : Production d'anticorps monoclonal.	68
Figure 11 : Le globule rouge et son environnement ionique.	72
Figure 12 : Schémas descriptifs de la chambre de flux.	90
Figure 13 : Schéma général du dispositif expérimental de la chambre de flux.	91
Figure 14 : Schématisation du déplacement des érythrocytes d'un doublet sous la contrainte de cisaillement produit par le flux.	94
Figure 15 : Schéma des aires de superposition du doublet.	95
Figure 16 : Travail effectué par la contrainte de cisaillement pour produire un déplacement de $d=0$ à $d=d_{50}$.	97
Figure 17 : Représentation schématique du dispositif expérimental de l'Erythroagrégamètre.	98
Figure 18 : Schéma général du dispositif expérimental de l'érythroagrégamètre.	99
Figure 19 : Courbe de dissociation.	102
Figure 20 : Calcul de l'énergie relative E_d dépensée par la dissociation des agglutinats.	103

Figure 21 : Images acquises au microscope optique d'un doublet soumis à différentes contraintes de cisaillement.	111
Figure 22 : Courbes issues de calcul d'approximation non-linéaire de pourcentage de séparation des doublets de groupe A_1 en réponse à la contrainte de cisaillement.	112
Figure 23 : Courbes issues de calcul d'approximation non-linéaire de pourcentage de séparation des doublets de groupe A_2 en réponse à la contrainte de cisaillement.	112
Figure 24: Relation entre la densité des molécules d'anticorps à la surface érythrocytaire et σ_{50} pour des érythrocytes A_1 .	116
Figure 25 : Temps de dissociation final (T_d) pour les globules rouges O et B en présence de différentes dilutions de l'anticorps.	123
Figure 26 : Temps caractéristique de la dissociation (τ) pour les globules rouges O et B en présence de différentes dilutions de l'anticorps.	124
Figure 27 : Paramètre d'énergie de dissociation (E_D) pour les globules rouges O et B en présence de différentes dilutions de l'anticorps.	124
Figure 28 : Temps de dissociation final (T_d) en fonction de la dilution de l'anticorps.	126
Figure 29 : Temps caractéristique de la dissociation (τ) en fonction de la dilution de l'anticorps.	126
Figure 30 : Paramètre d'énergie de dissociation (E_D) en fonction de la dilution de l'anticorps.	127
Figure 31 : Images d'un doublet marqué par fluorescence obtenue par microscopie à sectionnement optique.	145

LISTE DES TABLEAUX

	Pages
Tableau I : Caractéristiques principales des glycophorines.	36
Tableau II : Les antigènes et les anticorps courants du système ABO.	50
Tableau III : Calibrage du microscope optique.	92
Tableau IV : Valeurs de σ_{50} pour les globules rouges A_1 et A_2 .	113
Tableau V : Densité en anticorps sur la membrane estimée pour les globules rouges A_1 .	115
Tableau VI : Valeurs de γ_D pour les globules rouges A_1 .	117
Tableau VII : Résultats statistiques des paramètres de dissociation.	119
Tableau VIII : Valeurs de la différence normalisée pour les paramètres de dissociation.	121
Tableau IX : Paramètres de régressions linéaires calculés à partir des graphiques.	128
Tableau X : Estimation de la densité en anticorps à la surface des globules rouges de groupe A_1 .	129
Tableau XI : Energie de dissociation estimée pour les érythrocytes A_1 à différentes dilutions de l'anticorps.	131

LISTE DES ABREVIATIONS

Ac	anticorps
Ag	antigène
C	domaine constant des immunoglobulines
CCD	<i>Charged Coupled Device</i>
CDR	régions déterminant la complémentarité
CV	coefficient de variation
Da	Dalton
DN	différence normalisée
DO	densité optique (450 nm)
Dx	dextran
EDTA	acide éthylènedinitrilotétraacétique, sel tripotassique
EFS	Etablissement Français du Sang
ELISA	<i>enzym linked immunosorbent assay</i>
ET	écart-type
Fab	<i>fragment antigen binding</i>
Fc	fragment cristallisable
FR	régions <i>framework</i>
F _V	fragments variable des immunoglobulines
GLS	glycosphingolipide
GP	glycophorine
GR	globule rouge
H	hématocrite
HAT	hypoxanthine - aminoptérine –thymidine
HSA	albumine humaine sérique
Ig	immunoglobuline
IgA	immunoglobuline A
IgD	immunoglobuline D
IgE	immunoglobuline E
IgG	immunoglobuline G
IgM	immunoglobuline M
Mab	anticorps monoclonal
Mo	moyenne
N	Newton
n	nombre d'expériences
Osm	Osmol
p/v	poids en volume
Pa	Pascal
PBS	tampon phosphate isotonique
PC	<i>personal computer</i>
PCh	phosphatidylcholine
PE	phosphatidyléthanolamine
PM	poids moléculaire
PS	phosphatidylsérine
r	coefficient de régression
SM	sphingomyéline
V	domaine variable des immunoglobulines
v/v	volume en volume

LISTE DES NOTATIONS

ϕ	aire spécifique
η	viscosité
ϕ_A	surface de contact
A	aire de superposition
A_C	surface de l'interface entre les cellules agrégées
B	concentration en anticorps
ψ	coefficient de réglage
σ	contrainte de cisaillement
D	densité
d	distance
E_A	énergie nette d'agrégation
E_B	énergie d'agglutination
E_D	paramètre d'énergie de dissociation
E_E	énergie répulsive électrostatique
E_M	énergie de tension membranaire
γ	énergie d'adhésion
E_S	travail de cisaillement mécanique
F_E	force de rupture
h	hauteur du microcanal
K	constante d'équilibre
l	largeur du microcanal
N	nombre d'Avogadro ($6,02 \times 10^{23}$ molécules/mol)
N_c	concentration de globules rouges en la suspension
Q	débit
r	coefficient de réflexion diffuse
R_c	rayon moyen de courbure
S	aire sous la courbe de dissociation
t	temps
τ	temps caractéristique de dissociation
w	travail
W_F	travail réalisé par les actions externes

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE



En 1975, Köhler et Milstein (Köhler et col, 1975) ont décrit la technique d'hybridation de cellules somatiques qui a permis d'établir des cultures continues de cellules productrices d'anticorps. Grâce à cette technique des immunoglobulines homogènes et spécifiques, appelées anticorps monoclonaux, sont obtenues en grande quantité et pour un temps indéfini. Cette technique a été rapidement appliquée pour produire des anticorps monoclonaux utilisés comme réactifs de laboratoire en raison de leur qualité, reproductibilité et spécificité (Rouger et col, 1997). Ces anticorps ont également des applications cliniques (Yelton et col, 1981 ; Shepard et col, 1991 ; Chapoval et col, 1995).

Parmi les différentes spécificités des anticorps monoclonaux, on y trouve celles des antigènes correspondant aux différents groupes sanguins. Ces anticorps produisent l'agglutination des globules rouges qui possèdent à leur surface membranaire des antigènes spécifiques.

Les mécanismes d'interaction conduisant à l'adhésion cellulaire présentent un intérêt fondamental pour les sciences biologiques et médicales. L'adhésion cellule-cellule est un phénomène physico-chimique essentiel pour la « vie sociale » de la cellule, qu'elle soit normale ou pathologique. Ce phénomène se produit dans un grand nombre d'événements biologiques tels que la fécondation, la morphogenèse, la prolifération, la métastase et la thrombogenèse. Même s'il s'agit d'une question scientifique à l'étude depuis de

nombreuses années, les travaux se sont révélés difficiles à cause du manque de modèles appropriés et des difficultés méthodologiques inhérentes aux techniques d'expérimentation. La plus grande difficulté se situe au niveau de l'obtention de résultats quantitatifs.

Dernièrement, des efforts considérables ont été réalisés dans le développement de méthodes expérimentales conduisant à des résultats quantitatifs de l'adhésion cellulaire (Sung et col, 1985 ; Tha et col, 1986; Snabre et col, 1987; Tozeren et col, 1989b; Evans et col, 1991; Tees et col, 1993).

Etant donné que de nombreux récepteurs d'adhésion ont été caractérisés et produits en forme soluble, on pouvait considérer à première vue que la détermination quantitative de la constante d'affinité et des paramètres cinétiques d'association entre molécules solubles amènerait à une complète compréhension des mécanismes d'adhésion de cellules qui portent ces molécules (Azimzadeh et col, 1990). Pourtant, des études expérimentales plus récentes font penser qu'il faut plus d'informations pour arriver à comprendre l'adhésion cellulaire. Ainsi, la régulation de l'activité de certains récepteurs (Detmers et col, 1987; Hato et col, 1998), la redistribution latérale sur la membrane (Yauch et col, 1997) ou l'association des protéines du cytosquelette aux protéines concernées par l'adhésion (Ward et col, 1994), ont été démontrées. La distance entre les membranes qui participent à l'adhésion est également un paramètre important, mais il est impossible de l'étudier sur les molécules solubles. Par conséquent, un système expérimental où les interactions cellulaires sont analysées directement sur les cellules concernées se révèle très approprié pour l'étude de l'adhésion intercellulaire.

De nombreux travaux ont développé des techniques et établi des modèles physico-mathématiques pour quantifier les forces d'interaction cellulaire à partir de l'analyse de la cinétique d'agrégation d'érythrocytes humains induite par des macromolécules.

La facilité de disposer des érythrocytes et leur relative stabilité, ainsi que la connaissance exhaustive sur leurs propriétés membranaires, a fait du globule rouge un système modèle pour l'étude des mécanismes fondamentaux des interactions cellulaires. L'agrégation normale des érythrocytes peut conduire à des anomalies rhéologiques et à des troubles dans le flux sanguin. De tels changements pathologiques sont importants du point de vue clinique dans certaines pathologies hématologiques et cardio-vasculaires (Le Devehat et col, 1989, 1991; Sarno et col, 1989; Költringer et col, 1991; Chabanel et col, 1992; Martinez et col, 1992).

L'agrégation des globules rouges est due à l'adsorption non-spécifique de macromolécules-ponts (fibrinogène ou dextran à haut poids moléculaire) sur la surface de la membrane. Par contre l'agglutination des globules rouges résulte de la liaison spécifique des antigènes de la membrane (oligosaccharides) au point d'union des macromolécules multivalentes (anticorps ou lectines). Une telle complémentarité moléculaire inclut des forces non-covalentes agissant spécifiquement à courte distance et conduit à une agglutination spécifique et relativement stable (Van Oss, 1997).

L'objectif de ce travail est d'étudier les interactions cellule-cellule, par la détermination de l'énergie de liaison intercellulaire en utilisant des techniques rhéo-optiques.

Les agglutinats de globules rouges de groupe sanguin A, induits par un anticorps monoclonal spécifique anti-A, sont utilisés comme modèle expérimental du mécanisme de reconnaissance spécifique ligand-recepteur, pour mesurer l'énergie échangée dans l'interaction cellulaire.

L'énergie de dissociation des agglutinats dans le système expérimental sera quantifiée de manière indirecte par l'étude de la dissociation des agglutinats sous l'effet d'une contrainte de cisaillement. Deux techniques différentes seront utilisées: un système de chambre de flux et un système de type Couette (érythroagrégamètre). Dans le premier cas, l'énergie d'adhésion sera mesurée par la détermination du travail requis pour séparer une certaine partie de la surface d'interaction d'un agglutinat de deux cellules (doublet) soumis à une contrainte de cisaillement. Une telle mesure sera effectuée à l'intérieur d'une chambre de flux parallèle par enregistrement des images microscopiques séquentielles avec une camera CCD. Dans ce système les déterminations sont réalisées directement sur le doublet, des mesures individuelles sur l'agglutinat sont ainsi obtenues (niveau microscopique). Dans le second cas, l'énergie de dissociation sera évaluée par la mesure du flux lumineux rétrodiffusé par des particules en suspension (hématies et agglutinats) soumises à une contrainte de cisaillement constante dans l'entrefer d'un viscosimètre transparent du type Couette. Les déterminations sont faites sur la suspension d'agglutinats orientés de façon variable. Elles donnent une mesure globale du phénomène de dissociation cellulaire.

Le présent mémoire est constitué de quatre parties dont le contenu est résumé ci-dessous.

Dans une première partie, nous présenterons les principales connaissances actuelles concernant le globule rouge, plus particulièrement la structure de la membrane érythrocytaire et ses fonctions. Nous décrirons ensuite les antigènes de groupes sanguins, principalement ceux du groupe ABO. Puis, après avoir décrit les caractéristiques des immunoglobulines et la production d'anticorps monoclonaux, nous exposerons le phénomène d'agglutination érythrocytaire. Finalement, nous examinerons les techniques d'investigation des interactions cellulaires décrites dans la littérature.

Dans une seconde partie, nous détaillerons les matériels utilisés dans les expériences (échantillons sanguins, anticorps monoclonaux et solutions). Nous aborderons ensuite les méthodologies mises en œuvre. Nous définirons tout particulièrement les deux techniques utilisées : d'une part pour mesurer l'énergie de dissociation d'un doublet, et d'autre part pour déterminer le paramètre d'énergie de dissociation sur une suspension d'agglutinats. Ces travaux ont été menés sur des échantillons de différents sous-groupes sanguins du groupe A.

La troisième partie concerne les résultats et leur signification.

Enfin, nous conclurons ce travail par une synthèse de nos résultats les plus significatifs et présenterons les principales perspectives envisageables.

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

I. LE SANG

Le sang est une suspension concentrée de cellules dans une solution aqueuse complexe. Les cellules de différentes formes, déformabilités et densités de charges électriques sont suspendues dans le plasma, milieu contenant des espèces moléculaires diverses (Ratnoff, 1987).

Le plasma est une solution aqueuse contenant des électrolytes, des molécules nutritives, des métabolites, des protéines, des vitamines, des hormones et des éléments à l'état de traces. Son pH de 7,4 est maintenu constant, principalement par le système tampon $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$. La viscosité plasmatique est un déterminant majeur de la viscosité sanguine et dépend directement de la concentration en protéines du plasma.

Les cellules sanguines sont divisées en trois familles majeures, les globules blancs (ou leucocytes), les plaquettes (ou thrombocytes) et les globules rouges (érythrocytes ou hématies). Elles circulent dans le réseau vasculaire de façon à assurer à chacun d'eux sa fonction essentielle. Ainsi, les globules rouges garantissent le transport gazeux entre les tissus et les poumons (l'oxygène vers les tissus et le dioxyde de carbone vers les poumons), les globules blancs jouent un rôle déterminant dans le système immunitaire, et les plaquettes participent au phénomène de l'hémostase et de la coagulation

mais interviennent également dans la réponse inflammatoire et dans la protection de l'endothélium vasculaire.

La centrifugation d'un petit volume de sang dans un microtube permet la lecture des volumes relatifs de plasma et de globules rouges, les autres cellules formant une mince couche négligeable à la surface des globules rouges (Corberand, 1998). Le volume des érythrocytes par rapport au volume sanguin total définit l'*hématocrite* (H) sanguin, exprimé en pourcentage (%) ou en litre par litre (l/l). Les valeurs normales chez l'homme adulte varient entre 36 et 50 % (Perkins, 1999).

A. LES ERYTHROCYTES

Le globule rouge est une cellule anuclée en forme de disque biconcave de diamètre moyen 7,65 μm et d'épaisseur moyenne 1,92 μm , dont la fonction est de transporter l'oxygène des alvéoles pulmonaires aux tissus et le gaz carbonique des tissus aux alvéoles pulmonaires (figure 1). Il renferme un fluide interne riche en hémoglobine, dont la viscosité dépend fortement de la concentration en hémoglobine (de l'ordre de 8 mPa.s pour une concentration de 330 g/l en hémoglobine intracellulaire) (Bull et col, 1995). L'analyse du contenu cellulaire révèle la présence de molécules d'hémoglobine (25 %), d'eau (70 %), de constituants minéraux et organiques à l'état ionisé (potassium, protéinates) (5 %).

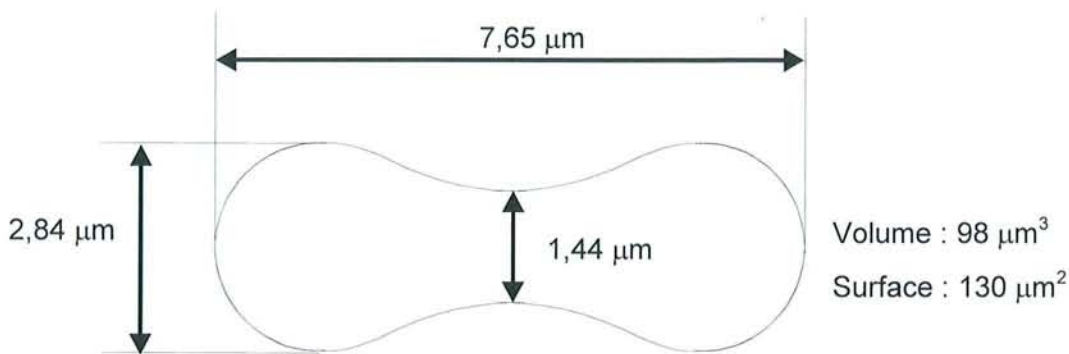


Figure 1: Géométrie d'une hématie humaine normale (d'après Fung et col, 1981).

La structure du globule rouge est simple. C'est une cellule dépourvue de noyau et d'organites intracellulaires ; sa membrane est une membrane biologique composée d'une double couche de phospholipides stabilisée par du cholestérol, dans laquelle s'intercalent des protéines ; elle possède de nombreuses propriétés, notamment antigéniques définissant les groupes sanguins érythrocytaires.

Le volume corpusculaire moyen de l'érythrocyte est de $98 \mu\text{m}^3$ pour une surface d'environ $130 \mu\text{m}^2$, dans les conditions normales de pression osmotique (300 mOsm/l) (Fung et col, 1981). Il possède donc un excès de surface d'environ 40 % par rapport à une sphère de même volume. Étant donné cet excès de surface, l'érythrocyte est une sphère dégonflée, en forme de disque biconcave. Cette forme particulière a pour but de procurer à l'érythrocyte ses propriétés mécaniques caractéristiques, c'est-à-dire sa résistance, qui s'oppose aux forces de cisaillement dans les grands vaisseaux, et sa déformabilité élastique, nécessaire au cheminement dans des capillaires.

LA MEMBRANE ERYTHROCYTAIRE

La membrane érythrocytaire est une membrane fluide. La composition biochimique de la membrane représente en poids 40-55 % de protéines, 35-45 % de lipides, et 10 % de carbohydrates (pour la plupart associés aux protéines). Le modèle de structure généralement admis est celui de Singer et Nicolson (Singer et col, 1972) : la membrane est constituée par une trame lipidique en double feuillet d'une épaisseur de 7 à 9 nm dans laquelle sont insérées des protéines globulaires de taille variable. Les lipides constituent une matrice fluide et dynamique dans laquelle les protéines globulaires flottent et se déplacent pratiquement sans dépense d'énergie (figure 2).

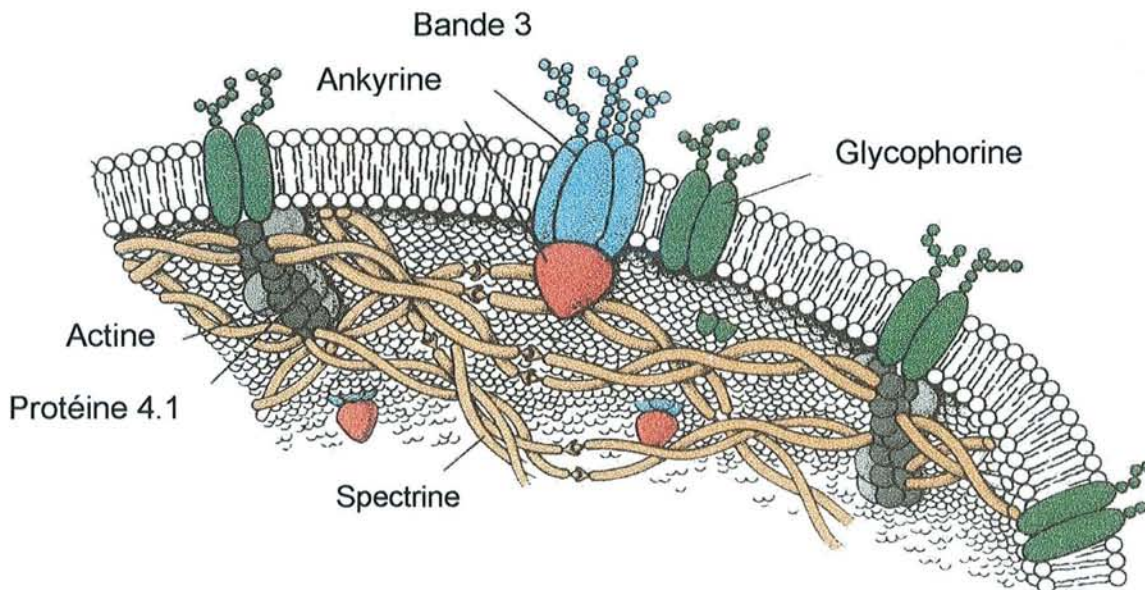


Figure 2 : Représentation schématique de la membrane et du squelette érythrocytaire (d'après Stryer, 1997).

La stabilité de l'édifice moléculaire est compatible avec les principes thermodynamiques puisque l'agencement des constituants dans la membrane permet l'établissement d'interactions intermoléculaires de type hydrophile et

hydrophobe. En effet, les groupements apolaires hydrophobes des lipides et des protéines fuient la phase aqueuse alors que les parties polaires hydrophiles de ces molécules sont en contact direct avec le milieu (Goudemand et col, 1980).

1. Les différentes parties de la membrane érythrocytaire

La membrane érythrocytaire comprend trois niveaux distincts (Delaunay, 1998) :

- a) la bicouche lipidique avec des protéines enchâssées dans celle-ci,
- b) le réseau de protéines tapissant la surface interne de la bicouche, le squelette membranaire ou squelette érythrocytaire,
- c) les glucides et les protéines externes qui se projettent à une certaine distance au-delà de la surface cellulaire (le glycocalyx).

La partie moyenne de la membrane érythrocytaire comprend donc la bicouche lipidique. La protéine bande 3 (échangeur d'anion) et les glycophorines sont les principales protéines transmembranaires. Elles sont aussi attachées au cytosquelette.

Le squelette érythrocytaire tapisse la surface interne de la bicouche. Il est plus développé que des structures homologues de nombreux autres types cellulaires. Ceci est dû au fait que la résistance et la déformabilité érythrocytaires reposent essentiellement sur ce squelette.

Les glucides forment un film à la surface externe de la membrane. Ce film est chargé de molécules d'eau retenues par des liaisons hydrogène. Les structures culminantes (hauteur : 10 nm) sont les chaînes de poly-N-

acétyllactosamine émanant de l'échangeur des anions et du transporteur de glucose. A un niveau intermédiaire (5 nm), on trouve des tétrasaccharides ainsi que des oligosaccharides plus grands et biantennés, respectivement liés aux glycophorines. Ces glycanes sont riches en acide sialique, représenté chez l'homme principalement par l'acide N-acétylneuraminique. Enfin, au niveau inférieur (1,8 nm), on rencontre les molécules de globoside, un glycolipide neutre majeur de la membrane.

a) Les lipides

Le cholestérol et les phospholipides représentent 95 % des lipides membranaire (Palek, 1995). Il existe quatre espèces principales de phospholipides définies sur la base de leur tête polaire : phosphatidylcholines (PCh), phosphatidyléthanolamines (PE), phosphatidylsérines (PS) et sphingomyélines (SM). Les glycosphingolipides (GLS) représentent 5 % du poids des lipides totaux. Ils portent des antigènes appartenant au groupe sanguin ABO, Ii et P. Une partie de GLS (à spécificité Lewis) provient du plasma et est secondairement adsorbée à la surface de la membrane érythrocytaire.

Les deux feuilletts de la bicouche ont une composition différente. PCh et SM prédominent dans la couche externe tandis que PE et PS, c'est-à-dire les aminophospholipides, sont prévalents dans la monocouche interne. L'asymétrie de la membrane lipidique, mise en évidence dans la membrane érythrocytaire, est en fait une caractéristique générale des membranes biologiques.

Les molécules phospholipidiques subissent une rapide diffusion latérale et une rotation libre des chaînes d'acides gras autour de leur axe longitudinal

mais une lente diffusion transversale (phénomène de flip-flop) (Kornberg et col, 1971). La lenteur du mécanisme aide à maintenir l'asymétrie des lipides. La diffusion latérale explique la fluidité de la membrane, qui dépend en particulier de la longueur et du degré de saturation des chaînes aliphatiques. Elle dépend également de la concentration en cholestérol, des interactions avec les protéines transmembranaires, de la température et de la pression (Shechter, 1997).

b) Les protéines

La membrane du globule rouge comporte un grand nombre de polypeptides. Certaines de ces protéines ont des fonctions biologiques importantes : elles contrôlent la morphologie de la cellule, les mécanismes de transfert et les activités enzymatiques.

Ces protéines sont divisées en deux groupes :

- **les protéines intrinsèques ou intégrées** qui pénètrent à l'intérieur de la couche lipidique et sont plus intégrées au complexe membranaire. Elles comprennent aussi les *protéines transmembranaires*.
- **les protéines extrinsèques** qui sont situées à la face interne de la double couche lipidique. Elles constituent le cytosquelette du globule (Lodish et col, 1997).

Les interactions entre les protéines de squelette membranaire et celles insérées dans la double couche lipidique ou même avec les lipides déterminent les propriétés mécaniques de stabilité et de déformabilité de la cellule.

▪ Le squelette membranaire

Le squelette membranaire est un réseau fibrillaire qui tapisse la face interne de la bicouche lipidique. Il est constitué essentiellement par trois protéines : la spectrine, l'actine et la protéine 4.1.

La **spectrine** est la plus abondante des protéines de la membrane (30 % des protéines totales). C'est un hétérodimère formé de deux chaînes polypeptidiques : chaîne alpha de 240 kDa et chaîne bêta de 220 kDa. Ces deux chaînes enroulées l'une sur l'autre sont hautement flexibles et mesurent environ 100 nm. Dans la membrane, deux hétérodimères sont joints par une de leurs extrémités dites « tête » pour constituer le tétramère de spectrine, forme physiologique de la protéine. La jonction entre les deux dimères est une propriété fondamentale de la spectrine qui commande la stabilité du réseau fibrillaire (cf. figure 2).

L'**actine** érythrocytaire (bande 5) est une variété de bêta actine dont la polymérisation est limitée. Elle est constituée de protofilaments courts de 33 nm environ, assemblés à partir d'environ 12 sous-unités monomères, stabilisés par la tropomyosine. L'actine et la spectrine constituent le réseau filamentueux protéique principal du squelette membranaire.

La **protéine 4.1** est une phosphoprotéine globulaire composée de deux sous-unités quasi identiques (4.1a et 4.1b) de 80 et 78 kDa, respectivement. Cette protéine stabilise l'association spectrine-actine et représente un premier point d'attache du squelette membranaire sur la face interne de la membrane par interaction avec la glycophorine C. Elle a un rôle dans la stabilité du squelette et à travers celle-ci dans la déformabilité membranaire.

Le squelette membranaire présente aussi des protéines accessoires telles que l'adducine, la dématine (protéine 4.9), la myosine, la tropomyosine et la tropomoduline. Elles participent à la régulation et la stabilité des trois principales protéines du squelette.

L'ankyrine (protéine 2.1), la protéine 4.2 et la protéine p55 sont impliquées dans la liaison du squelette membranaire aux composants transmembranaires.

▪ Les protéines intrinsèques

Ces protéines sont fortement ancrées dans la bicouche lipidique. Il s'agit principalement de la protéine bande 3 et des glycophorines. Elles peuvent avoir un rôle de transduction de signaux à travers la bicouche lipidique et constituer des canaux hydrophiles pour des mécanismes de transport (Salmon et col, 1991).

La **bande 3** ou échangeur d'anions est une protéine transmembranaire de 90 kDa qui représente 25 % environ de la masse totale des protéines érythrocytaires. Elle est constituée de trois domaines : le domaine cytoplasmique, le domaine transmembranaire et un petit domaine carboxy-terminal. Elle est une glycoprotéine (5 à 8 % de glucides) comportant une chaîne N-glycanique portant les spécificités antigéniques ABH et li. Elle a une fonction biologique très importante, car elle assure le transport électroneutre des anions (Cl^- , HCO_3^-) à travers la membrane (Cartron, 1998). La région N-terminale de la bande 3 représente un site de fixation de plusieurs protéines extrinsèques, telles que l'aldolase, l'hémoglobine, la bande 6, la bande 4.2, la

glycophorine A et l'ankyrine. 60 % des molécules de la bande 3 sont immobilisées par leur liaison au squelette.

Les **glycophorines** (GP) sont de petites protéines transmembranaires dont le segment externe est très riche en glucides, en particulier de l'acide sialique. Il y a quatre glycophorines : GPA à GPD (tableau I). Elles représentent 2 % du total des protéines, mais 60 % de la charge négative des érythrocytes (acide sialique déprotoné). De ce fait, elles jouent un rôle (principalement la GPA) dans la charge de surface et donc dans les forces de répulsion entre érythrocytes. Cette répulsion est indispensable à la survie des hématies car, en son absence, les érythrocytes s'empileraient (formation de rouleaux) et gêneraient le flux circulatoire. La GPA interagit avec une partie de la bande 3 et la GPC avec la protéine 4.1 (Delaunay, 1998).

Tableau I : Caractéristiques principales des glycophorines (d'après Delaunay, 1998).

	Nombre de copies par érythrocytes ($\times 10^3$)	PM apparent (kDa)	N° de chaînes glucidiques	Antigènes
GPA	500 à 900	31	15	M, N, S
GPB	80 à 300	20	11	
GPC	50 à 100	32	12	Gerbich
GPD	20	23	6	

D'autres protéines telles que la protéine 7.2b (stomatotine), la protéine CHIP28 (aquaporine), le transporteur de glucose et l'ATPase Ca^{2+} - dépendante sont aussi ancrées à la membrane.

Un certain nombre de protéines est lié à la membrane mais ne présente pas les séquences hydrophobes attendues des protéines qui traversent la

bicouche lipidique. Ces protéines peuvent généralement être libérées à partir de la membrane sous l'action d'une phospholipase C. Elles sont liées à la monocouche externe par des structures d'ancrage de type glycosylphosphatidylinositol. Ces protéines sont dites **ectoprotéines**. Parmi elles, on compte : la protéine DAF (*decay-accelerating factor*) qui porte les antigènes du système Cromer, l'inhibiteur membranaire de la lyse (MIRL/CD59) qui contrôle la formation du complexe d'attaque membranaire et la protéine liant le composant C8 ou facteur de restriction homologue (HRF), qu'inhibe également la formation de ce complexe.

2. Rôle et fonction de la membrane érythrocytaire

Les fonctions attribuées à la membrane du globule rouge peuvent être systématiquement divisées en deux catégories : mécaniques et support.

a) Les fonctions mécaniques

▪ La déformabilité

La fonction d'une cellule est étroitement liée à sa structure. Pour le globule rouge, sa fonction essentielle est d'apporter aux tissus de l'organisme, l'oxygène dont il s'est chargé lors de son transit pulmonaire. L'oxygénation des tissus est donc conditionnée par l'écoulement des hématies dans les capillaires, elles devront adapter leur forme à ces derniers et donc posséder une propriété fondamentale : la déformabilité.

Le degré de déformation d'une hématie dépend des forces extérieures qui agissent sur la cellule, ainsi que de ses propriétés rhéologiques intrinsèques (Stoltz, 1986a). Parmi les premières, on peut citer :

- la contrainte exercée par le fluide suspendant sur l'hématie. Elle est le résultat de deux facteurs : la viscosité plasmatique et la vitesse de cisaillement sur la membrane.
- L'hématocrite qui agit à deux niveaux, en favorisant l'alignement et en provoquant une déformation par entassement.

En ce qui concerne la déformabilité intrinsèque du globule rouge, celle-ci est sous la dépendance de sa structure chimique et du réseau de protéines qui se trouve à sa face interne. Mais parallèlement aux paramètres biochimiques, il est possible d'individualiser trois grands paramètres microrhéologiques : la viscosité interne, le rapport surface/volume (forme), et les propriétés viscoélastiques et moléculaires de la membrane. En fait, ces trois éléments sont profondément imbriqués les uns aux autres et selon des modalités fort complexes (Chien et col, 1978).

Viscosité interne

Elle dépend principalement de la concentration et de l'état physico-chimique de l'hémoglobine (Boivin, 1987). En fait, en dehors de la drépanocytose, de l'hémoglobinose C et des hémoglobines instables où la viscosité propre de la solution d'hémoglobine est modifiée, l'augmentation de la concentration de l'hémoglobine dépend du rapport surface/volume et de la fonction des systèmes de transferts transmembranaires de l'eau et des ions ;

ceux-ci sont eux-mêmes soumis aux qualités des composants membranaires et, au moins pour certains, au métabolisme énergétique du globule rouge.

Rapport surface/volume

L'accroissement de la surface à volume constant s'observe lors de l'accumulation du cholestérol, laquelle a des multiples conséquences biochimiques sur les fonctions et la structure membranaire. La diminution du volume à surface constante entraîne la rétraction de la membrane et la formation d'échinocytes. Elle traduit une déshydratation cellulaire qui s'accompagne d'une augmentation de la concentration en hémoglobine, donc de la viscosité interne. Inversement la présence d'une hémoglobine anormale comme l'HbS polymérisée entraîne une déshydratation cellulaire et des lésions membranaires.

L'augmentation du volume à surface constante entraîne un gonflement cellulaire et une sphérocytose préhémolytique. Elle est liée à une hyperhydratation cellulaire.

La diminution de la surface à volume constant est due à la perte de fragments de membrane qui peut être soit la traduction d'une « lésion » moléculaire primitive souvent congénitale de la membrane, soit la conséquence de l'action de complexe anticorps-complément d'origine extracorporelle, soit la conséquence du vieillissement de la cellule (Palek et col, 1983). Elle entraîne l'augmentation de la concentration en hémoglobine, donc de la viscosité interne.

Propriétés intrinsèques de la membrane

Elles dépendent de l'intégrité des constituants membranaires lipidiques et protéiques, de leurs interactions moléculaires intrinsèques et extrinsèques notamment avec les composants cytosoliques et de multiples mécanismes de régulation parmi lesquels la glycolyse anaérobie et le métabolisme énergétique, les processus de phosphorylation-déphosphorylation, la teneur en calcium, le cycle du phosphatidyl inositol, les phénomènes d'oxydation, les enzymes protéolytiques, etc (Boivin, 1984).

Une des conséquences des propriétés microrhéologiques de l'hématie est l'existence d'un perpétuel mouvement de rotation de la membrane autour de l'hémoglobine. Ce mouvement permet la transmission des contraintes sur la membrane, favorise les transferts, et participe de façon active lors de l'adhésion ou de l'agrégation des hématies.

▪ L'agrégation érythrocytaire

Le globule rouge possède une autre propriété essentielle, l'agrégabilité. C'est Anthony van Leeuwenhoek qui en 1702, décrit pour la première fois l'agrégation et la désagrégation des globules rouges du sang chez les têtards.

L'agrégation peut être définie comme l'adhésion intercellulaire de caractéristique réversible, tandis que l'agglutination est l'adhésion intercellulaire de caractéristique irréversible. Entre les deux, on peut établir une différence plus quantitative, en relation avec l'énergie dissipée pendant le processus d'adhésion, celle-ci est plus grande dans l'agglutination. Ces concepts sont schématisés dans la figure 3.

Dans le schéma, les « amas » sont définis comme un ensemble des hématies adhérees les unes aux autres, soient-ils agrégats ou agglutinats. Généralement les agrégats, structures normales dans des sujets sains, commencent leur formation à partir de rouleaux (empilement des disques biconcaves) qui, à travers des liaisons latérales, deviennent un réseau plus ou moins réticulé (Copley, 1986). L'agrégation des globules rouges peut donc apparaître physiologiquement. Selon Fahraeux (Fahraeux, 1929), la formation de rouleaux peut en fait faciliter le flux sanguin.

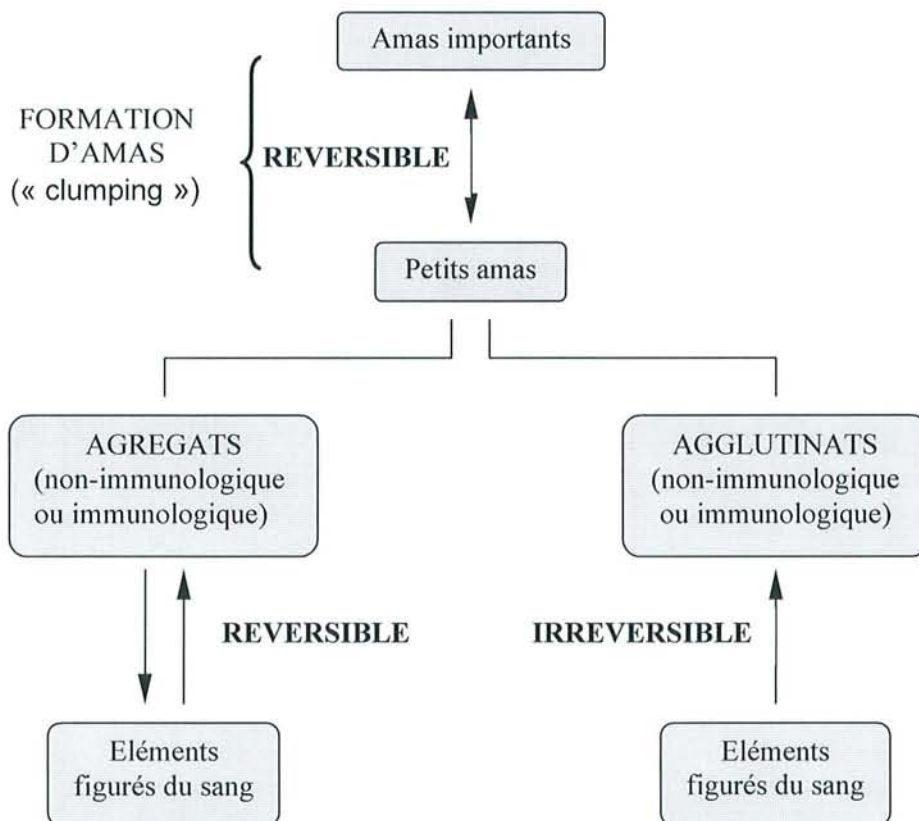


Figure 3 : Schéma de la production et caractérisation des amas érythrocytaires (d'après Copley, 1986).

Par contre, les agglutinats adoptent des formes sphéroïdales ou planes plus au moins arrondies et de différentes tailles selon la puissance de la

réaction d'agglutination, lesquelles se maintiennent séparées les unes des autres.

L'agrégation des hématies est un paramètre fondamental dans la compréhension des propriétés rhéologiques du sang. Elle est contrôlée par de nombreux paramètres (cisaillement local, propriétés physico-chimiques du milieu de suspension, hémocrite, propriétés intrinsèques des hématies). L'excès d'agrégation (ou l'augmentation du seuil de désagrégation) conduit à la formation d'agrégats pathologiques. D'un point de vue théorique, l'agrégation peut être approchée comme un équilibre énergétique entre des forces d'agrégation et des forces de répulsion (Mills et col, 1986).

Forces d'interactions entre globules rouges

- *Forces attractives de Van der Waals* (ou forces électrodynamiques apolaires) : ce sont des interactions à courte portée (quelques nm) qui résultent des moments dipolaires des molécules.
- *Forces électrostatiques répulsives* : le globule rouge porte une densité de charge superficielle négative en raison de la présence d'acides sialiques dans le revêtement glycoprotéique extracellulaire. Il existe alors une atmosphère diffuse de contre-ions au voisinage de la surface. L'ensemble forme une double couche électrique diffuse qui possède un certain potentiel électrostatique (Donner et col, 1986).
- *Forces stériques répulsives* : en absence de macromolécules en solution, la force répulsive est due à une couche dense de chaînes insérées à la surface du globule, sur le glycocalyx. L'arrangement spatial est donc un

paramètre important : deux globules proches se repoussent si l'encombrement stérique des molécules présentes, essentiellement la glycophorine, ne permet pas un recouvrement des chaînes (Snabre et col, 1986).

- *Force stérique attractive* : en présence de macromolécules en solution, une force supplémentaire est à prendre en considération : la force de pontage ou de déplétion moléculaire.

Le modèle du pontage macromoléculaire suppose que les macromolécules en solution s'adsorbent sur la surface des globules rouges en permettant la formation de ponts entre membranes adjacentes (figure 4) (Chien et col, 1970).

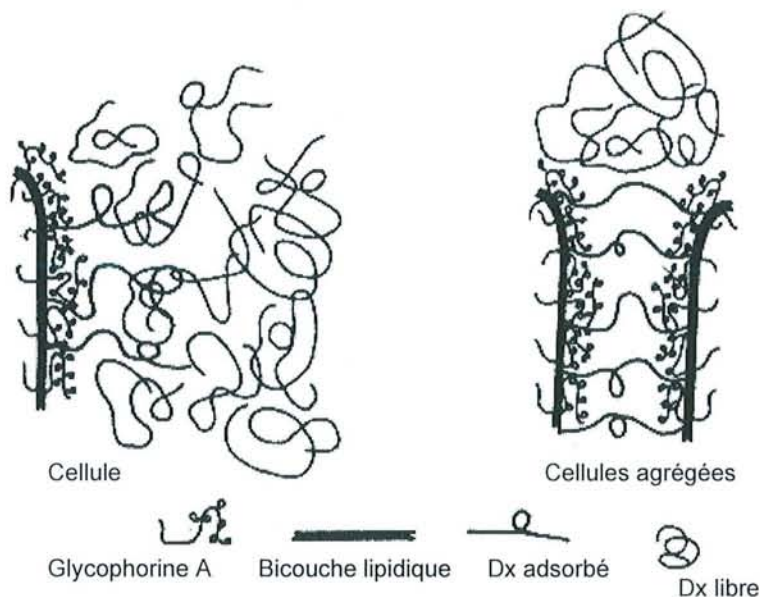


Figure 4 : Schéma simplifié du mécanisme d'agrégation érythrocytaire par pontage macromoléculaire (d'après Bäumlér et col, 1989).

La présence d'une couche déplétée en macromolécule au voisinage de la surface est prédite par le calcul du profil de concentration en polymère. Ceci correspond à une augmentation de l'énergie libre de surface à

l'interface glycocalyx-solution. Par conséquent, l'attraction des particules minimise l'énergie libre totale de surface en diminuant la surface possible d'interaction avec les polymères (Bäumler et col, 1989). La zone interparticulaire est vide de macromolécules (figure 5).

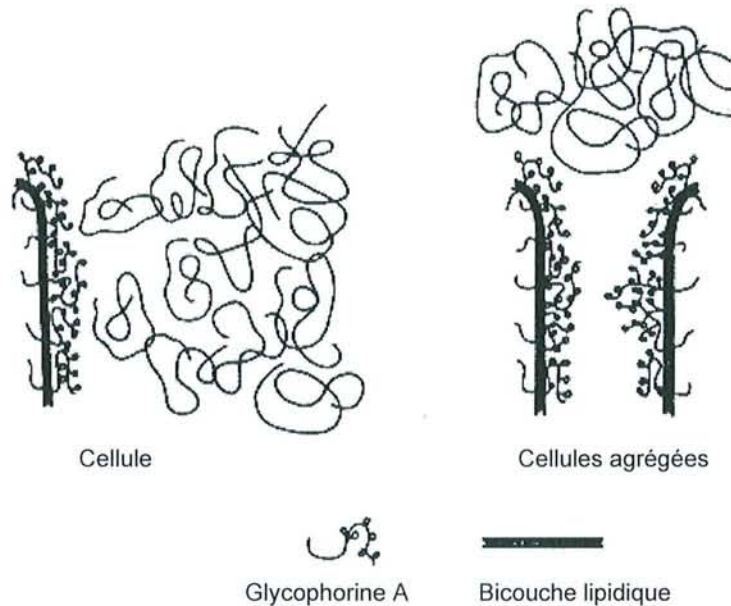


Figure 5 : Modèle de la déplétion de l'agrégation érythrocytaire. Les macromolécules ne sont pas adsorbées sur la membrane du globule rouge. L'approche de deux cellules conduit à un recouvrement des zones de déplétion et à l'attraction des cellules (d'après Bäumler et col, 1989).

La force d'attraction dépend du gradient de concentration en polymère et de la distance de séparation des globules.

L'énergie d'interaction totale est la somme de toutes les contributions, plus une force de courbure de la membrane, car la membrane résiste au changement de courbure (Skalak et col, 1990). L'état d'équilibre du système est celui d'énergie minimale. L'énergie d'interaction est faible, et les forces correspondantes sont de l'ordre du pN.

Paramètres macroscopiques influençant les forces d'interaction

▪ *Milieu plasmatique*

Protéines plasmatiques. Le fibrinogène, les immunoglobulines et l'albumine (Donner et col, 1988a) jouent un rôle essentiel dans l'agrégation des globules rouges, mais le rôle précis et le mécanisme d'action (adsorption ou déplétion) sont encore mal connus.

Environnement physico-chimique. Les différents paramètres agissant sur la composition ionique du milieu et son osmolarité ont des effets sur l'intensité des forces répulsives, le volume et la forme du globule rouge (Meiselman et col, 1967 ; Maeda et col, 1985 ; Snabre et col, 1986 ; Chen et col, 1995). Ils vont donc modifier l'agrégation.

▪ *Facteurs liés au globule rouge*

Facteurs intrinsèques. La surface de contact entre globules, ainsi que les modules élastiques de courbure et de cisaillement, conditionnent la forme adoptée par le globule rouge dans le rouleau. La flexibilité de la membrane est essentielle puisqu'elle doit pouvoir adopter différents rayons de courbure dans un rouleau (Skalak, 1984).

Le rôle des facteurs cellulaires surfaciques apparaît de plus en plus essentiel dans les phénomènes d'adhésion en général et en particulier dans l'agrégation érythrocytaire.

Concentration cellulaire. L'hématocrite joue un rôle important sur l'agrégation érythrocytaire (Deng et col, 1994). La nature des interactions présentes dans la suspension évolue avec la concentration cellulaire. Les interactions protéines-globule rouge sont le facteur principal jusqu'à un hématocrite de 45 % environ, valeur à partir de laquelle les interactions

érythrocyte-érythrocyte deviennent progressivement plus importantes, puis prépondérantes pour les hémocrites supérieurs à 80 %.

▪ *Taux de cisaillement*

Quand la suspension est soumise à une contrainte de flux telle que le cisaillement, il faut tenir compte d'un terme supplémentaire dans le bilan des forces physiques : les forces hydrodynamiques. Il existe un équilibre dynamique entre la taille des agrégats et la contrainte appliquée, cette taille diminuant quand le cisaillement augmente (Skalak et col, 1983).

Il est à noter que la vitesse de formation des agrégats, à bas cisaillement, croît avec le cisaillement car l'élévation de la fréquence de collision accélère le processus d'agrégation. Il existe un taux de cisaillement critique à partir duquel les forces hydrodynamiques visqueuses dominent les forces attractives de collision et entraînent une diminution de la vitesse de formation des rouleaux en fonction du cisaillement.

L'énergie d'agglutination des globules rouges provient de la formation de ponts macromoléculaires à la surface des érythrocytes (E_B). En ce qui concerne les globules rouges au repos, la plupart de l'énergie de désagrégation résulte de la répulsion électrostatique entre les surfaces cellulaires adjacentes lorsqu'elles se trouvent très rapprochées. Cette énergie répulsive électrostatique (E_E) provient de charges électriques négatives, principalement dues à la présence d'acide sialique à la surface de l'hématie. En présence de contraintes mécaniques (σ), le travail effectué par le cisaillement mécanique (E_S) a tendance à désagréger les cellules. Pour ces raisons, l'énergie nette

d'agrégation (E_A) à l'interface entre les cellules adjacentes dépend de l'équilibre entre E_B contre E_E et E_S (Chien et col, 1986).

Ces énergies sont mesurées, en principe, sous la forme du travail demandé par unité de surface, à partir d'un équilibre qui sépare les surfaces cellulaires. Pour ces raisons, il paraît convenable de considérer l'équilibre énergétique en termes d'énergies par unité de surface cellulaire. L'énergie d'agrégation nette par unité de surface d'interaction cellulaire (en ergs/cm²) peut être exprimée comme :

$$\gamma = \frac{(E_B - E_E - E_S)}{A_C} \quad [1.1]$$

où A_C représente la surface de l'interface entre les cellules agrégées.

Dans des conditions de repos, $E_S = 0$ puisque $\sigma = 0$ et, l'énergie nette d'agrégation par unité de surface est :

$$\gamma_{\sigma=0} = \frac{(E_B - E_E)}{A_C} \quad [1.2]$$

A l'état d'équilibre, la majorité de l'énergie d'agrégation nette est stockée dans la membrane du globule rouge comme changement dans l'énergie de tension membranaire (E_M), qui à son tour provoque une modification de la forme des globules rouges dans les rouleaux (Skalak et col, 1990).

Dans des conditions non statiques, dans lesquelles on applique une contrainte de cisaillement, par flux ou par déplacement, on peut exprimer

l'équation thermodynamique [1.1] en d'autres termes : l'énergie est remplacée par le travail de dissociation, réalisé par des actions externes

$$W_F - \gamma \cdot A_C = 0 \quad [1.3]$$

où W_F est le travail réalisé par les actions externes.

b) La fonction support : les antigènes de membrane

Les globules rouges sont antigéniques ; ils possèdent au niveau de leur membrane une série de déterminants antigéniques parfaitement bien connus actuellement sur le plan immunologique et biochimique, qui sont responsables des groupes sanguins érythrocytaires. Les études en microscopie de fluorescence, par autoradiographie ont montré l'ordonnement régulier en mosaïque de nombreux déterminants antigéniques. Les déterminants antigéniques sont portés par les glycoprotéines, les composants glucidiques étant tournés vers l'extérieur de la membrane. La membrane sert également de support à des réactions enzymatiques.

B. LES GROUPES SANGUINS

Les groupes sanguins érythrocytaires se répartissent en systèmes, dont chacun constitue un ensemble d'antigènes allotypiques de la membrane du globule rouge, génétiquement induits par une unité génétique monofactorielle,

et génétiquement indépendants les uns des autres (Goudemand et col, 1980). Ils sont divisés en systèmes comme ABO, Rh, Kell, Duffy...(Cartron, 1993).

LE SYSTEME ABO

1. Immunologie et biochimie des antigènes ABH

Le système majeur d'alloantigènes érythrocytaires ABO a été découvert par Landsteiner (1901). Par convention, les phénotypes du système ABO sont définis par le ou les antigènes présents sur les hématies (Salmon et col, 1991). Ces antigènes sont révélés par l'agglutination des hématies qui les portent par les anticorps correspondants. Deux antigènes peuvent ainsi être reconnus : A et B, ce qui va définir quatre variétés de groupe :

Groupe A : si l'antigène A est présent sur les hématies du sujet.

Groupe B : si l'antigène B est seul présent sur les hématies du sujet.

Groupe AB : si les antigènes A et B à la fois sont présents sur les hématies.

Groupe O : si aucun des antigènes A ou B n'est présent sur les hématies. Les sujets de groupe O n'ayant aucun antigène dans le système ABO possèdent par contre une grande quantité de l'antigène H qui représente le substrat antérieur non converti.

Il existe de façon constante dans le sérum des anticorps (dits naturels) correspondant à l'antigène absent du globule rouge. Ainsi des anticorps anti-A

et anti-B pourront être mis en évidence dans le sérum selon les modalités suivantes :

Groupe A : présence dans le sérum d'anticorps anti-B.

Groupe B : présence dans le sérum d'anticorps anti-A.

Groupe AB : absence d'anticorps.

Groupe O : présence dans le sérum à la fois d'anticorps anti-A et anti-B.

Les phénotypes sont donc définis à la fois par l'antigène globulaire et l'anticorps sérique, ce que résume le tableau II.

Tableau II : Les antigènes et les anticorps courants du système ABO (d'après Goudemand et col, 1980).

Antigènes (globulaires)	Anticorps (sériques)	Groupe	Fréquence (%) (France)
A	anti-B	A	45
B	anti-A	B	9
H	anti-A et anti-B	O	43
A et B	absence	AB	3

Les déterminants antigéniques A, B et H sont des oligosaccharides formés par l'addition séquentielle d'unités glucidiques catalysée par des enzymes appelées glycosyltransférases (Lowe, 1998). Les motifs antigéniques ABO représentent les structures terminales de déterminants oligosaccharidiques complexes exprimés par des glycosphingolipides solubles, des oligosaccharides libres et des structures associées aux membranes. Ces dernières comprennent des protéines intégrales de la membrane et des

glycolipides. La protéine bande 3 (transporteur des anions) porte environ $1-2 \times 10^6$ déterminants ABH par globule rouge (environ 80 % du total). Le transporteur du glucose érythrocytaire (bande 4.5) exprime un nombre plus faible de déterminants ABH par érythrocyte (environ 5×10^5 molécules). Un plus petit nombre de déterminants ABH est porté par d'autres glycoprotéines associées à la membrane érythrocytaire comme l'aquaporine et la molécule Rh50, dont des molécules apparentées à Rh. Les glycolipides de la membrane érythrocytaire, qui contiennent des poly-N-acétyllactosaminoglycanes (glycosylcéramides), portent le reste des déterminants ABH (environ 5×10^5 déterminants par globule rouge). Ces structures sont exposées à la surface des globules rouges et des cellules d'autres tissus. La synthèse des molécules A, B et H s'effectue sous le contrôle de plusieurs loci distincts. Ces loci codent des glycosyltransférases qui interviennent dans la cascade de catalyse responsable de la synthèse de ces déterminants oligosaccharidiques (figure 6).

Les oligosaccharides précurseurs sont utilisés comme substrats pour les réactions de transglycosylation catalysées par les α (1,2) fucosyltransférases. Cette réaction crée le déterminant de groupe sanguin H représenté par un motif Fuc- α (1,2) Gal β .

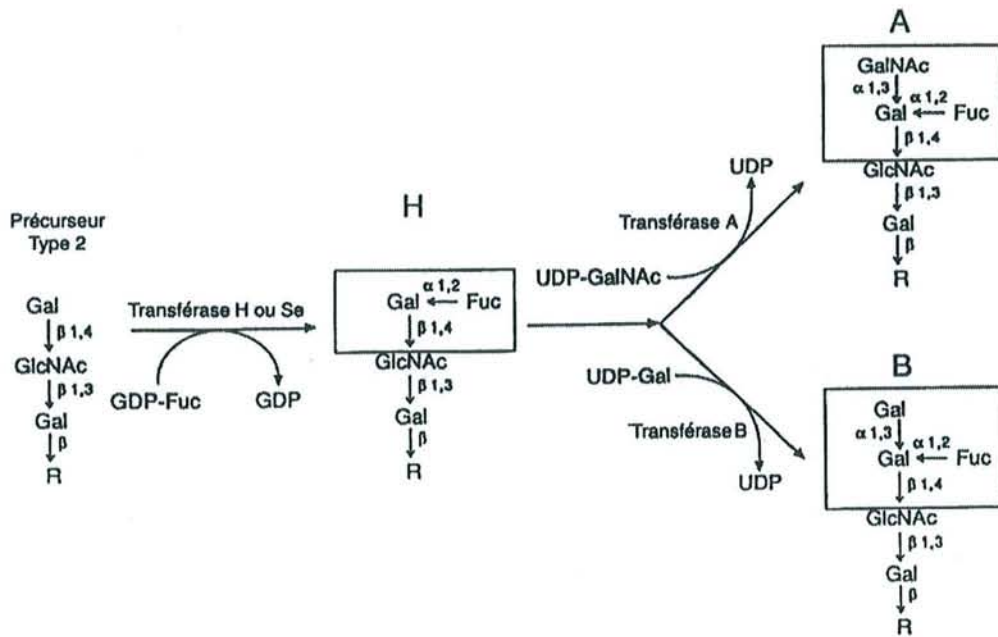


Figure 6: Voie de biosynthèse des antigènes H, A et B (d'après Lowe, 1998).

Les déterminants H produits de cette manière deviennent des substrats précurseurs essentiels pour l'action des glycosyltransférases co-dominantes codées par le locus *ABO* (sur la partie terminale du bras long du chromosome 9). Par exemple, l' $\alpha(1,3)$ N-acétylgalactosaminyltransférase codée par l'allèle *A* catalyse la synthèse de l'antigène A à partir des déterminants H. De même, une $\alpha(1,3)$ galactosyltransférase, codée par l'allèle *B* catalyse la synthèse de l'antigène B à partir des même précurseurs oligosaccharidiques de groupe H. L'allèle *O* ne produit pas de polypeptide catalytiquement actif. Il est donc incapable de modifier les molécules d'oligosaccharides H. De ce fait, la complémentarité des allèles exprimés au locus *ABO* chez un individu va déterminer si celui-ci présente exclusivement des déterminants du groupe A (génotypes *AA* ou *AO*) ou seulement des déterminants du groupe B (génotypes *BB* ou *BO*), ou à la fois des déterminants A et des déterminants B (génotype *AB*), ou encore aucun des déterminants A ou B (génotype *OO*).

2. Sous-groupes des antigènes A

Les variants alléliques naturels au locus *ABO* ont été décrits par des techniques sérologiques lors des tests de groupage sanguin ABH. Les sous-groupes ABO peuvent être classés selon la façon dont ils réagissent avec différents antisérums et lectines reconnaissant les déterminants A et B. Par exemple, la lectine de la plante *Dolichos biflorus*, utilisée à une concentration adéquate, entraîne l'agglutination des érythrocytes de sujets du groupe A mais pas de tous. Les érythrocytes agglutinables ont été appelés A_1 (environ 80 % des individus de groupe A) tandis que ceux qui ne le sont pas ont été appelés A_2 (environ 20 % des individus de groupe A).

Les globules rouges A_1 ont une moyenne de 10^6 déterminants antigéniques A, alors que les globules rouges A_2 en ont seulement environ 10^5 (Oriol, 1998). On les différencie également par le type de molécules A exprimées : les épitopes A des globules rouges A_1 sont fabriqués sur les structures de types 1, 2, 3 et 4 alors que les épitopes A des érythrocytes A_2 expriment seulement les types 1 et 2. Ces faits peuvent être reliés aux différences d'efficacité des glycosyltransférases A trouvées chez les sujets A_1 et A_2 . Donc, la distinction entre les érythrocytes A_1 et A_2 correspond principalement à une différence dans le nombre et la distribution des récepteurs A à la surface de la membrane du globule rouge, mais également à une différence qualitative de structure.

3. Groupes A faibles :

On définit comme phénotypes A faibles les phénotypes des sujets dont les hématies ont une réactivité antigénique inférieure à celle des hématies A_2 normales. Ils sont très rares, de l'ordre de un individu sur 50 000 à 100 000 (Cartron et col, 1977).

A₃ Ils présentent une agglutination sous forme d'une fausse double population (60 % d'agglutinats). Le nombre de sites antigéniques est très variable d'un globule rouge à l'autre, de 50 000 sites en moyenne, mais pouvant aller jusqu'à 100 000 sites. C'est le moins rare des phénotypes A faibles : fréquence de l'ordre de 0,06 % des phénotypes A.

A_x L'agglutination est franchement une agglutination faible, plutôt que partielle (30 % d'agglutinats). On ne trouve plus que 5 000 sites par globule rouge. On observe aussi, une distribution hétérogène à l'intérieur d'un même échantillon, mais à un degré moindre que chez les A_3 ou les A_{end} .

A_{end} L'agglutination est étrange. Dix pour cent seulement des globules rouges sont agglutinés, si bien que l'on croit être en présence d'un mélange de globules rouges A et de globules rouges non-A. Les globules rouges qui agglutinent ont 100 000 sites antigéniques, comme les A_2 .

A_m Les individus A_m expriment un antigène A normal dans la salive, mais n'ont qu'à peine 1 000 sites sur leur globule rouge, comme si leur groupe ABO était encore un groupe strictement tissulaire, comme chez les singes. La présence de l'antigène n'est démontrée que par fixation-élution fortement positive.

A_{el} Ces sont les plus faibles des A faibles, où la présence d'antigène A sur le globule rouge n'est discernable que par fixation et élution de l'anticorps anti-A. Il n'y a que 700 sites sur le globule rouge (Salmon, 1997).

II. LES IMMUNOGLOBULINES

Les immunoglobulines ou anticorps, sont des glycoprotéines présentes dans les liquides biologiques de tous les mammifères. Certaines sont exprimées à la surface des cellules B où elles jouent le rôle de récepteurs spécifiques d'antigène. D'autres, les anticorps, sont sous forme soluble dans le sang ou la lymphe. Ils sont formés spécifiquement par un organisme en réponse à l'introduction d'un antigène donné. Les plasmocytes (ou cellules sécrétrices d'anticorps) sont les responsables de la sécrétion de grandes quantités d'anticorps dans le sang et les tissus (Roitt et col, 1997).

On distingue, chez la plupart des mammifères, cinq classes d'immunoglobulines : IgG, IgM, IgA, IgD et IgE. Elles diffèrent par leur poids moléculaire (PM), leur charge, leur composition en acides aminés et en sucres.

Chaque immunoglobuline présente une **dualité fonctionnelle** ; une région de la molécule intervient dans la liaison de l'antigène (région Fab – *fragment antigen binding*), tandis qu'une autre est impliquée dans les fonctions effectrices (région Fc – *fragment cristallisable*). Celles-ci comprennent la fixation sur les tissus de l'hôte (notamment à des cellules du système

immunitaire comme les cellules phagocytaires), ainsi que la liaison avec le composant C1q de la voie classique d'activation du complément.

A. STRUCTURE DES IgG

La structure de base commune à toutes les immunoglobulines consiste en une association de deux chaînes polypeptidiques légères identiques (PM 25 kDa) à deux chaînes polypeptidiques lourdes identiques (PM 50 à 77 kDa), reliées par des liaisons covalentes (ponts disulfures) et des liaisons non-covalentes. Les chaînes légères sont communes à toutes les classes, tandis que les chaînes lourdes varient selon la classe et la sous-classe (figure 7).

Toutes les immunoglobulines sont glycosylées. Leur composition en sucres varie de 2 à 3 % pour les IgG jusqu'à 12 à 14 % pour les IgM, les IgD et les IgE.

Les **chaînes légères** sont composées de 214 acides aminés. Elles comportent une partie de composition constante (C_L) (environ 107 acides aminés de la moitié carboxy-terminale) dont il existe néanmoins deux variantes : celle caractérisant les chaînes kappa (κ) (les plus fréquentes) et celle correspondant aux chaînes lambda (λ), et une partie de composition variable (V_L) (107 aminoacides de la moitié amino-terminale). Néanmoins, à l'intérieur de cette variabilité, il existe des zones constantes présentant peu de variations, permettant de définir des sous-groupes au sein d'un même type de chaîne.

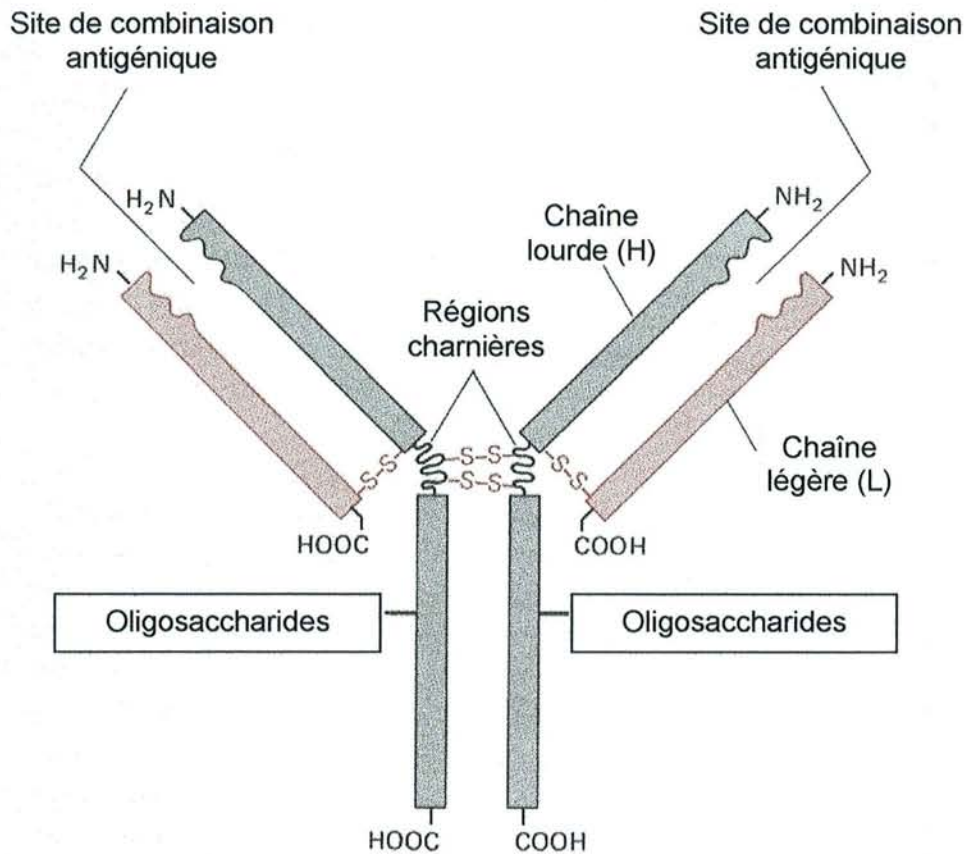


Figure 7 : Représentation schématique d'une molécule d'anticorps IgG typique. Elle est composée de deux chaînes légères identiques et deux chaînes lourdes identiques (d'après Alberts et col, 1995).

Ces chaînes légères sont repliées sur elles-mêmes, formant deux boucles d'environ 65 résidus fermés par des ponts disulfures intracaténaires : un dans la région variable, un dans la région constante. Il existe un autre pont disulfure dans la région constante qui lie à une chaîne lourde.

La **chaîne lourde** γ est constituée d'une séquence de 440 aminoacides (deux fois plus longue que la chaîne légère). Elle possède 4 ponts disulfures intracaténaires, chacun permettant la formation d'une boucle de 60 à 70 résidus. Chaque boucle peptidique représente la partie centrale d'un domaine d'environ 110 acides aminés (figure 8).

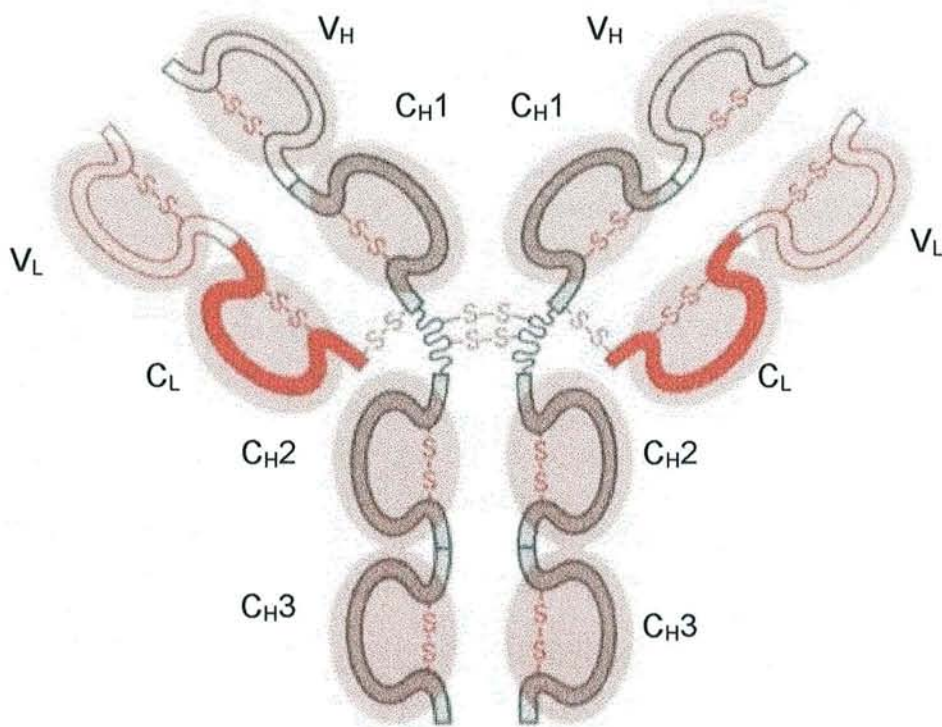


Figure 8 : Domaines des immunoglobulines (d'après Alberts et col, 1995).

Elles sont formées, elles aussi, d'une partie constante et d'une partie variable. La partie constante comprend trois domaines C-terminal (C_{H1} , C_{H2} et C_{H3}). Elle comporte néanmoins des variations correspondant à 4 types de chaînes γ : γ_1 , γ_2 , γ_3 , γ_4 , qui déterminent les différentes sous-classes d'IgG. La portion variable comprend le domaine N-terminal (V_H). Les domaines C_{H1} et C_{H2} sont séparés par une séquence d'une quinzaine (sous-classes IgG₁, IgG₂ et IgG₄) ou d'une soixantaine (IgG₃) d'acides aminés, en grande partie des cystéines et des prolines, constituant la « région charnière ». Cette région charnière est une zone de flexibilité, elle assure les liaisons covalentes par des ponts disulfures entre les deux chaînes lourdes, et entre les chaînes lourdes et légères pour les IgG₁.

La **structure quaternaire** fonctionnelle des IgG est constituée par l'association de deux chaînes lourdes gamma et de deux chaînes légères soit κ , soit λ , identiques deux à deux. Bien que des ponts disulfures stabilisent cette structure, ce sont essentiellement des interactions domaine-domaine de type « trans » (d'une chaîne à une autre) qui assurent la cohésion de la molécule : les domaines C_{H3} assurent l'essentiel de l'association entre chaînes lourdes, alors que les domaines C_{H2} , N-glycosylés, interagissent très peu ; chaque domaine C_{H1} s'associe avec un domaine C_L et chaque V_H avec un V_L . La masse moléculaire est environ 154 kDa pour les IgG₁, IgG₂ et IgG₄ et environ 160 kDa pour les IgG₃.

La **structure tridimensionnelle** d'IgG entières cristallisées a pu être analysée par diffraction de rayons X. Le modèle moléculaire révèle une structure en Y d'une longueur de 1000 à 1500 nm, qui a pu être observée en microscopie électronique (figure 9).

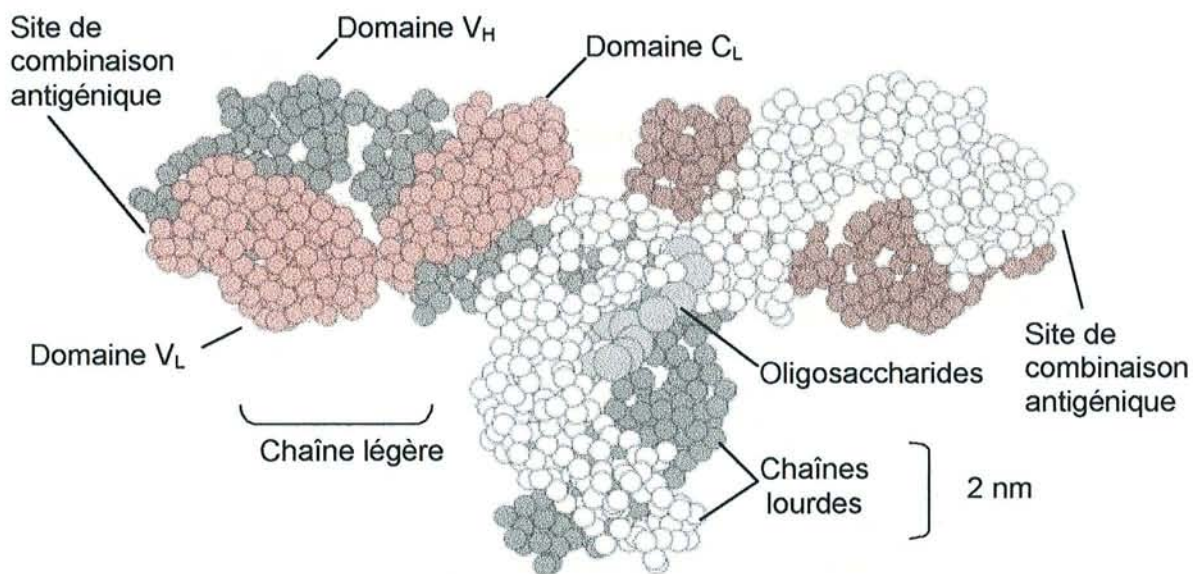


Figure 9 : Structure repliée d'une molécule d'anticorps IgG d'après des études de cristallographie aux rayons X (d'après Alberts et col, 1995).

Régions constantes et fonctions effectrices

Les régions constantes, plus particulièrement les parties Fc, sont impliquées dans les fonctions des anticorps qui interviennent consécutivement à la liaison aux antigènes. Les propriétés effectrices des anticorps sont liées à la nature du fragment Fc, et donc à leurs classes et sous-classes.

B. DIFFERENTES CLASSES D'IMMUNOGLOBULINES

La diversité isotypique des chaînes lourdes correspondant aux neuf classes et sous-classes exprimées chez l'homme est un acquis de l'évolution : elle a pour conséquence une meilleure adaptation de la réponse humorale aux différents types d'antigènes et aux circonstances d'exposition aux antigènes (Frazer et col, 1999).

IgG Elles représentent les immunoglobulines les plus abondantes dans le sérum (12 g/l environ soit 75 % des immunoglobulines). Elles ont un PM de 160 kDa et une constante de sédimentation de 7S. Ce sont des glycoprotéines relativement pauvres en glucides. Elles comportent quatre sous-classes liées à des différences dans la partie constante de la chaîne lourde γ . Il existe au niveau de leur portion Fab deux sites anticorps. Elles fixent le complément (sauf IgG₄) et peuvent franchir la barrière placentaire (à l'exception des IgG₂).

IgM Moins abondantes dans le sérum (1,2 g/l), les IgM sont également de constitution glycoprotéinique. Il s'agit de macroglobulines de PM 900 kDa ayant une constante de sédimentation de 19S. Elles sont constituées de l'association de 5 monomères reproduisant chacun la structure des IgG.

Ces monomères sont constitués en effet de deux chaînes légères identiques (soit chaînes κ , soit chaînes λ identiques à celles des IgG) et deux chaînes lourdes μ de PM 70 kDa, également identiques. Ces chaînes comportent, comme l'IgG, une partie variable N-terminale et une partie constante C-terminale. Il existe deux types de chaînes lourdes μ : μ_1 et μ_2 , caractérisant deux sous-classes d'IgM : IgM₁ et IgM₂. Les cinq monomères ainsi définis sont unis par des ponts disulfures au niveau de leur partie Fc, constituant une structure étoilée à cinq branches avec à l'extérieur les 10 parties Fab et à l'intérieur les cinq parties Fc. Il existe donc en principe 10 sites anticorps par molécule.

Les IgM peuvent fixer le complément, mais elles ne passent pas la barrière placentaire. Elles apparaissent très tôt en cours d'immunisation pour être remplacées ultérieurement par des IgG.

IgA Les *IgA du sérum* sont de glycoprotéines de composition et de structure très voisines de celles des IgG, mais d'une teneur plus élevée en glucides. Elles comportent deux chaînes lourdes α (PM 65 kDa) dont il existe deux variétés α_1 et α_2 , correspondant à deux sous-classes d'IgA. Les IgA peuvent exister dans le sérum sous forme polymérisée (dimère ou plus) avec des constantes de sédimentation allant de 7 à 19S. Elles ne fixent pas le complément et ne traversent pas la barrière placentaire.

Les *IgA sécrétoires* sont présentes dans toutes les sécrétions exocrines, salive, lait, larmes, sécrétions des tractus respiratoire et digestif. D'un PM d'ordre de 400 kDa et de constante de sédimentation 11S, elles sont constituées de l'association par leur fragment Fc de deux molécules

d'IgA sérique à un constituant particulier dit « pièce sécrétoire » (glycoprotéine de PM 58 kDa). De plus, une chaîne polypeptidique J unit les Fc des deux molécules. Ces IgA sécrétoires possèdent donc en principe quatre sites anticorps.

IgD Elles existent à un taux faible dans le sérum (0,025 g/l). Il s'agit de glycoprotéines de PM 170 kDa, de structure identique à celle des IgG, avec les mêmes chaînes légères (κ ou λ) et une chaîne lourde δ spécifique (PM 58 kDa).

IgE Elles existent normalement dans le sérum à l'état de traces (3×10^{-4} g/l). Elles ont un PM de 195 kDa et une constante de sédimentation 8S. Leur structure est également superposable à celles des IgG avec les mêmes chaînes légères et des chaînes lourdes spécifiques ϵ de PM 75 kDa. Elles correspondent essentiellement aux anticorps réaginique des processus allergiques.

C. LA RECONNAISSANCE DES ANTIGENES

Les études de cristallographie aux rayons X ont montré que les acides aminés des régions variables V_H et V_L (fragments F_V), situés à l'extrémité du fragment Fab, sont impliqués dans la liaison aux antigènes. C'est l'immense variabilité de structure de ces régions qui explique la spécificité de cette fonction de reconnaissance (Aucouturier, 1999).

Les différences entre régions variables sont concentrées dans trois courtes zones de chaque chaîne, lourde ou légère : les « zones hypervariables », aujourd'hui appelées « régions déterminant la complémentarité » (CDR). Les autres acides aminés des régions V constituent une charpente (quatre régions « framework » ou FR) qui, bien que ne participant pas à la liaison à l'antigène, jouent cependant un rôle important lors du repliement des chaînes des régions V dans le maintien de l'intégrité du site anticorps.

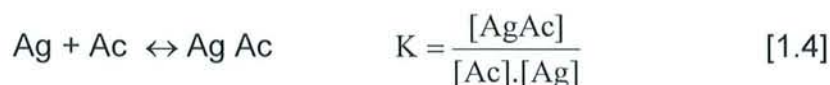
Les trois CDR de la chaîne légère coopèrent avec les trois CDR de la chaîne lourde pour fixer un épitope. Bien que relativement éloignées dans la séquence, les CDR sont regroupées dans l'espace pour former le site anticorps (ou paratope), au niveau des boucles. La structure tridimensionnelle globale des régions variables est remarquablement conservée. Ce sont surtout les chaînes latérales des acides aminés qui déterminent la spécificité de liaison, en permettant l'établissement de liaisons non-covalentes. Bien que ces forces attractives (liaisons hydrogène, liaisons hydrophobes, forces de Van der Waals et électrostatiques) soient faibles, comparées aux liaisons covalentes, leur grand nombre permet une énergie de liaison élevée (Van Oss, 1997).

La distance (d) qui sépare les différents groupes réactifs est un facteur critique pour l'établissement de liaisons non-covalentes. Les forces attractives, pour être efficaces, exigent un contact étroit entre les différents groupes réactifs. Le déterminant antigénique (épitope) et le site anticorps (paratope) doivent posséder des structures complémentaires capables de se combiner c'est-à-dire :

1. il doit exister des groupements atomiques appropriés sur les molécules d'antigène et d'anticorps,
2. la forme du site anticorps doit être adaptée à l'antigène pour que plusieurs liaisons non-covalentes puissent être formées simultanément.

Dans le cadre d'une complémentarité parfaite entre l'antigène et le site anticorps, l'énergie de liaison interdit une rupture thermodynamique. Cependant, si les nuages électriques de l'antigène et de l'anticorps se recouvrent, des forces stériques de répulsion entrent alors en jeu. Ces forces jouent un rôle important quant à la spécificité de l'anticorps pour un antigène donné et quant à sa capacité de reconnaître différents antigènes, en effet toute modification de la structure complémentaire idéale entraîne une augmentation des forces répulsives et une diminution des forces attractives, donc une baisse de l'énergie de liaison globale.

La force de liaison antigène-anticorps est appelée **affinité** de l'anticorps, elle représente la somme des forces attractives et répulsives décrites ci-dessus. L'interaction entre le site anticorps et l'antigène peut être mesurée thermodynamiquement (Kelley et col, 1993). Les liaisons non-covalentes entre un anticorps et l'épitope reconnu sont dissociables, l'ensemble de la liaison entre un antigène et un anticorps est donc une réaction réversible. Dans ce cas, la loi d'action de masse peut être appliquée et la constante d'équilibre K déterminée : c'est la constante d'affinité.



où $[AgAc]$ représente la concentration d'antigène complexé, $[Ag]$ la concentration d'antigène libre, et $[Ac]$ la concentration des sites d'anticorps libres à l'équilibre.

L'anticorps, avec ses quatre chaînes polypeptidiques, possède deux sites de liaison pour l'antigène, ce qui lui permet de se lier de façon plurivalente. Quand un antigène multivalent se combine à plus d'un site anticorps, l'énergie de liaison qui en résulte est de beaucoup supérieure à la somme des énergies de liaison de chacun des sites impliqués : en effet, une rupture simultanée de toutes les liaisons existantes est nécessaire pour que l'antigène se dissocie de l'anticorps. L'**avidité** désigne la force avec laquelle un anticorps multivalent se lie à un antigène multivalent. L'**affinité**, quant à elle, désigne la force avec laquelle un seul site anticorps se lie à un déterminant antigénique unique. Ainsi, l'avidité d'un anticorps pour un antigène dépend de l'affinité de chacun des sites d'anticorps pour les différents déterminants antigéniques ; elle est supérieure à la somme de ces affinités dans le cas d'antigènes et d'anticorps multivalents. Dans les conditions physiologiques normales, la notion d'avidité paraît être la plus appropriée puisque les antigènes naturels sont en général multivalents, cependant la mesure de l'affinité d'un anticorps pour un haptène renseigne davantage quant à la nature immunochimique de la réaction antigène-anticorps.

Les mesures d'affinité d'un anticorps sont réalisées à l'équilibre et l'affinité indique la tendance des anticorps à former des complexes stables avec l'antigène (Azimzadeh et col, 1990). Cependant, la cinétique de l'association et

de la dissociation des anticorps représente un autre paramètre important pour comprendre les activités biologiques des anticorps.

Par cinétique, on entend la mesure de la constante d'association k_a ($\text{mol}^{-1}, \text{s}^{-1}$) et de la constante de dissociation k_d (s^{-1}). A l'équilibre, le rapport de ces deux constantes indique la constante d'équilibre ou l'affinité de l'anticorps.

$$K = \frac{k_a}{k_d} \quad [1.5]$$

L'évaluation de l'affinité et de l'avidité d'un anticorps a non seulement un intérêt théorique, puisqu'elle renseigne sur la nature de la liaison antigène-anticorps, mais aussi un intérêt pratique puisque l'affinité et l'avidité d'un anticorps conditionnent ses propriétés physiologiques et pathologiques. Les anticorps de haute affinité sont plus efficaces que les anticorps de faible affinité dans bon nombre de réactions biologiques (Yelton et col, 1981).

III. LES ANTICORPS MONOCLONAUX

En 1975, Kohler et Milstein (Kohler et col, 1975) ont décrit une technique pour obtenir des anticorps purs de spécificité bien définie, elle consiste à produire des anticorps monoclonaux à partir de cellules en culture. Cette technique implique l'obtention de cellules qui sécrètent indéfiniment un seul type d'anticorps ayant une spécificité définie, permettant ainsi d'éviter la variabilité des antisérums produits par immunisation.

▪ **Technique de production des anticorps monoclonaux**

Les animaux (habituellement des souris ou des rats) sont immunisés avec l'antigène (Roitt et col, 1997). Lorsque les animaux ont produit une bonne réponse anticorps, leur rate ou leurs ganglions lymphatiques sont prélevés. Les cellules dissociées sont alors fusionnées avec des cellules de myélome grâce à l'addition de polyéthylène-glycol (PEG) qui permet la fusion membranaire. Seule une faible proportion des cellules peut fusionner. Le mélange fusionné est alors remis en culture avec du milieu contenant du « HAT » (hypoxanthine - aminoptérine - thymidine). L'aminoptérine est une toxine puissante qui bloque une des voies de synthèse de l'ADN. Cette voie peut être court-circuitée si l'on fournit à la cellule des métabolites intermédiaires comme l'hypoxanthine et la thymidine. Ainsi les cellules spléniques peuvent pousser en milieu HAT, mais les cellules de myélome meurent en HAT, parce qu'elles ont un défaut métabolique et ne peuvent pas utiliser ce circuit de secours (elles sont déficientes en hypoxanthine phosphoribosyl transférase). Au début de la culture en milieu HAT, on y trouve des cellules spléniques, des cellules de myélome et des cellules fusionnées. Les cellules spléniques meurent en culture après une à deux semaines, et les cellules de myélome sont tuées par le milieu HAT. Seules les cellules fusionnées survivent puisqu'elles ont acquis l'immortalité des cellules du myélome et la capacité de court-circuitage métabolique des cellules spléniques. Quelques-unes de ces cellules auront également gardé la capacité de produire un anticorps. Tous les puits contenant des cellules capables de proliférer sont testés en ce qui concerne la production de l'anticorps désiré (souvent par ELISA). S'ils sont positifs, la culture est clonée, c'est-à-dire répartie dans des plaques de telle sorte qu'il n'y ait plus qu'une

cellule par puits. Cela donne un clone cellulaire (hybridome), provenant d'une seule cellule, à la fois immortel et producteur d'un même anticorps monoclonal (figure 10) (Berzofsky et col, 1999).

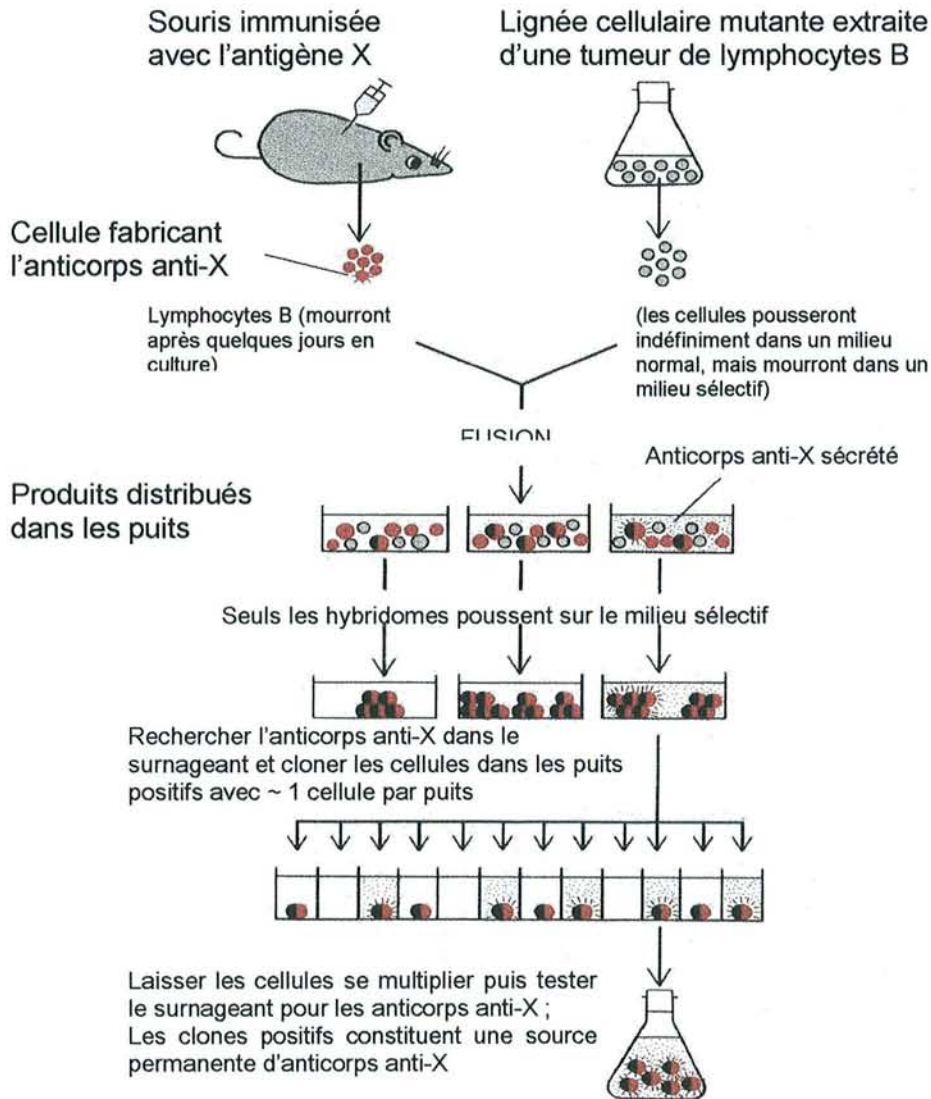


Figure 10 : Production d'un anticorps monoclonal (d'après Alberts et col, 1995).

La possibilité d'obtenir chez les animaux de laboratoire des anticorps monoclonaux pouvant reconnaître spécifiquement des structures antigéniques définies a représenté un des progrès les plus marquants de la biologie : les

applications technologiques ont été considérables en particulier dans les domaines des méthodes diagnostiques pour la détection et le dosage d'un nombre considérable de molécules, ainsi qu'en thérapeutique où ils permettent de cibler *in vivo* des structures antigéniques définies.

IV. L'AGGLUTINATION ERYTHROCYTAIRE

La réaction entre les molécules d'anticorps et celles des antigènes présents sur la membrane du globule rouge est une interaction spécifique et réversible qui peut être divisée schématiquement en deux étapes.

- La *première étape* représente la fixation de l'anticorps à un antigène de la surface du globule rouge ; cette réaction d'équilibre suit la loi générale d'action de masse.
- La *seconde étape* concerne les manifestations de la réaction, telles que l'agglutination, la lyse des globules rouges ou la phagocytose.

L'agglutination est un phénomène complexe. Selon la théorie du réseau, la réaction d'agglutination apparaît comme un phénomène très spécifique explicable par la formation d'un réseau tridimensionnel entre des molécules d'anticorps et des structures antigéniques. Les molécules d'anticorps seraient donc capables de se fixer sur des sites antigéniques portés par des cellules adjacentes, et lorsque le réseau ainsi constitué devient suffisamment important, on observe la réaction d'agglutination (Cartron et col, 1979).

A. FACTEURS DE L'AGGLUTINATION

L'agglutination dépend de plusieurs facteurs, en particulier de la surface des globules rouges, du type d'anticorps et des conditions du milieu.

1. Surface des globules rouges

Le nombre de sites récepteurs spécifiques à la surface des globules rouges est probablement le facteur le plus important. L'agglutination ne se produit en effet qu'à partir d'un nombre minimum de sites antigéniques. Mais, dans la plupart des systèmes, l'agglutination apparaît alors qu'un très petit nombre seulement des sites antigéniques disponibles est combiné à l'anticorps. Par exemple, l'agglutination par IgG anti-A n'est possible que lorsque chaque globule fixe au minimum 3 000 molécules.

La situation des sites, à la surface ou en profondeur, ou bien distants les uns des autres sur la membrane des érythrocytes, joue aussi un rôle fondamental. D'une manière plus générale l'intégrité de la membrane est un facteur très important.

2. Anticorps

L'efficacité des molécules d'anticorps est liée à la fois à leur taille et à leur nombre de sites (valence). La plupart des anticorps agglutinants sont des IgM, alors que la majorité des anticorps non agglutinants sont des IgG. Cette différence s'explique par le nombre plus petit de molécules IgM que de molécules IgG (fixées à la surface de l'hématie) nécessaire pour provoquer l'agglutination (Goudemand et col, 1980).

3. Milieu de réaction

La capacité d'agglutiner une suspension d'érythrocytes dépend de la force ionique, du pH, de la constante diélectrique du milieu, et de la température.

Lorsque la température s'élève, le mouvement thermique s'accroît, favorisant les possibilités de collisions entre les érythrocytes sensibilisés. Ce facteur agit également sur la première étape de la réaction antigène-anticorps ; en général, on peut prévoir que l'intensité de la réaction augmente lorsque la température s'élève.

La force ionique du milieu de la réaction influence également de manière importante les deux niveaux de la réaction d'agglutination. Une diminution de la force ionique augmente la fixation de l'anticorps et accélère l'association entre anticorps et antigènes. L'utilisation d'anticorps en excès par rapport aux globules provoque également une augmentation de l'agglutination.

Potentiel Zêta

Il est tout à fait admis que la distance à laquelle les globules rouges peuvent s'approcher l'un de l'autre est critique dans la réaction d'agglutination, pour favoriser la formation des ponts intercellulaires : les globules rouges sensibilisés par les molécules d'anticorps IgM doivent s'approcher à environ 30-35 nm, tandis que les globules rouges sensibilisés par les molécules d'anticorps IgG requièrent un contact plus proche : 12 à 15 nm.

La distance entre les globules en suspension dépend de plusieurs facteurs physico-chimiques : l'agglutination des cellules provient soit de la

modification du système par des facteurs non spécifiques, soit de la fixation spécifique de l'anticorps.

Une suspension stable d'érythrocytes est soumise à deux types de forces : les forces de répulsion liées aux charges électrostatiques du globule rouge (principalement groupements carboxyliques des acides sialiques attachés à des glycoprotéines de la membrane), et les forces de cohésion liées à la tension interfaciale entre les érythrocytes.

Dans une solution saline physiologique, les globules rouges sont entourés d'un nuage d'ions de charge opposée dont la densité décroît au fur et à mesure que l'on s'éloigne de l'érythrocyte, ce qui crée une différence de potentiel (potentiel zêta) entre le milieu environnant et le nuage de cations qui entoure chaque globule rouge (figure 11).

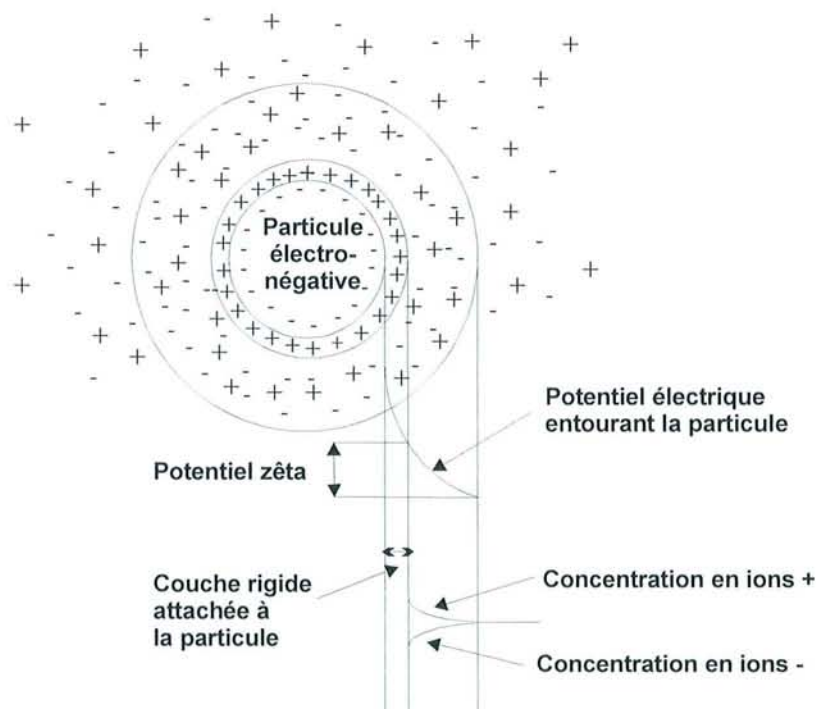


Figure 11 : Le globule rouge et son environnement ionique (d'après Stoltz et col, 1969).

La force ionique, le pH, la constante diélectrique et la viscosité du milieu déterminant, l'épaisseur de la double couche électrique entourant les cellules, influent sur la stabilité des globules rouges en suspension. On peut obtenir une estimation du potentiel zêta en mesurant la mobilité électrophorétique des globules rouges. La force de répulsion entre deux érythrocytes dépendra de la valeur du potentiel zêta. Il existe une valeur critique en dessous de laquelle la suspension reste stable et au-dessus de laquelle elle devient instable.

Selon Pollack (Pollack, 1965), il existe une relation entre le potentiel zêta et la charge négative des érythrocytes, la constante diélectrique et la force ionique du milieu selon la formule :

$$\zeta = f\left(\frac{\sigma}{D\sqrt{\mu}}\right) \quad [1.6]$$

où : ζ est la différence de potentiel, σ la charge électrique du globule rouge, D la constante diélectrique du milieu et μ la force ionique du milieu.

Dans la relation simplifiée proposée par Pollack, le potentiel zêta diminue si la charge électrostatique de la surface diminue, si la constante diélectrique du milieu augmente ou si la force ionique du milieu, c'est-à-dire la concentration en sels, augmente. La diminution du potentiel zêta signifie la diminution des forces intercellulaires entre les érythrocytes, situation qui favorise l'agglutination et qui accroît ainsi les réactions sérologiques (Salmon et col, 1991).

B. L'AGGLUTINATION ARTIFICIELLE

Les méthodes d'agglutination artificielle sont destinées à faire apparaître une agglutination des hématies en utilisant des anticorps non directement agglutinants en milieu salin (Cartron et col, 1979). Ces méthodes sont essentielles en immunohématologie. Elles sont basées sur divers principes :

- *Traitement des hématies par des enzymes protéolytiques.* Ces enzymes, d'origine animale ou végétale (trypsine, papaïne, broméline, pronase...), libèrent des fragments polypeptidiques qui appartiennent aux glycoprotéines. Ceci diminue le potentiel zêta du système, du fait que les fragments polypeptidiques libérés contiennent des molécules d'acide sialique, responsables en grande partie de la charge électrique de la membrane.
- *Suspension des hématies dans un milieu contenant des substances macromoléculaires.* Ceci diminue la force de répulsion interglobulaire. On admet habituellement que les substances utilisées, telles que l'albumine, la PVP (polyvinyl pyrrolidone), le Dextran à haut poids moléculaire, le Ficoll, se polarisent dans le champ électrique du globule rouge et diminuent la force de répulsion interglobulaire. Leur effet est donc d'élever la constante diélectrique du milieu, ce qui diminue le potentiel zêta et favorise l'agglutination.
- *Agglutination des hématies sensibilisées par un sérum anti-globuline humaine (réaction de Coombs).* Le sérum antiglobuline humaine permet de révéler la présence d'un anticorps spécifique fixé sur l'antigène correspondant à la surface de l'hématie, dans le cas où cette fixation ne s'est pas traduite par l'agglutination directe des hématies.

V. METHODES D'ANALYSE DE L'AGGLUTINATION

Les études sur l'agglutination érythrocytaire se sont multipliées ces dernières années, dans le but de mieux comprendre les mécanismes d'agglutination et d'évaluer leurs conséquences sur l'écoulement. Plusieurs méthodes dynamiques permettent d'accéder à des paramètres représentatifs de l'état d'agglutination pour une suspension érythrocytaire en réponse à une sollicitation donnée. En particulier, des méthodes analytiques et expérimentales ont été développées pour la quantification de l'énergie d'adhésion intercellulaire.

1. Méthodes d'observation directe

Différents dispositifs expérimentaux, couplés à un microscope et à un logiciel de traitement d'image, ont été mis au point par diverses équipes. Ils permettent de dégager plusieurs informations sur l'interaction entre les globules rouges.

Chambre de flux : Chien et col (Chien et col, 1977) ont mis au point un dispositif expérimental pour quantifier la contrainte de cisaillement nécessaire pour séparer un agglutinat à deux cellules dans un écoulement. Dans ce système, des cellules agglutinées par des lectines sont mises à l'intérieur d'un conduit rectangulaire. Une contrainte de cisaillement appliquée parallèlement à la surface de contact, est augmentée graduellement et provoque ainsi l'arrachement progressif de la cellule supérieure. Le dispositif est placé sur un microscope inversé et les images sont enregistrées. Le degré de séparation des agglutinats est mesuré par microphotographie. La relation entre le

pourcentage de surface séparée et la contrainte de cisaillement est obtenue, et l'énergie d'adhésion impliquée dans l'interaction cellulaire par des liaisons spécifiques, est calculée (Sung et col, 1985).

Micropipettes: cette méthode permet d'analyser des doublets individuels de cellules adhérents et de déterminer la force d'adhésion (Evans et col, 1984, 1991 ; Sung et col, 1985, 1986). Chaque cellule est attrapée à l'extrémité d'une micropipette grâce à une pression d'aspiration. Les cellules sont attirées et alignées par la micromanipulation de plusieurs pipettes. En réglant la pression d'aspiration et la position des pipettes par micromanipulation, les cellules sont séparées graduellement. Avec une pression suffisamment forte, les deux cellules peuvent être séparées complètement. Le procédé est enregistré et les images sont analysées. A partir des paramètres géométriques déterminés, l'énergie d'adhésion est calculée (Tha et col, 1988 ; Tozeren, 1989a).

Microtubes: Tha et col (Tha et col, 1986 ; Tees et col, 1993) ont développé une méthode pour mesurer les forces hémodynamiques nécessaires pour séparer deux globules rouges fixés, transformés en sphères et dilatés, agglutinés par des anticorps. Avec un appareil à microtube mobile, les doublets sont suivis dans un flux de Poiseuille en accélération lente à travers des tubes de 150 μm de diamètre. Les mouvements de rotation et de translation avant la rupture de l'interaction sont enregistrés en vidéo et analysés. La force hémodynamique de rupture est déterminée à partir de la mesure de la position radiale et de la vitesse du doublet ainsi que des angles polaire et azimutal de son axe.

Rhéoscope : Schmid-Schönbein et col (Schmid-Schönbein et col, 1973) ont décrit un dispositif permettant d'observer le comportement du sang soumis à une contrainte de cisaillement connue. Cet appareil, appelé rhéoscope est constitué d'une chambre transparente de mesure, formée d'un cône et d'un plan entraînés en rotation de sens inverse par un moteur à vitesse variable, et montée sur un microscope inversé. L'analyse des images prises permet l'étude de l'adhésion cellulaire. Tees et col (Tees et col, 1993, 1996) ont déterminé la dépendance de la force avec le temps de rupture d'agrégats des globules rouges agglutinés par anticorps, soumis à une contrainte de cisaillement dans le rhéoscope.

2. Méthodes optiques

L'intensité de lumière transmise ou réfléchiée par un échantillon sanguin dépend fortement de son état d'agglutination. Des techniques ont été développées pour quantifier l'agglutination, basées sur la mesure de l'intensité de la lumière transmise ou rétrodiffusée.

Transmission de lumière : Schmid-Schönbein et col (Schmid-Schönbein et col, 1973) ont étudié le flux lumineux transmis à travers l'entrefer d'un viscosimètre cône-plan. Ce **rhéoscope**, modifié par adaptation d'un dispositif photoélectrique, permet de suivre les variations de transmission de lumière à travers un échantillon sanguin en fonction du temps. Les globules rouges sont soumis à un cisaillement dans un viscosimètre. Après l'arrêt du cisaillement, les érythrocytes commencent à s'agréger et le flux transmis augmente avec le temps. Un certain nombre de paramètres peut être déduit. L'équipe de Schmid-Schönbein (Schmid-Schönbein et col, 1982) a développé un appareil

photométrie automatique basé sur ce système (Myrenne, GMBH, Roetgen, Allemagne).

Rétrodiffusion de la lumière : Cette méthodologie est basée sur la mesure du flux lumineux rétrodiffusé par des particules en suspension, ce qui permet l'analyse de la taille de ces particules (Healy et col, 1974, 1975). Un système instrumental a été développé et automatisé pour mesurer les paramètres cinétiques, structuraux et rhéologiques de l'adhésion érythrocytaire : l'**Erythroagregamètre** (Régulest, Florange, France) (Donner et col, 1988b). Cet appareil consiste en un viscosimètre de type Couette transparent, éclairé par une diode laser. Le flux lumineux, rétrodiffusé par la suspension sanguine, est collecté par une photodiode et enregistré. La vitesse de rotation du cylindre externe permet d'appliquer à la suspension des vitesses de cisaillement élevées. Lorsqu'une contrainte de cisaillement suffisante est appliquée à une suspension d'agglutinats ou d'agrégats érythrocytaires, ceux-ci sont dissociés et deviennent d'autant plus petits que le taux de cisaillement est maintenu plus longtemps. A partir des courbes de variation de lumière rétrodiffusée, on calcule des paramètres de l'agglutination (temps d'agrégation et désagrégation, indice d'agrégation, indice de structure, indice d'orientation, paramètre d'énergie de dissociation, seuil de désagrégation, etc).

Cette méthode s'est révélée très utile pour l'analyse de l'agrégation (Mills et col, 1979, 1981 ; Pignon et col, 1989, 1991) et de l'agglutination érythrocytaire (Rasia et col, 1996 ; Rasia-Valverde et col, 1997) en hémorhéologie clinique.

3. Autres méthodes

D'autres méthodes ont également été proposées pour la quantification de l'agglutination. Il s'agit de l'interférométrie ultrasonore (Coulibaly et col, 1992), de la technique du film de piégeage (Ivanov et col, 1998) et de la microscopie de force atomique (Merkel et col, 1999 ; Sagvolden, 1999).

MATERIELS ET METHODES

MATERIELS ET METHODES

I. MATERIELS

A. Echantillons sanguins

Le sang provient de dons d'adultes volontaires sains à l'Etablissement Français du Sang (EFS) de Nancy. Un échantillon de sang non-anticoagulé est prélevé dans le circuit de don, récupéré dans un tube (Vacutainer Becton Dickinson) contenant de l'EDTA-K₃ (15 %) comme anticoagulant et conservé à 4°C jusqu'à utilisation (dans les 48 heures suivant le prélèvement sanguin). Nous avons utilisé des échantillons de groupe sanguin A₁ (n = 30), A₂ (n = 8), A₁B (n = 7), B (n = 10) et O (n = 10) classés à l'EFS par les méthodes d'hémagglutination directe et indirecte (méthodes du « gel test » et méthodes conventionnelles de Beth-Vincent et Simonin) (Marcelli et col, 1981).

B. Anticorps monoclonal

Dans ce travail nous avons utilisé un anticorps monoclonal murine de classe IgG₁ anti groupe sanguin A, donné gracieusement par le Dr Sondag et le Dr Rapaille du Centre Hospitalier Universitaire de Liège (Belgique). Il nous a été fourni sous forme de surnageant de culture. L'anticorps (identifié par S10-11A6, lot 7/98) est dissous dans du milieu de culture IMDM FCS (Iscove's Modified Dulbecco's medium – Fetal Calf Serum 15 %).

La concentration en IgG murine a été mesurée par une technique ELISA (*enzym linked immunosorbent assay*) de type sandwich (décrit page 85) et est égale à $18,6 \pm 0,6 \mu\text{g/ml}$. Les titres mesurés par hémagglutination (Marcelli et col, 1981) sont égaux à 128 et 32 pour, respectivement, les globules rouges de groupe sanguin A₁ et A₂.

Après centrifugation des surnageants de culture pour éliminer cellules et débris résiduels, de l'azote de sodium (Merck) a été ajouté à 0,1 % (p/v) pour la conservation à 4°C.

C. Solutions et milieux de suspension des érythrocytes

▪ Tampon phosphate isotonique (PBS)

La composition du PBS est la suivante: 1,4 mM KH₂PO₄ (Merck), 10 mM Na₂HPO₄.7H₂O (Sigma), 2,7 mM KCl (Prolabo), 137 mM NaCl (Prolabo) avec un pH de 7,4. L'osmolarité est ajustée à $295 \pm 5 \text{ mOsm/kg}$ par addition de NaCl ou d'eau distillée.

▪ Solution de suspension pour la chambre de flux (PBS-HSA)

L'albumine humaine sérique (HSA) à 16,6 % (p/v), fournie par le service d'immunohématologie (EFS de Brabois), a été utilisée à une concentration de 0,20 % (p/v) dans du PBS pour stabiliser les érythrocytes durant les expériences effectuées dans la chambre de flux. A cette concentration, l'albumine ne modifie pas les propriétés physico-chimiques des globules rouges (Tha et col, 1988).

Différentes dilutions indépendantes de l'anticorps monoclonal sont préparées dans cette solution: 1/1000, 1/1200, 1/1400, 1/1500 et 1/1600 pour

les hématies de groupe sanguin A₁ et 1/400, 1/500 et 1/600 pour les hématies de groupe sanguin A₂.

▪ **Solution de suspension pour l'érythroagrégamètre (PBS-Dx)**

Du dextran de poids moléculaire de 70 kDa (Dx 70) a été dissous à une concentration de 4,1 % (p/v) dans du PBS. Le dextran utilisé est un polymère linéaire de D-glucopyranose (Pharmacia). La concentration choisie de Dx 70 permet d'atteindre une viscosité semblable à celle du sérum sanguin ($1,85 \pm 0,05$ mPa.s). Cette dernière a été contrôlée avec un viscosimètre (Contraves LS30), à 37°C et à différentes vitesses de cisaillement.

Des dilutions géométriques de raison deux (de 1/8 à 1/128), indépendantes, de l'anticorps monoclonal sont préparées dans cette solution. Ces dilutions seront utilisées ensuite comme milieu de suspension des érythrocytes pour les expériences d'agglutination.

Une solution identique (sans anticorps) a été utilisée pour préparer les suspensions contrôles.

II. METHODES

A. Préparation des échantillons

Les échantillons sanguins sont centrifugés à température ambiante pendant 5 minutes à 2 300 g. Les globules rouges forment un culot au fond du tube, recouvert d'une fine couche légèrement blanchâtre correspondant à la couche leuco-plaquettaire, elle-même recouverte du plasma. Ce dernier et la couche leuco-plaquettaire sont éliminés à l'aide d'une pipette Pasteur.

Préparation des suspensions érythrocytaires pour la chambre de flux

Le concentré globulaire est remis en suspension dans environ quatre volumes de PBS. Ensuite, trois lavages identiques dans du PBS-HSA (2 300 g, 5 minutes, température ambiante) sont effectués avant de resuspendre les globules rouges dans du PBS-HSA à raison de 7 μ l d'érythrocytes dans 10 ml de PBS-HSA (soit une concentration d'environ $5,07 \times 10^6$ GR/ml). Cette concentration érythrocytaire assure une distribution homogène en monocouche sur la lamelle couvre-objet de la chambre de flux, après le processus de sédimentation.

Préparation des suspensions érythrocytaires pour l'érythroagrégamètre

L'hématocrite (H) du concentré globulaire est mesuré après centrifugation de l'échantillon sanguin dans un capillaire scellé (1,3 - 1,4 mm de diamètre et 50 mm de longueur) à 10 000 g pendant 10 minutes. L'hématocrite est lu à l'aide d'un abaque de lecture, en faisant coïncider la ligne de séparation entre les hématies et le plasma avec les lignes graduées en pourcentage. Le

concentré globulaire est resuspendu dans la solution de PBS-Dx. L'hématocrite de cette suspension est ajusté à 35 % (environ $3,58 \times 10^9$ GR/ml) à partir des calculs suivants :

$$\alpha = \frac{0.35}{H - 0.35} \quad [2.1]$$

$$\text{Volume du diluant (PBS - Dx)} = \frac{1.5}{1 + \alpha} \quad (\text{cm}^3) \quad [2.2]$$

$$\text{Volume du concentré globulaire} = 1.5 - \frac{1.5}{1 + \alpha} \quad (\text{cm}^3) \quad [2.3]$$

Dilution (D) de l'anticorps :

$$\frac{1}{D} (\text{du Vol. diluant}) \text{ d'Ac} + \frac{D-1}{D} (\text{du Vol. diluant}) \text{ de PBS-Dx} \quad [2.4]$$

B. Dosage des IgG par ELISA

La quantité d'anticorps fixés à la surface des érythrocytes dans les différentes expériences a été estimée par une technique ELISA de type sandwich qui permet de quantifier la concentration d'IgG en solution (Fleming et col, 1988).

▪ Principe

La technique ELISA de type sandwich utilise deux anticorps qui présentent une affinité pour l'analyte à doser (Ternynck et col, 1991). Ce dernier se lie au premier anticorps adsorbé au fond des puits d'une plaque de microtitration. Le deuxième anticorps, couplé à une enzyme, se fixe avec

l'analyte et l'addition d'un substrat de l'enzyme donne une réaction colorée permettant de le quantifier grâce à une gamme étalon.

▪ **Méthode**

Pour estimer la quantité d'anticorps fixés à la surface des érythrocytes dans les différentes expériences, nous avons déterminé la concentration en IgG murines dans les surnageants dilués de culture d'hybridomes avant incubation avec les érythrocytes (concentration initiale). Après incubation dans les conditions de travail établies pour chaque technique (hématocrite, température, temps et agitation), les suspensions d'érythrocytes sont centrifugées à haute vitesse (4000 g) pendant 2 minutes et la concentration en IgG du surnageant est dosée (concentration du surnageant d'incubation). La quantité d'anticorps fixés est estimée par différence entre la quantité initiale et la quantité dans le surnageant d'incubation.

Nous avons préparé différentes dilutions initiales de l'anticorps dans le milieu de suspension correspondant à chaque technique (PBS-HSA pour la chambre de flux et PBS-Dx pour l'érythroagrégame).

▪ **Protocole**

1. Revêtement des plaques de microtitration

Un volume de 100 μ l d'Ig de chèvre (réf AMI3401, Tago, Argene) anti-Ig (H+L) de souris à la concentration de 2,5 μ g/ml dans du carbonate-bicarbonate de sodium (Prolabo) 50 mM, pH 9,6 est déposé dans chaque puits d'une plaque de 96 puits (Costar, haute fixation, réf 3590). La plaque est laissée une nuit à 4°C.

Entre chaque étape, cinq lavages avec du PBS contenant du Tween 20 (Sigma) à 0,05 % (v/v) (PBS-Tween) sont effectués.

2. Saturation des puits

La plaque est saturée avec 125 μ l d'une solution de gélatine de poisson (Sigma) à 0,5 % (p/v) dans du PBS contenant du NaN_3 (Merck) à 0,02 % (p/v), et placée une nuit à 4°C.

3. Capture des IgG

L'étalon utilisé est un anticorps monoclonal murine purifié dont la concentration a été déterminée à la fois par spectrophotométrie à 280 nm en utilisant $\epsilon_{1\text{cm}}^{1\%} = 14$ et par dosage de protéines utilisant la technique au BCA (acide bicinchoninique). Les IgG étalons sont diluées de $\frac{1}{2}$ en $\frac{1}{2}$ dans du PBS-Tween à des concentrations allant de 0,1 à 20 ng/ml. Les échantillons à doser sont dilués dans le même tampon et 100 μ l de chaque dilution sont déposés en double dans les différents puits. La plaque est placée 2 heures à 37°C.

4. Révélation immunologique

Un anticorps de chèvre dirigé contre les Igs de souris et couplé à la peroxydase (réf AMI3404, Tago, Argene) est dilué au 1/1000 dans du PBS-Tween et déposé à raison de 100 μ l par puits. La plaque est de nouveau placée 1 heure à 37°C.

5. Détection par le substrat chromogène

Un volume de 100 μ l de solution de substrat : TMB (3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine, Fluka) à 0,1 mg/ml dans du DMSO (diméthylsulfoxyde, Sigma) + H_2O_2 (Prolabo) à 0,01 % (v/v) dans du tampon acétate-citrate de sodium 0,14 M, pH 6,0 est déposé dans les puits. La plaque est laissée à

température ambiante jusqu'à obtention d'une coloration stable (10 – 30 minutes). La réaction enzymatique est arrêtée avec 25 μl d' H_2SO_4 (Prolabo) 2 M.

La lecture de la densité optique (DO_{450}) se fait à 450 nm dans un lecteur de plaques (SLT.Spectra, Tecan).

6. Résultats

La courbe DO_{450} en fonction de la concentration de l'étalon permet de déduire la concentration dans l'échantillon.

C. Chambre de flux

L'énergie d'adhésion d'agglutinats érythrocytaires soumis à l'effet d'un cisaillement mécanique a été étudiée par observation microscopique en utilisant une chambre de flux parallèle (Hochmuth et col, 1973 ; Chien et col, 1977, 1990 ; Pierres et col, 1996).

▪ Instrumentation

La chambre de flux parallèle consiste en un microcanal de 18 mm de largeur et 0,84 mm d'épaisseur sur une longueur de 43 mm. Le microcanal est délimité à la face supérieure par une plaque en Plexiglas transparent (67 mm x 42 mm x 8 mm), et à la face inférieure par une lamelle couvre-objet en verre (53 mm x 78 mm x 0,32 mm, Esco, Erie Scientific). A chaque extrémité de la plaque en Plexiglas sont découpées deux ouvertures rectangulaires avec un écart de 4 cm et connectées à l'extérieur. Ces connexions permettent de relier de façon

étanche un système de capillaires en Téflon à travers lesquels sont injectées ou perfusées les différentes solutions à l'aide d'une pompe péristaltique (Masterflex, Cole Palmer Instrument). En outre, les suspensions sont introduites à l'aide d'une seringue connectée au système de capillaires. La pompe permet un contrôle de la vitesse de perfusion de sorte que le flux uniforme et laminaire dans le canal soit réglé avec précision. Un joint de Parafilm (American Can Company) délimite le périmètre du microcanal et lui confère son épaisseur. Ce joint est découpé de façon à encadrer un rectangle central de 18 mm x 43 mm avec une épaisseur de 0,84 mm (surface du canal = 774 mm² et volume d'environ 650 mm³). Un serrage par le vide permet une totale étanchéité de la chambre (figure 12).

La contrainte de cisaillement (σ , en mPa) dans la chambre de flux, est obtenue à partir de l'expression suivante (Pierres et col, 1996) :

$$\sigma = \frac{6 \cdot \eta_0 \cdot Q}{h^2 \cdot l} \quad [2.5]$$

où h et l sont la hauteur et la largeur du microcanal (en cm), Q le débit (en cm³/s) et η_0 la viscosité de la suspension (en mPa.s).

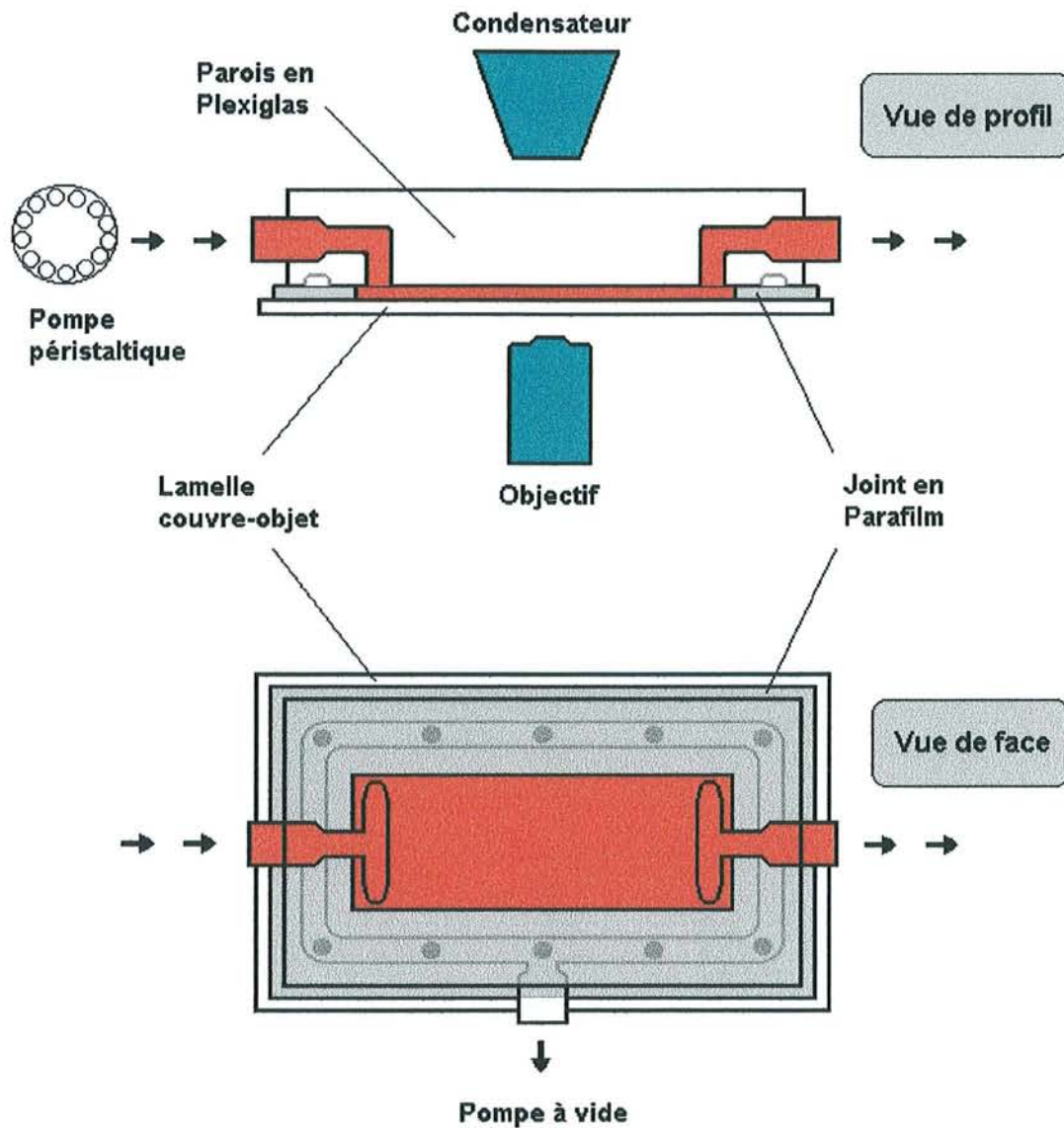


Figure 12 : Schéma descriptif de la chambre de flux parallèle.

La chambre de flux est placée sur la platine d'un microscope optique inversé (IMT-2, Olympus). Ce microscope permet d'observer la sédimentation en elle-même d'une part et les cellules après sédimentation d'autre part. Un objectif avec grossissement de 60 x a été utilisé.

Le microscope optique est équipé d'une caméra monochrome CCD (*Charged Coupled Device*, CCD-IRIS SONY). Cette caméra est reliée à un ordinateur, lui-même équipé d'une carte graphique (*frame grabber*) permettant

la digitalisation des images, et d'un logiciel de traitement d'images (Visilog 5.1, Noesis, France) (figure 13).

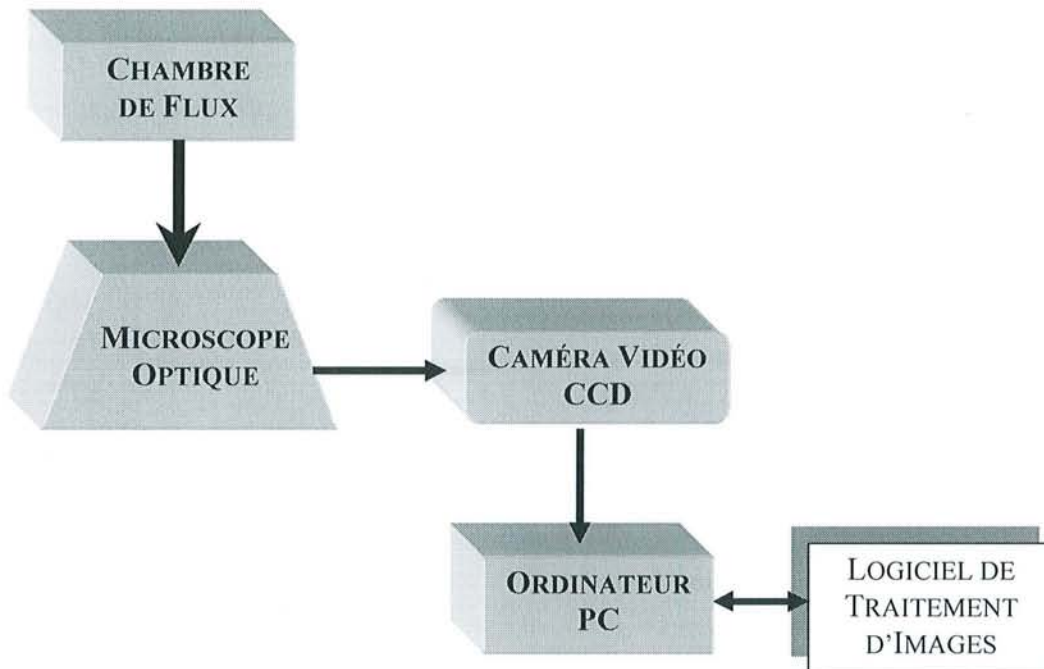


Figure 13 : Schéma général du dispositif expérimental de la chambre de flux.

▪ Calibrage du microscope optique

Toutes les images expérimentales sont acquises avec une résolution de 512 x 512 pixels. Avant toute observation ou mesure, l'image doit être calibrée avec précision, afin de connaître la taille des cellules observées et pouvoir mesurer les longueurs des parcours des cellules détachées. Pour cela, nous utilisons un micromètre (E. Leitz GmbH) comportant 200 graduations de 0,01 mm chacune. Ce micromètre se présente en fait sous la forme d'une lame porte-objet avec une pastille placée en son centre où sont gravées les graduations utilisées pour le calibrage. Deux séries d'images sont digitalisées : une première série de dix images où les graduations sont positionnées verticalement, et une seconde série de dix images où les graduations sont

positionnées horizontalement. Par conséquent, chaque série comporte dix images obtenues en différentes positions du micromètre. L'acquisition terminée, un traitement d'image permet : 1) de transformer l'image initiale (différents niveaux de gris au niveau des graduations) en image binaire (noir pour les graduations, blanc pour l'espace entre les graduations, *thresholding-binarisation*) ; 2) d'affiner l'épaisseur des graduations en ne prenant en compte qu'une ligne moyenne (*morphology-skeleton*). Cette procédure permet de connaître avec précision le nombre de pixels entre deux graduations séparées de 0,01 mm. La valeur moyenne ainsi qu'un écart-type sont alors déduits des dix valeurs obtenues et les résultats sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau III : Calibrage du microscope optique.

Calibrage de l'objectif 60 x	Position des graduations	
	Horizontale	Verticale
Nombre de pixel pour 10 μm *	60,624 \pm 0,004	60,475 \pm 0,005

*Moyenne \pm écart type de 10 déterminations.

▪ Méthode

Dix ml d'une suspension érythrocytaire à 0,067 % (v/v) dans du PBS-HSA sont incubés avec la dilution appropriée de l'anticorps monoclonal à température ambiante pendant 45 minutes. Cette incubation est réalisée dans un agitateur à 3 trs/min pour produire une homogénéisation de la suspension et favoriser la formation des agglutinats (Long et col, 1999). Ensuite, la suspension érythrocytaire est injectée dans la chambre de flux totalement vidée pour éviter, d'une part, tout effet de dilution et d'autre part, une répartition non-

homogène des cellules dans le volume. Pendant son remplissage, la chambre est maintenue en position verticale pour empêcher le dépôt spontané de cellules sur la lamelle et éviter la présence de bulles d'air dans le microcanal. L'injection terminée, la chambre est placée horizontalement sur la platine du microscope pendant 30 minutes, temps estimé suffisant pour que toutes les cellules présentes dans le volume soient déposées à la surface de la lame en verre. La sédimentation se fait en mode statique, aucun flux n'intervenant après l'injection. Le processus de sédimentation terminé, les globules rouges adhérents sur la lamelle inférieure du microcanal, sont observés au microscope optique. Pour permettre un déplacement très précis de la préparation lors de son observation, la chambre de flux est fixée sur la platine du microscope, dont les déplacements X et Y sont réalisés à l'aide des vis micrométriques.

La zone centrale du microcanal est balayée avec le microscope. Pour chaque expérimentation un agglutinat de deux cellules totalement superposées l'une sur l'autre (doublet) est observé. Cet empilement se caractérise par une intensité de gris différent de celle d'une cellule isolée et par le dédoublement des cellules lors de la mise sous flux. Une première image, en mode statique, est prise avant de commencer la perfusion de PBS-HSA dans la chambre. La perfusion est faite à une vitesse de flux constante, laquelle est progressivement augmentée jusqu'à atteindre une contrainte de cisaillement de 150 mPa (la gamme de contraintes appliquées varie de 4 à 150 mPa). Les augmentations de la vitesse de flux sont produites à intervalles de 30 secondes, au bout desquels de nouvelles images sont prises. Ces intervalles de temps permettent à la contrainte mécanique d'agir de façon parallèle à l'interface des doublets en produisant leur dissociation (figure 14). Ce processus continue jusqu'à ce que

l'aire de contact du doublet ne représente que moins de 50 % et que la prise d'images nettes ne soit plus possible à cause de la vibration des cellules produite par le flux. Les images prises à chaque niveau de contrainte de cisaillement sont digitalisées et enregistrées sur l'ordinateur pour leur analyse ultérieure.

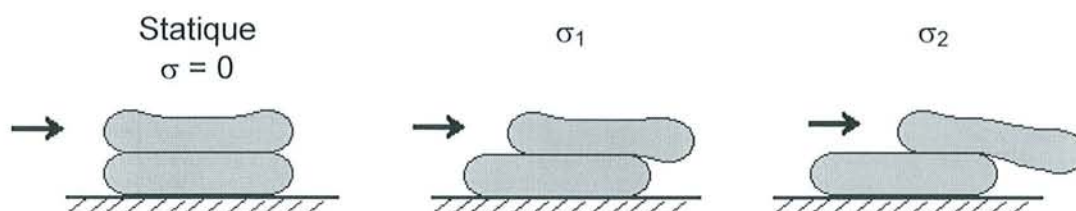


Figure 14 : Schématisation du déplacement des érythrocytes d'un doublet sous la contrainte de cisaillement produit par le flux ($0 < \sigma_1 < \sigma_2$).

▪ Détermination de la contrainte de cisaillement σ_{50}

En raison de la faible épaisseur des globules rouges, ils apparaissent faiblement contrastés au microscope, malgré l'optimisation des différents réglages optiques (luminosité, contraste). De plus, le niveau de gris d'un érythrocyte n'est pas homogène, en raison de sa forme discoïdale biconcave. Malgré un long travail de mise au point du traitement d'images, il nous est apparu impossible de faire déterminer automatiquement la surface de superposition des globules rouges par le logiciel. Nous avons donc choisi de délimiter, à l'aide de la souris, le contour de l'aire de superposition entre les deux globules rouges qui forment le doublet (figure 15). Ensuite, l'aire (en μm^2) de la surface délimitée est déterminée automatiquement par le logiciel selon la relation de calibrage pixel- μm .

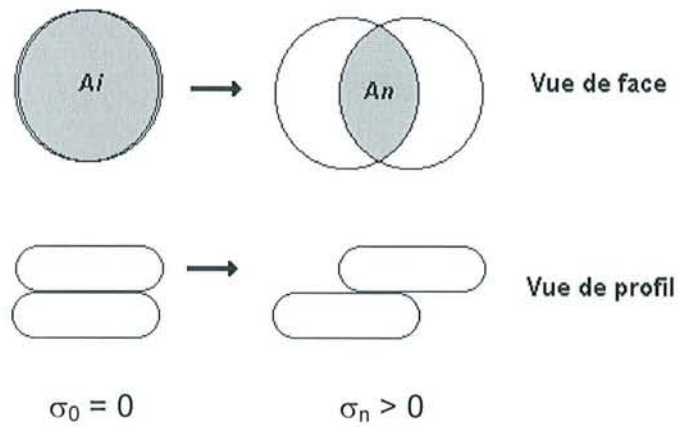


Figure 15 : Schéma des aires de superposition du doublet à l'état initial (A_i) et sous une contrainte de cisaillement (A_n).

Cinq mesures de l'aire de superposition du doublet pour chaque image sont effectuées, et le pourcentage de séparation à différentes contraintes de cisaillement est calculé :

$$\% \text{ séparation} = \frac{(A_i - A_n)}{A_i} \cdot 100 \quad [2.6]$$

où A_i (en μm^2) est l'aire de superposition à l'état initial de repos ($\sigma_0 = 0$) et A_n (en μm^2) est l'aire de superposition sous une contrainte de cisaillement n (σ_n).

Le pourcentage de séparation en réponse au flux en fonction de la contrainte de cisaillement agissant sur les agglutinats est représenté sous forme graphique. La contrainte de cisaillement (σ_{50} , en mPa) nécessaire pour produire une séparation de 50 % de l'aire d'adhésion du doublet est ainsi déterminée.

▪ Détermination de l'énergie de dissociation

L'énergie de dissociation (γ_d , en N/cm) est définie comme l'énergie nécessaire pour désagréger une unité d'aire membranaire. Cette énergie peut être déterminée à partir du travail effectué par la contrainte de cisaillement (Sung et col, 1985). L'énergie de dissociation totale impliquée dans la séparation de 50 % de l'aire d'adhésion est égale à l'énergie de dissociation par unité d'aire (γ_d) multipliée par l'aire totale séparée (A_{50}). Cette énergie de dissociation est équivalente au travail total réalisé. Le travail est le produit de la force de cisaillement agissant sur l'érythrocyte de dessus par le déplacement (d), c'est à dire, la distance parcourue par cet érythrocyte. La force agissant sur l'érythrocyte de dessus est égale à la contrainte de cisaillement (σ , en mPa) multipliée par l'aire de la surface de cette cellule soumise au cisaillement ($A \cong 50 \mu\text{m}^2$). Une simple déduction nous indique que pour une séparation de 50 %, le déplacement du globule rouge de dessus est d'environ $4 \mu\text{m}$. Le travail total effectué par la contrainte de cisaillement est donné par l'intégration de l'aire sous la courbe calculée par la fonction correspondant à la force appliquée ($\sigma_{50} \times A$) en fonction de la distance parcourue (d_{50}) (figure 16).

Puisqu'il s'agit d'une relation linéaire entre la force appliquée et le déplacement de la cellule, l'aire d'intégration sous la courbe pour tout degré de séparation correspond à un triangle et est calculée selon l'équation suivante :

$$\gamma_d \cdot A_{50} = \frac{(A \cdot \sigma_{50}) \cdot d_{50}}{2} \quad [2.7]$$

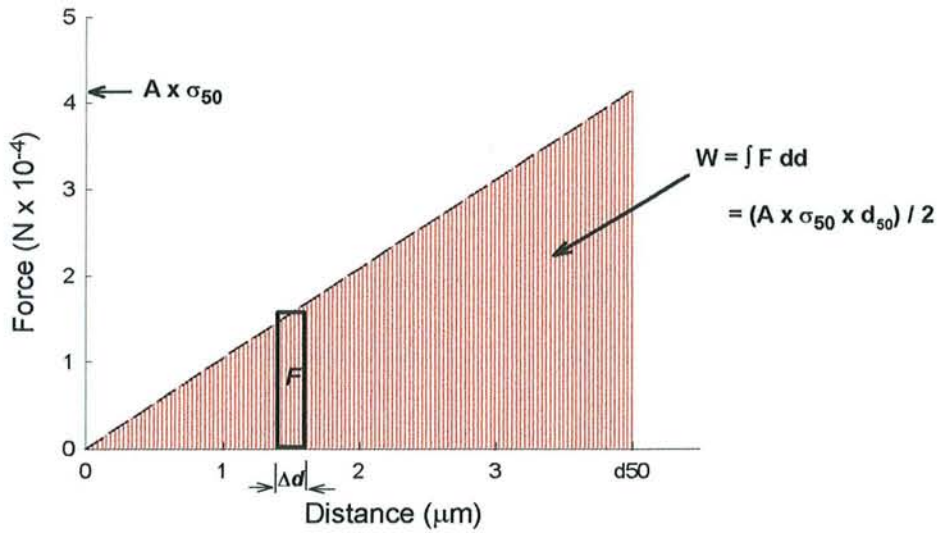


Figure 16 : Travail effectué par la contrainte de cisaillement pour produire un déplacement de $d = 0$ à $d = d_{50}$.

D'après nos paramètres, l'équation peut s'écrire :

$$\gamma_d \cdot 25 \mu\text{m}^2 = \frac{50 \mu\text{m}^2 \cdot \sigma_{50} \cdot 4 \mu\text{m}}{2} \quad [2.8]$$

ou

$$\gamma_d = \sigma_{50} \cdot 4 \times 10^{-4} \text{ cm} \quad [2.9]$$

équation qui permet de déterminer l'énergie d'adhésion du doublet à partir de la valeur expérimentale de la contrainte de cisaillement σ_{50} .

D. Erythroagrégamètre

Les cinétiques d'agrégation, d'agglutination et de dissociation ont été réalisées et enregistrées avec un Érythroagrégamètre (Régulest, Florange, France).

▪ Instrumentation

L'appareil consiste en un viscosimètre de type Couette dont le cylindre interne (d'un diamètre de 15 mm) est fixe (Donner et col, 1988b). Une circulation d'eau à l'intérieur de ce cylindre permet la régulation thermostatique du viscosimètre. La température est contrôlée à $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ par un bain thermostatique. Le cylindre externe transparent (d'un diamètre de 17 mm) est mis en rotation par un moteur. Un système tachométrique permet de régler les vitesses de rotation et d'appliquer à la suspension sanguine des taux de cisaillement variables d'une façon contrôlée (de 5 à 500 s^{-1}). L'échantillon à analyser est placé dans l'espace entre les deux cylindres coaxiaux dont l'épaisseur est de 1 mm. Un plan de l'appareil est proposé dans la figure 17.

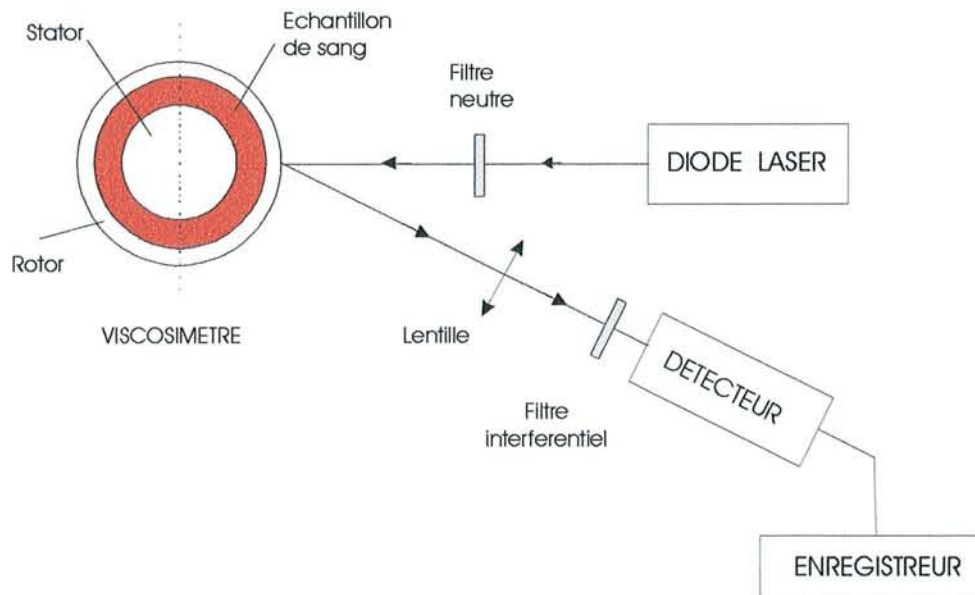


Figure 17 : Représentation schématique du dispositif expérimental de l'érythrogrégamètre (d'après Mills et col, 1981).

La source lumineuse est une diode laser émettant dans l'infrarouge ($\lambda = 780\text{ nm}$), ce qui réduit sensiblement les effets dus à l'absorption par

l'hémoglobine. La lumière rétrodiffusée par la suspension sanguine est enregistrée par un détecteur photoélectrique (photodiode) placé au-dessus de la diode laser. Les orientations de la diode laser et du détecteur par rapport à l'axe du viscosimètre ont été établies afin d'obtenir un signal optimal. Un bras articulé permet le déplacement vertical du cylindre interne et, donc, l'introduction de l'échantillon sanguin à l'intérieur du viscosimètre. L'appareil est relié à un ordinateur de type *PC* qui, piloté par un programme spécialement conçu, procède à la mesure automatique, à l'analyse des données et au calcul des différents paramètres (figure 18).

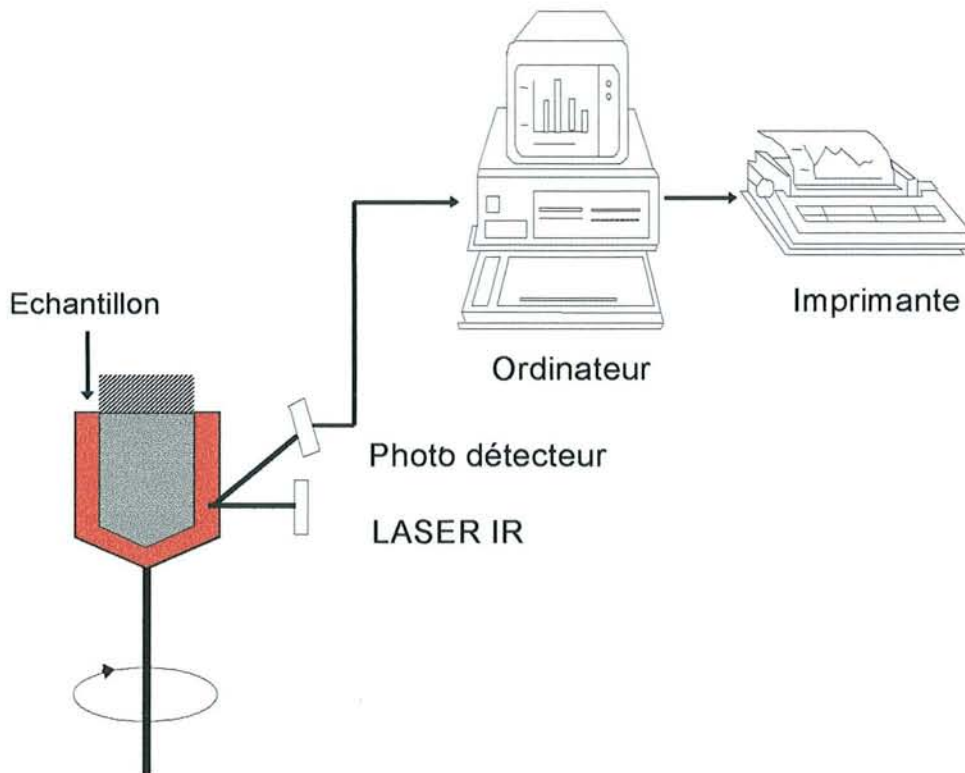


Figure 18 : Schéma général du dispositif expérimental de l'érythroagrégamètre (d'après Rasia et col, 1996).

▪ **Méthode**

Le système thermostatique de l'appareil est réglé à la température optimale pour la réaction Ag - Ac du système ABO (20°C). Un volume de 1,5 ml de la suspension de globules rouges (35 % de H) est homogénéisé par 30 inversions délicates pendant 30 secondes. La suspension est ensuite déposée dans l'entrefer du viscosimètre.

L'échantillon est cisailé pendant 10 secondes à fort taux de cisaillement (400 sec^{-1} , c'est-à-dire environ 720 mPa) afin de dissocier totalement les agglutinats. Le cisaillement est alors stoppé et une brusque augmentation de la lumière rétrodiffusée correspondant à la désorientation des particules en suspension est enregistrée. Après l'arrêt du cisaillement, la suspension reste six minutes au repos. Cette période permet la production de collisions erratiques de globules rouges afin de favoriser la formation des agglutinats et d'atteindre l'équilibre de la réaction. Celle-ci se traduit alors par une diminution progressive de l'intensité lumineuse rétrodiffusée. Après cette période, la réaction est considérée comme complète et la remise en rotation du cylindre extérieur applique la contrainte initiale pendant une minute (temps considéré suffisant pour arriver à un « plateau » de dissociation maximale). Pendant cette période, les agglutinats sont dissociés et l'appareil enregistre l'intensité rétrodiffusée toutes les 10 ms (soit un total de 6000 lectures enregistrées par mesure).

▪ **Détermination des paramètres de dissociation**

L'estimation de l'énergie spécifique échangée pendant l'agglutination cellulaire, exprimée en termes de surface de contact à l'état agglutiné, peut être

approchée par la mesure de la variation de la lumière rétrodiffusée obtenue pendant la dissociation des agglutinats cellulaires. Skalak et col (Skalak et col, 1990), font une proposition générale sur la conservation de l'énergie dans le cas d'une augmentation ou diminution de l'aire d'adhésion entre les deux cellules : la dérivée du travail produit par unité de surface (dw/dt) pour une contrainte externe est proportionnelle à la variation de la surface de contact commune (ϕ_A) pendant le processus de séparation mécanique des cellules adhérees :

$$\frac{dw}{dt} \cong \gamma_e \cdot \frac{d\phi_A}{dt} \quad [2.10]$$

où γ_e est l'énergie spécifique adhésive de surface (en N/cm).

Les changements de l'aire de surface de contact sont liés à l'énergie fournie pour séparer les surfaces adhérees.

D'autre part il existe une corrélation entre l'intensité de la lumière rétrodiffusée et l'aire spécifique (par unité de volume) des particules en suspension (cellules et agglutinats). L'aire spécifique des surfaces adhérees des cellules (ϕ_A) peut être approchée par la différence entre les intensités de la lumière rétrodiffusée par les érythrocytes à l'état agglutiné et à l'état isolé.

$$\frac{\phi_A}{\phi_0} = 1 - \frac{\phi'}{\phi_0} = 1 - \frac{r'}{r_0} \quad [2.11]$$

où ϕ' et ϕ_0 sont les aires spécifiques des érythrocytes agglutinés et isolés respectivement et r' et r_0 les coefficients de réflexion diffuse ; toutes ces valeurs

sont fonction du temps (Snabre et col, 1987). Lorsque les globules rouges sont isolés (non-agglutinés), le coefficient de réflexion diffuse $r_0(t)$ prend une valeur constante qui se présente comme une ligne horizontale parallèle à l'axe du temps (abscisse). Lorsque les globules rouges agglutinés sont dissociés, $r'(t)$ varie avec le temps et donne une courbe (appelée courbe de dissociation, figure 19) qui peut être ajustée par une expression du type exponentielle :

$$r'(t) = r_0 \cdot \left[1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \right] \quad [2.12]$$

où τ représente un temps qui caractérise la vitesse d'augmentation de l'intensité rétrodiffusée. Le temps écoulé entre le commencement du processus de dissociation et le moment où 90 % de la dissociation totale des érythrocytes est atteinte, est appelé temps de dissociation (T_d).

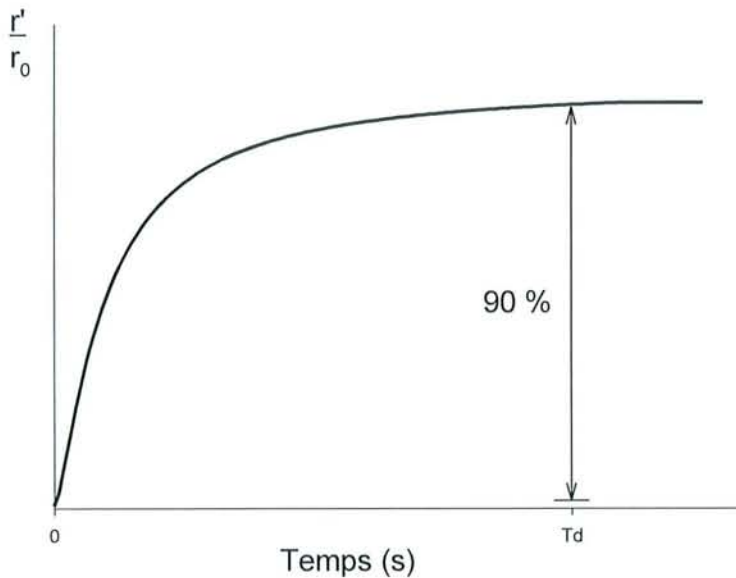


Figure 19 : Courbe de dissociation.

L'expression [2.12] peut être transformée, par régression logarithmique, en une droite dont la pente est M (égale à $-1/\tau$), laquelle est la droite de régression de la courbe de dissociation.

$$\ln \left(1 - \frac{r}{r_0}\right) = -\frac{t}{\tau} \quad [2.13]$$

Les agglutinats soumis à une contrainte de cisaillement constante sont dissociés progressivement, ce qui entraîne une diminution de l'aire de contact ϕ_A jusqu'à ce qu'elle devienne nulle (érythrocytes isolés). Ce processus dépendant du temps permet une approche de l'énergie dépensée par une intégration de la courbe de dissociation (réflexion diffuse en fonction du temps). L'aire comprise sous chaque courbe représente l'énergie restante (énergie qui n'a pas été dépensée dans le processus de dissociation), donc l'aire rapportée à l'échantillon non agglutiné (S_0) représente l'énergie totale fournie par l'appareil (figure 20).

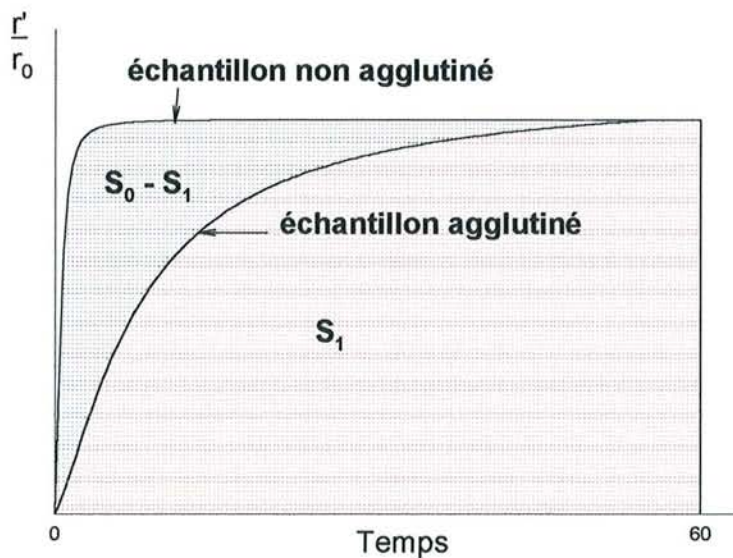


Figure 20 : Calcul de l'énergie relative E_D dépensée par la dissociation des agglutinats (d'après Rasia-Valverde et col, 1997).

Ainsi, le travail dépensé pour dissocier totalement les agglutinats érythrocytaires est proportionnel à l'aire \tilde{S} :

$$\tilde{S} = (S_0 - S_1) = \int (r_0 - r') \cdot dt = r_0 \cdot \int \left(1 - \frac{r'}{r_0}\right) \cdot dt \quad [2.14]$$

où S_1 représente l'énergie restant de la dissociation des agglutinats. Alors, on peut définir un paramètre non dimensionnel d'énergie de dissociation (E_D) qui peut être approché par :

$$E_D = \frac{S_0 - S_1}{S_0} = \frac{\int (r_0 - r') \cdot dt}{\int r_0 \cdot dt} \quad [2.15]$$

Lorsque la rotation du cylindre extérieur est arrêtée, les paramètres dynamiques de dissociation nous sont donnés :

M : Pente de la droite de régression logarithmique de la courbe de dissociation.

C'est la valeur inverse du temps caractéristique de dissociation τ .

B : Ordonnée à l'origine de la droite de régression logarithmique de la courbe de dissociation.

CC : Coefficient de corrélation de la régression logarithmique de la courbe de dissociation.

S₀ : Surface au-dessus de la courbe de dissociation de la suspension non-agglutinée.

S₁ : Surface au-dessus de la courbe de dissociation de la suspension agglutinée.

E_D : Paramètre d'énergie de dissociation.

T_d : Temps de dissociation final, correspondant au moment où le 90 % de la dissociation totale des agglutinats est atteinte.

PR : pente du commencement de la courbe de dissociation.

RESULTATS ET DISCUSSION

RESULTATS ET DISCUSSION

Le présent chapitre décrit et analyse les résultats obtenus dans notre étude expérimentale. Celle-ci porte sur la détermination de l'énergie d'adhésion des agglutinats de globules rouges de groupe sanguin A, induits par un anticorps monoclonal spécifique. Deux techniques rhéo-optiques différentes sont utilisées. Toutes deux utilisent une contrainte de cisaillement pour produire la dissociation des agglutinats, mais les mesures sont effectuées à des niveaux différents. Dans une première approche, les déterminations sont faites directement sur le doublet érythrocytaire (chambre de flux). Ainsi, une mesure précise du processus de la dissociation cellulaire est obtenue au niveau microscopique. Dans une seconde approche, les déterminations sont faites sur la suspension d'agglutinats, et donnent un résultat global et moyen du phénomène (érythroagrégamètre).

La première étape de notre travail avait pour but de déterminer l'énergie d'adhésion des agglutinats, par la technique de la chambre de flux parallèle. Les doublets, soumis à une contrainte de cisaillement, sont observés au microscope et les images prises sont enregistrées. L'analyse de ces images permet d'obtenir une mesure de l'énergie d'adhésion au niveau microscopique.

Dans une deuxième étape, notre but était d'évaluer au moyen de l'érythroagrégamètre l'énergie de dissociation par la mesure du flux lumineux rétrodiffusé par des agglutinats en suspension. Ceux-ci sont soumis à une

contrainte de cisaillement constante dans l'entrefer d'un viscosimètre du type Couette. Ces travaux succèdent à ceux de Donner (Donner et col, 1988b) et Rasia (Rasia et col, 1996, 1997), qui avaient déjà utilisé cette technique dans notre laboratoire. Leurs études portaient sur l'agrégation érythrocytaire et l'agglutination induite par des lectines et par des anticorps aussi bien polyclonaux que monoclonaux.

Finalement, les résultats obtenus par les deux méthodes d'approche du phénomène de dissociation cellulaire (approche globale et approche microscopique) seront comparés.

I. APPROCHE MICROSCOPIQUE. CHAMBRE DE FLUX

Dans cette partie de notre travail expérimental, nous nous proposons de déterminer l'énergie d'adhésion intercellulaire d'un doublet (agglutinat de deux cellules) soumis à une contrainte de cisaillement variable contrôlée.

Il faut tout d'abord préciser que nous avons réalisé des essais préliminaires en vue de contrôler la spécificité de l'anticorps. Dans ce but, des globules rouges des groupes sanguins B et O ont été utilisés dans les conditions expérimentales établies. Les observations microscopiques de ces suspensions à l'intérieur de la chambre de flux n'ont pas montré la présence d'agglutinats, mais uniquement la formation d'une monocouche due à la sédimentation des érythrocytes (Lavalle et col, 1996).

Détermination de la contrainte de cisaillement σ_{50}

Contrairement à ce qui a été observé au cours des contrôles précédemment décrits, les observations microscopiques des suspensions des globules rouges A_1 et A_2 ont montré la présence d'agglutinats de différentes tailles (nombre variable d'érythrocytes) induits par l'anticorps monoclonal. Parmi eux, les agglutinats de deux cellules dont la cellule inférieure adhère à la lamelle inférieure du microcanal, ont été choisis pour l'étude de dissociation

dans l'écoulement. De ce fait, les dilutions d'anticorps ont été choisies de façon à obtenir ces agglutinats de deux cellules. Etant donné que la quantité de déterminants antigéniques des globules rouges A_1 et A_2 n'est pas la même (cf. page 53), les dilutions ont été différentes pour chaque groupe sanguin : de 1/1000 à 1/1600 pour les érythrocytes A_1 (environ 1×10^6 déterminants antigéniques par cellule) et de 1/400 à 1/600 pour les érythrocytes A_2 (environ 3×10^5 déterminants antigéniques par cellule). Des dilutions plus élevées entraînaient une non-formation d'agglutinats, tandis que des dilutions moins élevées entraînaient la formation d'agglutinats de plus grande taille, sans possibilité de trouver des doublets.

Les globules rouges et les agglutinats sédimentés adhèrent d'une façon presque irréversible à la surface de la lamelle inférieure du microcanal. Nous avons constaté qu'ils restent toujours adhérents par une petite aire de contact malgré les importantes contraintes mécaniques appliquées (jusqu'à 150 mPa). Ceci est en accord avec les travaux de Tromler (Tromler et col, 1985) et Xia (Xia et col, 1993).

La transparence de la chambre de flux et l'utilisation d'un microscope inversé ont rendu possible l'observation du processus de dissociation des doublets sous contrainte de cisaillement. Cette contrainte agit de façon parallèle à l'interface du doublet en produisant leur dissociation. Lors de l'application du flux, l'érythrocyte du dessus du doublet est partiellement détaché de l'érythrocyte du dessous, lequel reste adhérent à la surface inférieure du microcanal (figure 21). Par conséquent, l'aire d'adhésion initiale (ou aire de

contact) entre les deux cellules décroît selon un pourcentage (% de séparation, cf. page 95).

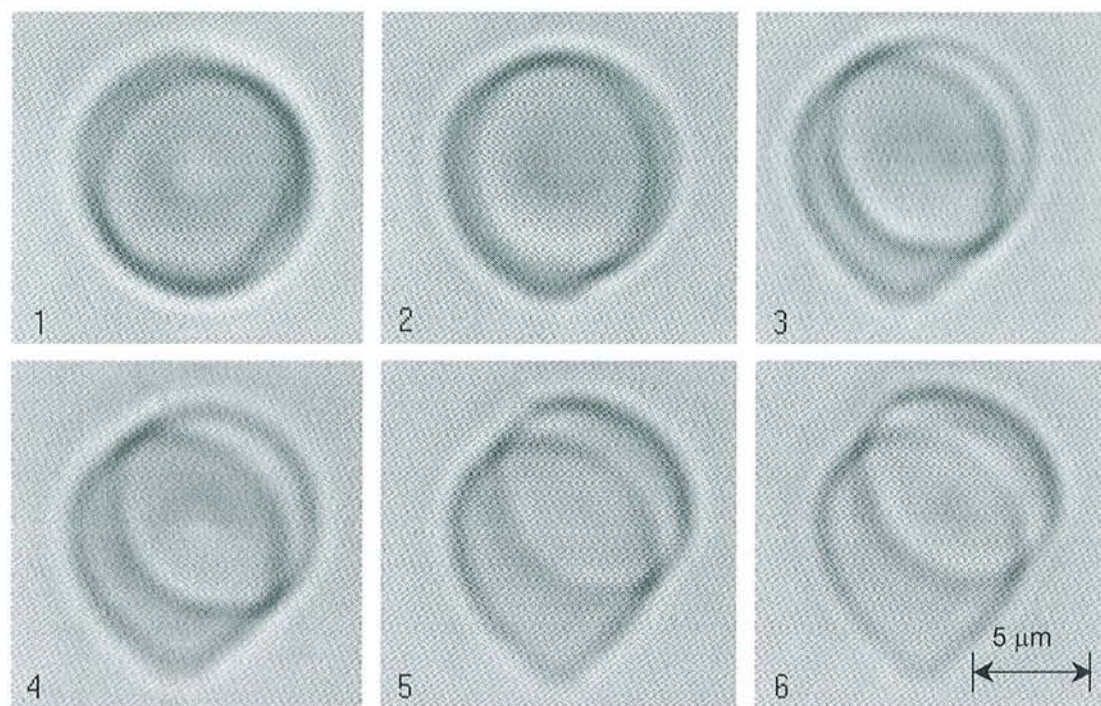


Figure 21 : Images acquises au microscope optique d'un doublet soumis à différentes contraintes de cisaillement σ : 1) $\sigma = 0$ mPa, 2) $\sigma = 4,8$ mPa, 3) $\sigma = 13,2$ mPa, 4) $\sigma = 35,4$ mPa, 5) $\sigma = 63,2$ mPa et 6) $\sigma = 96,5$ mPa (objectif x 60).

Les figures 22 et 23 représentent les courbes issues de calcul d'approximation non-linéaire des résultats expérimentaux de pourcentage de séparation mesuré en fonction de la contrainte de cisaillement agissant respectivement sur les doublets de globules rouges A_1 et A_2 .

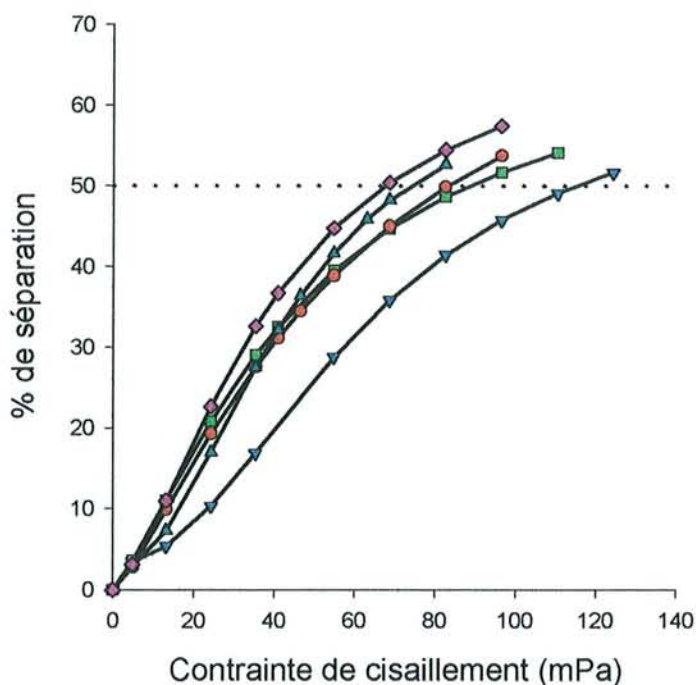


Figure 22 : Courbes issues de calcul d'approximation non-linéaire de pourcentage de séparation des doublets de groupe A_1 en réponse à la contrainte de cisaillement. Les dilutions d'anticorps utilisées sont les suivantes : \blacktriangledown 1/1000 ($n = 8$), \blacksquare 1/1200 ($n = 8$), \bullet 1/1400 ($n = 10$), \blacktriangle 1/1500 ($n = 8$) et \blacklozenge 1/1600 ($n = 8$).

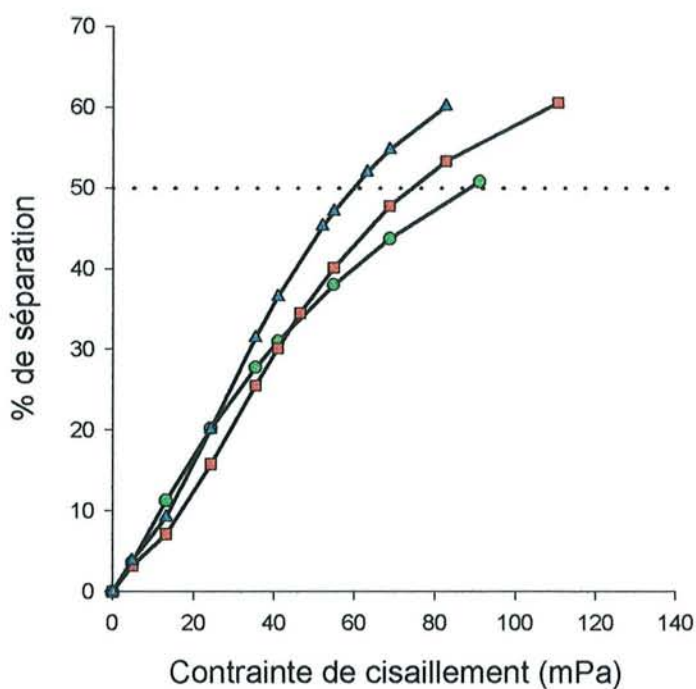


Figure 23 : Courbes issues de calcul d'approximation non-linéaire de pourcentage de séparation des doublets de groupe A_2 en réponse à la contrainte de cisaillement. Les dilutions d'anticorps utilisées sont les suivantes : \bullet 1/400 ($n = 4$), \blacksquare 1/500 ($n = 4$) et \blacktriangle 1/600 ($n = 5$).

Lorsque la contrainte de cisaillement augmente, la zone d'adhésion entre les deux cellules diminue progressivement et l'aire de séparation augmente. Les courbes sigmoïdales présentent une pente qui diminue progressivement au fur et à mesure que la contrainte de cisaillement augmente. Cette évolution montre que la vitesse de séparation diminue en même temps que la contrainte de cisaillement augmente (Skalak et col, 1981, 1990).

À partir de ces résultats, nous avons déterminé la contrainte de cisaillement (σ_{50}) nécessaire pour produire une séparation de 50 % de l'aire d'adhésion entre les deux érythrocytes du doublet. Les valeurs de σ_{50} pour chaque dilution de l'anticorps sont présentées dans le tableau IV :

Tableau IV : Valeurs de σ_{50} pour les globules rouges A₁ et A₂.

GR	Dilution	Nombre d'expériences	σ_{50} * (mPa)
A ₁	1 / 1000	8	115,25 ± 28,09 ^a
	1 / 1200	8	88,43 ± 18,13 ^b
	1 / 1400	10	83,22 ± 18,95 ^c
	1 / 1500	8	73,85 ± 17,10 ^c
	1 / 1600	8	67,57 ± 16,14 ^d
A ₂	1 / 400	4	88,25 ± 10,01 ^a
	1 / 500	4	73,82 ± 5,06 ^a
	1 / 600	5	59,64 ± 8,14 ^a

*Moyenne ± écart type.

Limite de signification de la distribution de Student : ^a p < 0,05 par comparaison aux autres dilutions; ^b p < 0,05 par comparaison à 1/1000 et 1/1600); ^c p < 0,05 par comparaison à 1/1000; ^d p < 0,05 en comparaison à 1/1000 et 1/1200).

Dans le cas des globules rouges A_2 les contraintes de cisaillement σ_{50} présentent des différences significatives ($p < 0,05$) pour chaque dilution. Tandis que pour les globules rouges A_1 les σ_{50} présentent des différences significatives entre les dilutions 1/1000 et les autres dilutions et entre 1/1200 et 1/1600. Cette technique ne permet donc pas de mettre en évidence des faibles différences en concentration d'anticorps surtout à des basses dilutions.

Par ailleurs, les valeurs de σ_{50} sont du même ordre de grandeur pour les deux sous-groupes de globules rouges (A_1 et A_2), mais avec des dilutions de l'anticorps totalement différentes. Trois fois plus d'anticorps sont nécessaires, pour une même contrainte de cisaillement, pour séparer les doublets A_2 comparativement aux doublets A_1 . Ceci est en accord avec la différence de densité antigénique de ces deux sous-groupes sanguins. En effet, les globules rouges A_1 présentent environ 1×10^6 molécules antigéniques à leur surface, alors que les globules rouges A_2 en ont trois fois moins (environ 3×10^5 molécules).

Ces expériences ont été effectuées pour des agglutinats ayant différents niveaux de densité en anticorps sur la membrane cellulaire. Nous avons estimé la densité en anticorps (D , en molécules/ μm^2) sur la membrane des érythrocytes à partir de l'équation (Sung et col, 1985) :

$$D = \frac{B \cdot N}{PM \cdot N_c \cdot A_c} \quad [3.1]$$

où B est la concentration d'anticorps fixés (en ng/ml) déterminée par une technique ELISA de type sandwich (cf. page 85), PM est le poids moléculaire

de l'anticorps (150 kDa), N est le nombre d'Avogadro ($6,02 \times 10^{23}$ molécules/mol), N_c est la concentration de globules rouges dans la suspension ($5,07 \times 10^6$ GR/ml), et A_c est l'aire de la membrane érythrocytaire ($\cong 150 \mu\text{m}^2$). Les valeurs de D caractérisant les globules rouges A_1 sont réunies dans le tableau V :

Remarque : Cette étude a été réalisée uniquement sur des globules rouges de groupe A_1 . Il a été impossible de faire cette étude sur les globules rouges A_2 en raison du faible nombre d'échantillons de ce sous-groupe.

Tableau V : Densité en anticorps sur la membrane estimée pour les globules rouges A_1 .

Dilution	[Mab] fixé* (ng/ml)	D^* (10^{-2} molécules/ μm^2)
1 / 1000	$10,34 \pm 0,41$	5451 ± 216
1 / 1200	$7,70 \pm 0,32$	4059 ± 169
1 / 1400	$7,20 \pm 0,51$	3796 ± 269
1 / 1500	$6,40 \pm 0,48$	3374 ± 253
1 / 1600	$5,17 \pm 0,77$	2726 ± 406

*Moyenne \pm écart type de 2 expériences.

Au fur et à mesure que la densité en molécules d'anticorps augmente à la surface du globule rouge, la contrainte de cisaillement (σ_{50}) nécessaire pour obtenir 50 % de l'aire d'adhésion au niveau du doublet augmente également (figure 24). Une corrélation significative existe entre ces deux paramètres ($r = 0,987$).

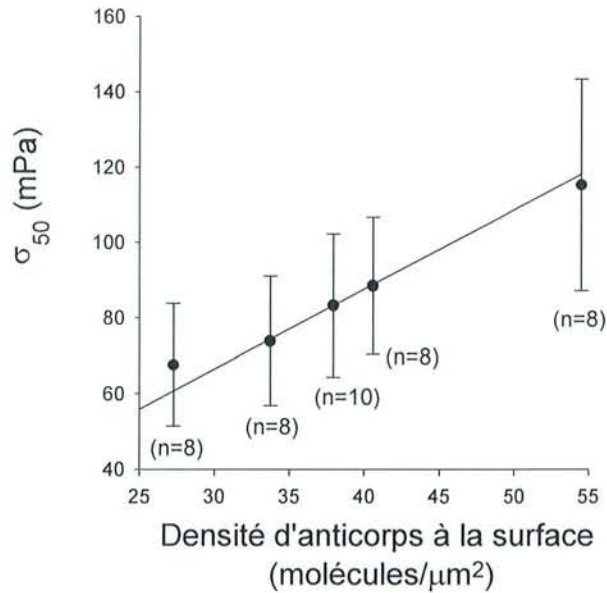


Figure 24 : Relation entre la densité des molécules d'anticorps à la surface érythrocytaire et σ_{50} pour des érythrocytes A₁ ($r = 0,987$).

Détermination de l'énergie de dissociation

En considérant que l'énergie de dissociation γ_d (en N/cm) peut être déterminée à partir du travail effectué par la contrainte de cisaillement (cf. page 96), nous avons utilisé l'équation [2.9] proposée par Sung et col (Sung et col, 1985) pour la calculer à partir de la détermination expérimentale de la contrainte de cisaillement σ_{50} .

Les valeurs de γ_d des doublets, pour différentes densités d'anticorps, sont rassemblées dans le tableau VI.

Tableau VI : Valeurs de γ_d pour les globules rouges A₁.

GR	D * (10 ⁻² molécules/ μ m ²)	γ_d * (10 ⁻⁹ N/cm)
A ₁	5451 ± 216	4,61 ± 1,12
	4059 ± 169	3,54 ± 0,73
	3796 ± 269	3,33 ± 0,76
	3374 ± 253	2,95 ± 0,68
	2726 ± 406	2,70 ± 0,65

*Moyenne ± écart type.

Il existe une corrélation directe entre γ_d et D ($r = 0,987$). Nous avons obtenu un rapport γ_d / D de $8,92 \pm 0,50 \times 10^{-19}$ N.cm par molécule d'anticorps, valeur qui représente l'énergie impliquée dans la liaison antigène-anticorps.

II. APPROCHE GLOBALE. ERYTHROAGREGAMETRE

Dans cette partie, nous évaluerons l'énergie de dissociation des agglutinats induits par l'anticorps monoclonal sur des échantillons soumis à une contrainte de cisaillement constante dans l'entrefer d'un viscosimètre transparent du type Couette, par rétrodiffusion laser.

Bien que l'érythroagrégamètre fournisse des paramètres cinétiques et structuraux de la dissociation des agglutinats (cf. page 104), nous avons choisi les paramètres dynamiques permettant de quantifier au mieux et de manière reproductible le phénomène de la dissociation érythrocytaire. De ce fait, nous avons retenu le temps de dissociation final (T_d), le temps caractéristique de dissociation (τ) et le paramètre d'énergie de dissociation (E_D) pour analyser ce phénomène.

Des résultats préliminaires nous ont permis de valider la méthode, pour notre protocole expérimental. À partir des résultats obtenus sur 10 aliquotes de deux échantillons de différents sous-groupes A, nous avons pu déterminer la précision et la sensibilité de la méthode.

Evaluation de la précision de l'appareil

Nous avons évalué la précision de l'appareil par le calcul du coefficient de variation sur 10 déterminations intra-essais réalisées sur des aliquotes d'échantillons de sang d'un donneur sain de groupe A₁. Ces déterminations sont réalisées à chacune des quatre dilutions de l'anticorps (1/8, 1/16, 1/32 et 1/64). Pour chaque dilution de l'anticorps sont calculés la moyenne (Mo), l'écart-type (ET) et le coefficient de variation (CV) correspondants aux principaux paramètres dynamiques de dissociation : T_d, τ et E_D. Les résultats sont présentés dans le tableau VII :

Tableau VII : Résultats statistiques des paramètres de dissociation.

Dilution	T _d (s)		τ (s)		E _D	
	Mo ± ET	CV (%)	Mo ± ET	CV (%)	Mo ± ET	CV (%)
1 / 8	12,42 ± 0,59	4,75	1,55 ± 0,10	6,45	70,31 ± 3,02	4,29
1 / 16	6,21 ± 0,33	5,31	1,18 ± 0,08	6,78	49,79 ± 1,87	3,75
1 / 32	3,77 ± 0,19	5,04	0,93 ± 0,07	7,52	33,07 ± 1,23	3,72
1 / 64	1,59 ± 0,08	5,03	0,74 ± 0,04	5,40	18,26 ± 0,76	4,16
Mo ± ET	-	5,03 ± 0,20	-	6,54 ± 0,76	-	3,98 ± 0,25

Nombre d'expériences = 10 ; Mo : moyenne ; ET : écart type ; CV : coefficient de variation

Ces résultats statistiques montrent les différents comportements des paramètres de dissociation. E_D présente la valeur du coefficient de variation la moins élevée, ce qui rend ce paramètre le moins variable, tandis que τ présente la valeur la plus élevée. Cependant, ces trois paramètres présentent des coefficients de variations inférieures à celles d'un auto-analyseur avec des CV

qui varient entre 12 et 17,5 % (Ropars et col, 1981). De ce fait, nous pouvons dire que la méthode présente une précision importante et peut être utilisée dans notre étude avec confiance.

Evaluation de la sensibilité de la méthode

Pour évaluer la sensibilité de la méthode de dissociation, nous avons choisi des globules rouges de deux sous-groupe A différents. Ces sous-groupes présentent des densités antigéniques nettement distinctes, ainsi qu'on l'a déjà montré (cf. page 54) et donc une intensité d'agglutination différente. Les érythrocytes A_1 ont environ 1×10^6 molécules d'antigène par globule rouge (forte agglutination), tandis que les A_3 ont, en moyenne, 3×10^4 molécules d'antigène exprimées d'une façon hétérogène sur les érythrocytes chez un même individu. Ils présentent une agglutination faible en double population (Salmon et col, 1991). Ces derniers présentent un pourcentage d'agglutination face à des anticorps anti-A qui est de 63 ± 10 %, comparativement aux 95 ± 3 % calculé pour des globules rouges A_1 . En raison de la basse fréquence du phénotype A_3 (de l'ordre de 0,06 % des phénotypes A), il était très difficile d'obtenir des échantillons de ce groupe. Nous avons alors préparé un modèle biologique correspondant aux conditions d'agglutination relatives à ces érythrocytes. Pour cela, nous avons mélangé des globules rouges de groupe O et A_1 dans les proportions 40-60 % respectivement. Tous les essais sont faits à la même dilution de l'anticorps (1/8). La différence normalisée (DN) pour les paramètres T_d , τ et E_D de 10 essais de chaque échantillon est calculée selon l'équation :

$$DN = \frac{\text{différence des moyennes}}{\text{moyenne des écart - types}} = \frac{2.(M_1 - M_2)}{(ET_1 + ET_2)} \quad [3.5]$$

Selon Stuart et col (Stuart et col, 1989), la différence normalisée est une valeur utile pour mesurer la puissance d'un paramètre dans la détection des différences entre deux groupes de déterminations. La DN obtenue sur une quantité suffisante d'échantillons et avec un niveau statistique de signification, est directement proportionnelle à la puissance du paramètre et à la probabilité de détecter des différences entre les groupes. Plus la DN est grande, plus il y a de probabilité de détecter une différence. Les résultats obtenus pour les paramètres dynamiques de dissociation sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau VIII : Valeurs de la différence normalisée pour les paramètres de dissociation.

Paramètres	A ₁	Modèle A ₃	DN
T _d (s)	12,42 ± 0,59	10,21 ± 0,63*	3,62
τ (s)	1,55 ± 0,10	1,24 ± 0,09*	3,26
E _D	70,31 ± 3,02	56,42 ± 3,10*	4,54

Moyenne ± écart type de 10 expériences; DN : différence normalisée.

*Limite de signification de la distribution de Student : p < 0,05 par comparaison à A₁

Ces trois paramètres présentent une sensibilité différente face à la même différence de capacité d'agglutination. Le paramètre d'énergie E_D présente la valeur de DN plus élevée, la probabilité de détecter des différences significatives entre les groupes sera plus importante.

En considérant les valeurs de la différence normalisée et du coefficient de variation, le paramètre E_D (DN plus élevée et CV plus petit entre les trois paramètres déterminés) se révèle comme le plus approprié pour la détermination de la puissance d'adhésion cellulaire.

Détermination des paramètres dynamiques de dissociation

Nous avons déterminé les paramètres de dissociation sur des échantillons d'érythrocytes de différents groupes et sous-groupes ABO en présence de l'anticorps monoclonal anti-A. Pour cela, des globules rouges A_1 ($n = 30$), A_2 ($n = 8$) et A_1B ($n = 7$) sont utilisés dans une solution PBS-Dx à hématocrite 35 %, avec des dilutions géométriques de raison deux de l'anticorps monoclonal (de 1/8 à 1/128). Les dilutions de l'anticorps sont choisies de manière à obtenir des conditions expérimentales dans les limites de détection de l'appareil. Les solutions d'anticorps plus concentrées (dilution $> 1/8$) entraînent la formation d'agglutinats de grande taille. Ces agglutinats ne sont pas totalement dissociés par la contrainte de cisaillement appliquée. La dissociation totale n'est pas atteinte, et le calcul des paramètres effectué par l'appareil est donc incorrect. Les solutions d'anticorps plus diluées (dilution $< 1/128$) entraînent la formation de petits agglutinats qui donnent des résultats dans les limites de détection de l'appareil.

Les contrôles sont réalisés sur des globules rouges de groupe B ($n = 10$) et O ($n = 10$) resuspendus dans la même solution et avec les mêmes dilutions de l'anticorps. Nous avons fait également un contrôle de chaque échantillon

utilisé, en resuspendant les érythrocytes dans la solution PBS-Dx sans anticorps. Ce contrôle permet d'évaluer l'agrégation non-spécifique produite par le Dextran 70 sur les globules rouges. Les résultats sont présentés sur les figures 25 (T_d), 26 (τ) et 27 (E_D). Une échelle double logarithmique est adoptée car elle permet de faire une comparaison simple des droites de régressions linéaires. Les droites horizontales représentent la moyenne et l'écart type des mesures obtenues pour les échantillons resuspendus dans du PBS-Dx sans anticorps.

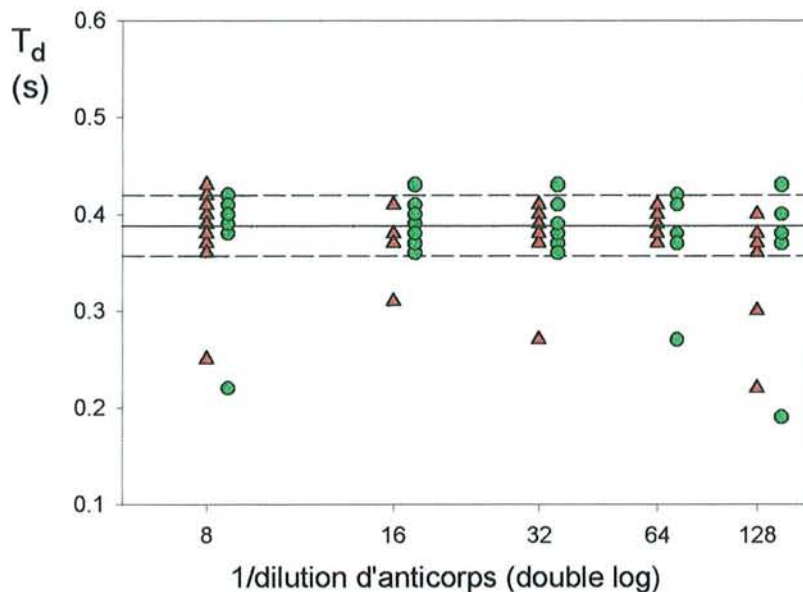


Figure 25 : Temps de dissociation final (T_d) pour les globules rouges O (▲, $n = 10$) et B (●, $n = 10$) en présence de différentes dilutions de l'anticorps. Les droites horizontales représentent la moyenne (—) et l'écart type (--) des contrôles sans anticorps.

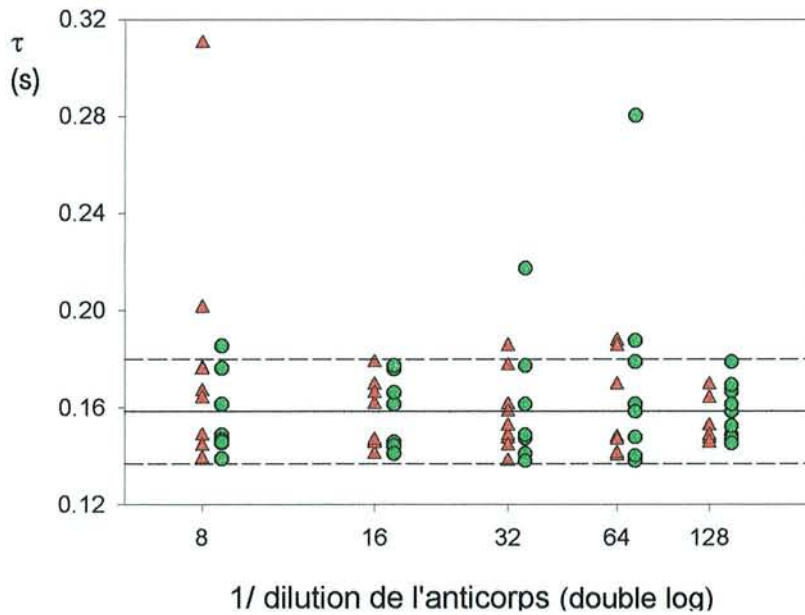


Figure 26 : Temps caractéristique de dissociation (τ) pour les globules rouges O (\blacktriangle , $n = 10$) et B (\bullet , $n = 10$) en présence de différentes dilutions de l'anticorps. Les droites horizontales représentent la moyenne (—) et l'écart type (--) des contrôles sans anticorps.

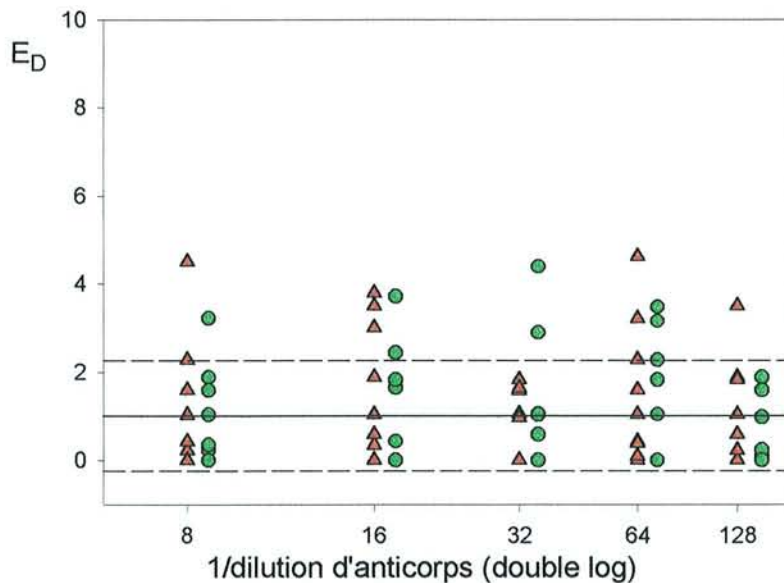


Figure 27 : Paramètre d'énergie de dissociation (E_D) pour les globules rouges O (\blacktriangle , $n = 10$) et B (\bullet , $n = 10$) en présence de différentes dilutions de l'anticorps. Les droites horizontales représentent la moyenne (—) et l'écart type (--) des contrôles sans anticorps.

Les valeurs obtenues pour les échantillons O et B avec les différentes dilutions de l'anticorps n'ont pas montré des différences significatives ($p > 0,05$) par rapport aux valeurs obtenues avec les échantillons de tous les groupes et sous-groupes sanguins resuspendus dans du PBS-Dx sans anticorps. Aucune variation en relation avec la dilution de l'anticorps n'a été montrée. Ces résultats de contrôles confirment la spécificité de l'anticorps par l'antigène A du groupe sanguin ABO, étant donné que cet anticorps ne réagit pas et ne produit pas d'agglutination d'érythrocytes ne portant pas ces antigènes de surface. Ils montrent également, que la capacité agrégante du Dextran 70 à 4,1 % sur les globules rouges peut être considérée comme négligeable.

Les déterminations faites avec les globules rouges A_1 , A_2 et A_1B ont montré un fort degré d'agglutination lorsque nous les avons comparé aux contrôles menés avec des érythrocytes O et B (agrégation négligeable et non-agglutination). De plus, il existe une corrélation significative entre la dilution de l'anticorps et les paramètres de dissociation ($r \geq 0,983$). Lorsque la concentration de l'anticorps augmente, les paramètres de dissociation augmentent progressivement. Ces résultats sont présentés dans les figures 28 (T_d), 29 (τ) et 30 (E_D).

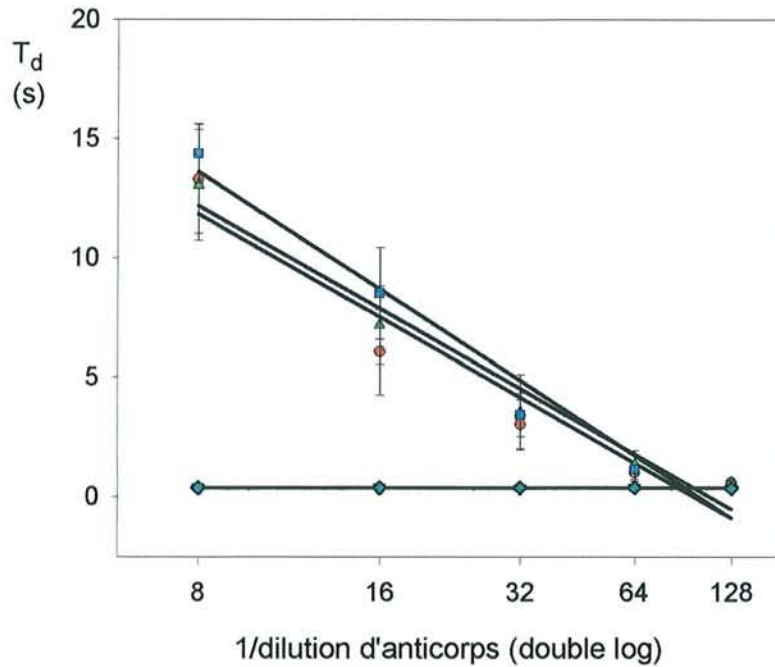


Figure 28 : Temps de dissociation final (T_d) en fonction de la dilution de l'anticorps (moyenne \pm écart type). Les droites de régression linéaire correspondent aux différents groupes sanguins : \blacktriangle A_1 ($n = 30$, $r = 0,952$), \bullet A_2 ($n = 8$, $r = 0,919$), \blacksquare A_1B ($n = 7$, $r = 0,956$), \blacktriangledown O ($n = 10$) et \blacklozenge B ($n = 10$).

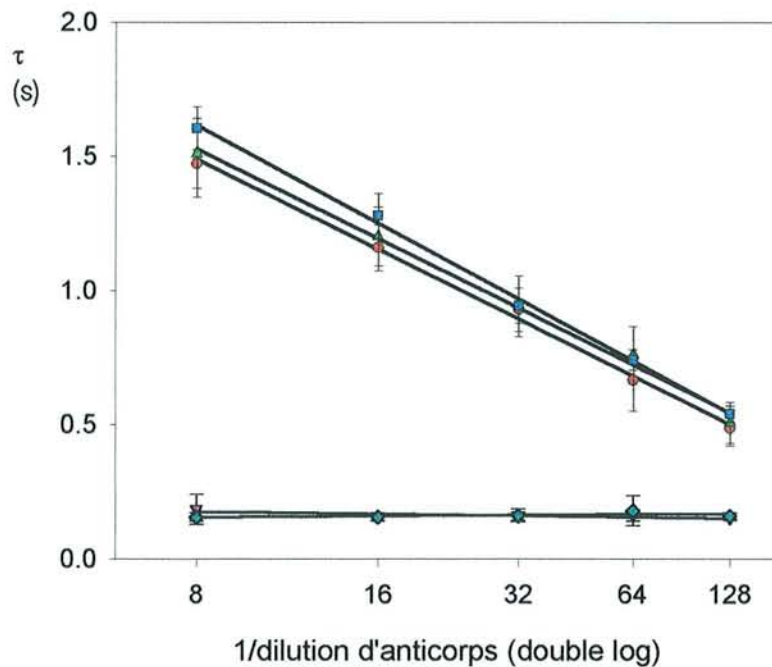


Figure 29 : Temps caractéristique de dissociation (τ) en fonction de la dilution de l'anticorps (moyenne \pm écart type). Les droites de régression linéaire correspondent aux différents groupes sanguins: \blacktriangle A_1 ($n = 30$; $r = 0,991$), \bullet A_2 ($n = 8$; $r = 0,989$), \blacksquare A_1B ($n = 7$; $r = 0,996$), \blacktriangledown O ($n = 10$) et \blacklozenge B ($n = 10$).

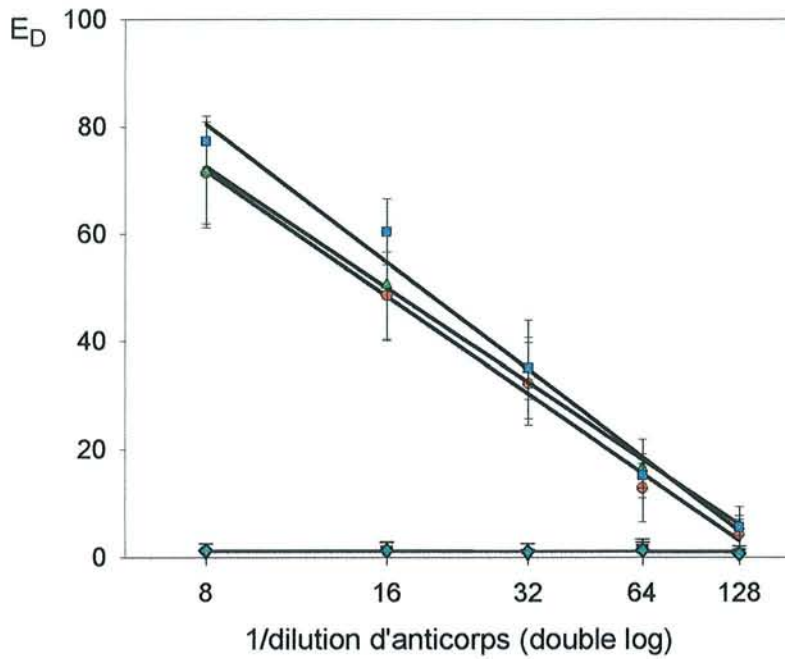


Figure 30 : Paramètre d'énergie de dissociation (E_D) en fonction de la dilution de l'anticorps (moyenne \pm écart type). Les droites de régression linéaire correspondent aux différents groupes sanguins: \blacktriangle A₁ (n = 30 ; r = 0,988), \bullet A₂ (n = 8 ; r = 0,989), \blacksquare A₁B (n = 7 ; r = 0,983), \blacktriangledown O (n = 10) et \blacklozenge B (n = 10).

Les paramètres des droites de régressions linéaires ont été calculés à partir des graphiques et sont présentés dans le tableau IX.

Tableau IX : Paramètres de régressions linéaires calculés à partir des graphiques.

Paramètre	Globules rouges	Ordonnée à l'origine*	Pente*	Coeff. Régression*
T_d (s)	A_1B^a	$51,24 \pm 5,61^e$	$-3,94 \pm 0,41^e$	$0,956 \pm 0,016$
	A_1^b	$45,54 \pm 7,80^e$	$-3,48 \pm 0,56^e$	$0,952 \pm 0,036$
	A_2^c	$44,90 \pm 8,26^e$	$-3,46 \pm 0,62^e$	$0,919 \pm 0,034$
	O ^d	$0,42 \pm 0,10$	$-2 \times 10^{-3} \pm 0,008$	-
	B ^d	$0,39 \pm 0,08$	$-1 \times 10^{-3} \pm 0,39$	-
τ (s)	A_1B	$4,41 \pm 0,24^f$	$-0,29 \pm 0,01^f$	$0,996 \pm 0,002$
	A_1	$4,08 \pm 0,25^g$	$-0,27 \pm 0,01^g$	$0,991 \pm 0,009$
	A_2	$4,00 \pm 0,21^g$	$-0,26 \pm 0,01^g$	$0,989 \pm 0,006$
	O	$0,24 \pm 0,15$	$-6 \times 10^{-3} \pm 0,01$	-
	B	$0,12 \pm 0,04$	$3 \times 10^{-3} \pm 0,005$	-
E_D	A_1B	$276,88 \pm 11,73^f$	$-20,55 \pm 0,65^f$	$0,983 \pm 0,008$
	A_1	$245,33 \pm 33,45^g$	$-18,07 \pm 2,27^g$	$0,988 \pm 0,006$
	A_2	$244,90 \pm 23,81^g$	$-18,24 \pm 1,50^g$	$0,989 \pm 0,005$
	O	$1,26 \pm 2,20$	$0,01 \pm 0,09$	-
	B	$3,36 \pm 2,34$	$-0,16 \pm 0,12$	-

*Moyenne \pm écart type ; ^an = 7, ^bn = 30, ^cn = 8, ^dn = 10 ;
 Limite de signification de la distribution de Student : ^ep > 0,05 ; ^fp < 0,05 par comparaison à A_1 et A_2 ; ^gp < 0,05 par comparaison à A_1B .

Lorsque nous analysons les régressions linéaires pour les globules rouges A_1 et A_2 des trois paramètres de dissociation, nous n'observons aucune différence significative ($p > 0,05$) entre les pentes et les ordonnées à l'origine des ces deux sous-groupes. Par contre, la pente et l'ordonnée à l'origine des régressions de τ et E_D pour les globules rouges A_1B , présentent une différence significative ($p < 0,05$) par rapport aux autres groupes. Ces résultats de A_1B ne coïncident pas avec ceux obtenus par Rasia et col. (sous presse) avec des

anticorps monoclonaux spécifiques de groupes sanguins A (anti-A P47-2) et B (anti-B P47-4B6). Ces auteurs n'ont pas trouvé de différences significatives entre les droites de régressions obtenues pour les globules rouges A₁ et A₁B face à l'anticorps anti-A, ainsi que pour les globules rouges B et A₁B face à l'anticorps anti-B.

Détermination de l'énergie de dissociation

Les expériences de dissociation des agglutinats par contrainte de cisaillement ont été effectuées avec des échantillons présentant différents niveaux de densité d'anticorps sur la membrane érythrocytaire. À partir d'une technique ELISA de type sandwich, nous avons estimé la concentration en anticorps fixé sur les globules rouges A₁, dans les conditions expérimentales définies ci-dessus (cf. page 86). Une fois la concentration connue, la densité en anticorps (D , en molécules/ μm^2) sur la membrane des érythrocytes peut être estimée à partir de l'équation 3.1 (cf. page 114). Les valeurs obtenues sont rassemblées dans le tableau X.

Tableau X : Estimation de la densité en anticorps à la surface des globules rouges de groupe A₁.

Dilution	[Mab] fixé* (ng/ml)	D^* (10^{-2} molécules/ μm^2)
1 / 8	1926,5 ± 15,3	1440 ± 11
1 / 16	922,2 ± 14,7	689 ± 11
1 / 32	516,6 ± 10,1	386 ± 7
1 / 64	226,1 ± 7,8	169 ± 6
1 / 128	103,6 ± 8,6	77 ± 6

*Moyenne ± écart type de 2 expériences.

A partir de la détermination expérimentale du paramètre d'énergie de dissociation (E_D), nous avons estimé l'énergie spécifique d'adhésion (γ_e) pour la réaction antigène-anticorps.

Au fur et à mesure de l'augmentation de la contrainte de cisaillement dans un flux laminaire, les cellules externes constitutives des agglutinats sont séparées par le flux comme s'il s'agissait de rubans adhésifs. La théorie de Derjaguin (Derjaguin et col, 1975) met en rapport la force de rupture F_E avec l'énergie spécifique d'adhésion de surface (γ) et le rayon moyen de courbure (R_C) de la membrane impliquée dans l'adhésion un instant avant la rupture de l'adhésion. La séparation totale est réussie au moment où la contrainte de cisaillement, agissant sur l'aire superficielle des agglutinats (A_0), atteint la valeur critique σ_E (contrainte de cisaillement critique) :

$$F_E = 2\pi \cdot R_c \cdot \gamma = \sigma_E \cdot A_0 \quad [3.6]$$

Par conséquent, l'énergie spécifique de surface (γ_e), qui maintient les globules rouges adhérents dans l'agglutinat peut être calculée à partir des données expérimentales obtenues dans un flux de type Couette, en utilisant l'équation de Derjaguin :

$$\gamma_e = \psi \cdot \frac{A_0 \cdot \sigma_E}{2\pi \cdot R_C} \quad [3.7]$$

où ψ est le coefficient de réglage, en relation avec l'orientation aléatoire et la forme des agglutinats, dans un flux de cisaillement critique. On peut donc écrire :

$$\sigma_E = E_D \cdot \sigma \quad [3.8]$$

où σ est la contrainte de cisaillement (en mPa) appliquée par l'appareil. Finalement,

$$\gamma_e = \psi \cdot \frac{A_0 \cdot \sigma}{2\pi \cdot R_c} \cdot E_D \quad [3.9]$$

équation qui exprime l'énergie spécifique de surface d'adhésion, appelée aussi énergie de fracture (Snabre et col, 1987).

A partir des résultats obtenus avec la chambre de flux, nous avons estimé l'énergie de dissociation (γ_e , en N/cm) correspondant à la densité (D, en molécules/ μm^2) des molécules d'anticorps sur la membrane érythrocytaire dans les conditions expérimentales de l'érythroagrégamètre. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau XI.

Tableau XI : Energie de dissociation estimée pour les érythrocytes A₁ à différentes dilutions de l'anticorps.

D ^{*a} (10 ⁻² molécules/ μm^2)	E _D ^{* b}	γ_e (10 ⁻⁹ N/cm)
1440 ± 11	71,55 ± 10,38	1,258
689 ± 11	50,55 ± 10,33	0,602
386 ± 7	34,87 ± 9,14	0,337
169 ± 6	16,49 ± 5,39	0,148
77 ± 6	5,79 ± 1,94	0,067

^an = 2 ; ^bn = 30, r = 0,828 entre D et E_D

*Moyenne ± écart type

Si on considère que $R_c \cong 10^{-4}$ cm, $A_0 \cong 50 \times 10^{-8}$ cm² (Snabre et col, 1987), $\sigma \cong 720$ mPa, la valeur de ψ peut être alors déterminée. Nous avons obtenu une valeur égale à $2,08 \times 10^{-4}$.

A partir de ces valeurs, nous avons estimé que l'énergie de dissociation est égale à $8,73 \times 10^{-19}$ N.cm par molécule d'anticorps, résultat qui met en évidence la sensibilité et la faisabilité de la méthode pour la détermination de l'énergie de liaison intercellulaire.

III. DISCUSSION

Nous avons déterminé l'énergie impliquée dans le processus de dissociation cellulaire à l'aide de deux approches différentes. Toutes deux sont des méthodes non invasives. Elles permettent la détermination de phénomènes réversibles, telle l'agglutination immunologique. Nous avons utilisé des agglutinats érythrocytaires induits par un anticorps monoclonal comme modèle expérimental d'interaction cellulaire spécifique. Une contrainte de cisaillement est utilisée dans ces deux techniques pour produire la dissociation cellulaire. Dans la chambre de flux, cette contrainte agit de façon parallèle à l'interface du doublet fixé à la surface inférieure du microcanal. Elle produit le détachement progressif de la cellule du dessus du doublet. L'observation de la séparation produite sur un agglutinat isolé nous a permis de déterminer la relation entre la

contrainte de cisaillement appliquée (σ) et le pourcentage de séparation des cellules du doublet. A partir de ces résultats nous avons calculé l'énergie de dissociation (γ_d) impliquée dans ce processus. Les résultats sont obtenus avec précision et au niveau microscopique, mais la grande variation de conditions expérimentales (points de fixation de la cellule de dessous à la lamelle, emplacement des agglutinats proches, choix des doublets pour l'observation microscopique, collisions avec des agglutinats décrochés de la lamelle) affecte la reproductibilité de ces expériences.

D'autre part, dans l'érythroagrégamètre, la contrainte de cisaillement agit sur les agglutinats en suspension orientés de façon variable. Un seul composant de cette contrainte est parallèle à l'interface des agglutinats. Elle produit la dissociation des agglutinats qui entraîne finalement une variation de l'intensité de la lumière rétrodiffusée enregistrée par l'appareil. Nous avons ainsi obtenu les différents paramètres de dissociation. Grâce à sa reproductibilité et à sa sensibilité, le paramètre E_D s'est révélé le plus approprié pour caractériser le processus de dissociation (différence normalisée plus élevée et coefficient de variation plus petit entre les paramètres déterminés). En utilisant l'analyse physico-mathématique proposée par Snabre et col (Snabre et col, 1987), et à partir de la relation existant entre la densité en anticorps (D) et l'énergie d'adhésion (γ_d) que nous avons mise en évidence lors des expériences dans la chambre de flux, nous avons évalué l'énergie de dissociation (γ_e) correspondant à la densité en anticorps utilisée dans l'érythroagrégamètre. A partir du rapport entre γ_e et E_D nous avons pu déterminer un coefficient de réglage (ψ) égal à $2,08 \times 10^{-4}$. Celui-ci nous permet d'estimer, à partir de la valeur de E_D , l'énergie de dissociation pour cet

anticorps dans les conditions expérimentales décrites. Bien que cette approche donne une mesure globale du processus de dissociation, elle permet de déterminer des faibles quantités d'énergie (de l'ordre de 10^{-19} N.cm/molécules d'anticorps) avec précision et reproductibilité.

Le choix de la densité en anticorps, utilisée dans les différentes approches, a été dicté par des contingences méthodologiques.

Dans la première technique (chambre de flux) les dilutions d'anticorps ont été choisies de façon à obtenir des doublets. Les dilutions retenues sont différentes selon le sous-groupe sanguin des globules rouges, A_1 ou A_2 . Ceci est dû à la différence de densité antigénique de ces deux sous-groupes sanguins. La valeur de la contrainte de cisaillement à 50 % de séparation (σ_{50}) a confirmé cette caractéristique. Les valeurs de σ_{50} sont du même ordre de grandeur pour les deux sous-groupes sanguins, mais les globules rouges A_1 étant trois fois plus dilués. Aux basses dilutions utilisées pour les érythrocytes A_1 , la méthode a montré des différences significatives ($p < 0,05$) seulement entre 1/1000, 1/1200 et 1/1600. Donc les basses dilutions avec des concentrations en anticorps très proches ne sont pas différenciées par la méthode.

Dans la deuxième technique (érythroagrégamètre), le choix de la densité en anticorps a été limité par le seuil de détection de l'appareil (dilution de l'anticorps entre 1/8 et 1/128). Contrairement aux expériences dans la chambre de flux, les conditions expérimentales ont été les mêmes pour tous les groupes et sous-groupes sanguins des érythrocytes. Une différence significative ($p < 0,05$) a été mise en évidence pour des sous-groupes présentant une importante

différence de densité antigénique (A_1 versus A_3). Au contraire, elle n'a pas présenté des différences significatives ($p > 0,05$) pour des sous-groupes présentant une faible variation de densité antigénique (A_1 versus A_2). Les globules rouges du groupe A_1B sont néanmoins différenciés ($p < 0,05$). Ce comportement non attendu de globules rouges A_1B est peut-être dû à une affinité plus importante de l'anticorps monoclonal pour la conformation et l'environnement adoptés par l'antigène A_1 sur la membrane de ces érythrocytes.

Dans ces deux techniques, une corrélation entre la densité en anticorps sur la membrane érythrocytaire (D) et les différents paramètres expérimentaux obtenus (σ_{50} avec $r = 0,987$ et E_D avec $r = 0,828$) a été mise en évidence. Ceci confirme le fait que le nombre de molécules ponts fixées à la membrane cellulaire joue un rôle important dans la détermination de l'énergie de dissociation cellulaire (Sung et col, 1985).

D'autre part, les résultats obtenus par ces deux techniques sont très dispersés (tableau IV et XI). Une telle dispersion pourrait être due en partie au fait que la formation des liaisons antigène-anticorps qui lient les doublets est considérée comme un processus de type Poisson (Capo et col, 1982). Celui-ci implique une grande variabilité dans le nombre de liaisons dans le cas où ce nombre est faible (Tess et col, 1993). De plus, la dispersion peut être due au fait que les sites antigéniques A sont distribués de façon hétérogène sur les globules rouges, entre les différentes cellules d'un même échantillon et entre les différents échantillons (Tha et col, 1988 ; Berneman et col, 1991).

A niveau moléculaire, la fixation d'anticorps sur les carbohydrates spécifiques de la membrane est considérée comme une liaison non covalente. Elle peut impliquer des interactions non covalentes comme les ponts hydrogène, les interactions ioniques, les interactions hydrophobes et les forces de Van der Waals (Van Oss, 1997). L'énergie libre d'une telle liaison antigène-anticorps a été déterminée, elle vaut 8,5 kcal/mol, ce qui correspond à environ $5,9 \times 10^{-18}$ N.cm⁻¹ par liaison (Bell, 1978). Cette valeur est plus élevée que celles obtenues dans notre travail ($8,92 \times 10^{-19}$ et $8,73 \times 10^{-19}$ N.cm/molécule d'anticorps, selon l'approche considérée). Cette différence de résultats s'explique par le fait que seule une petite fraction des molécules fixées participe à la liaison entre les deux surfaces cellulaires adjacentes (Sung et col, 1985 ; Evans et col, 1991). La distribution tridimensionnelle des récepteurs des anticorps sur les glycoprotéines et glycolipides de la membrane cellulaire peut réduire la probabilité qu'une molécule d'anticorps fixée à une cellule réagisse avec un autre récepteur sur la cellule adjacente (Sung et col, 1994). Par ailleurs, la mesure des valeurs de l'énergie de dissociation par les deux méthodes est une addition algébrique de l'énergie de liaison et de l'énergie répulsive électrostatique exercée entre les deux membranes adjacentes. Il est donc raisonnable d'obtenir des valeurs d'énergie plus basses que l'énergie libre dérivée de l'interaction antigène-anticorps dans une solution neutre.

D'autre part, on doit considérer le déplacement latéral des molécules ponts sur la membrane des érythrocytes (Ward et col, 1994). Ce phénomène se produit seulement en réponse à une force (Tozeren et col, 1989a,b). Celle-ci résulte de la force élastique des molécules ponts (qui déplace la liaison vers l'aire de contact restante pour réduire la tension de la configuration d'union), de

la force de diffusion (qui essaie de restaurer une densité uniforme de molécules d'ancrage sur la membrane) et d'une résistance à la friction de la membrane. Selon Skalak et col (Skalak et col, 1990), quand deux corps unis par une énergie d'adhésion constante (γ) sont séparés par des forces externes (traction ou cisaillement), un point instable est atteint au moment où l'aire de contact est suffisamment réduite et la fraction d'aire restante est détachée rapidement. Ce phénomène survient quand l'énergie spécifique γ est constante pendant tout le processus. Ceci ne se produit pas quand γ est variable, comme dans le cas de l'agglutination érythrocytaire. Dans ce cas, au fur et à mesure que les cellules se séparent, l'énergie spécifique d'adhésion augmente. Ce phénomène implique qu'il doit y avoir un certain arrangement des molécules d'ancrage, lequel produit une augmentation de la concentration de liaison à l'extrémité de l'aire de contact au moment où elle se réduit (Sung et col, 1986). Evans et Leung (Evans et col, 1984) ont démontré ce phénomène de déplacement latéral des molécules ponts pendant la dissociation d'érythrocytes agglutinés par une lectine de germe de blé. Dans notre travail, la fraction de l'aire de séparation augmente avec la contrainte de cisaillement appliquée (figures 22 et 23). Ceci n'est pas en accord avec l'hypothèse d'une densité d'énergie d'adhésion constante. Il semble qu'une partie des molécules d'anticorps ponts est polarisée au niveau de la zone de séparation.

Par ailleurs, Evans et col (Evans et col, 1991) ont démontré, par désagrégation mécanique d'érythrocytes agglutinés par des lectines, des anticorps monoclonaux et des immunoglobulines, que la séparation des cellules s'accompagnait de l'extraction de quelques récepteurs de la membrane. Ils ont

trouvé des énergies de rupture ligand-récepteur du même ordre de grandeur que l'énergie nécessaire pour l'extraction du récepteur de la bicouche lipidique (et peut-être des lipides associés) tel que l'avait estimé théoriquement Bell dans son travail (Bell, 1978). D'autres travaux ont confirmé cette hypothèse (Xia et col, 1994 ; Tees et col, 1996). Selon les travaux de Rasia (Rasia, 1999), si l'on répète le processus de dissociation du même échantillon dans l'érythroagrégomère, il existe une extraction de quelques récepteurs de la membrane pendant les quatre premiers essais (mise en évidence par la diminution du paramètre d'énergie de dissociation), mais le processus se stabilise une fois que les récepteurs faiblement attachés à la membrane sont extraits.

Une étude au niveau moléculaire (par exemple avec des marqueurs fluorescents) sur des cellules pourra donner des informations concernant les processus de déplacement latéral, d'extraction et de distribution tridimensionnelle restrictive sur la membrane des récepteurs participant à l'adhésion cellulaire. Ainsi, une meilleure compréhension du phénomène de dissociation cellulaire pourra être obtenue.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Le travail exposé dans ce mémoire de thèse porte sur la détermination de l'énergie impliquée dans les processus d'adhésion intercellulaire par deux techniques rhéo-optiques dans différents systèmes expérimentaux, plus particulièrement des globules rouges de groupe sanguin A agglutinés par un anticorps monoclonal spécifique anti-A.

Le mécanisme d'adhésion cellulaire joue un rôle important dans un grand nombre d'événements biologiques, aussi bien physiologiques que pathologiques. En particulier, l'interaction entre les érythrocytes et l'adhésion érythrocytaire sur le tissu vasculaire ont été considérées, en tenant compte des possibles interactions avec des protéines plasmatiques agrégeantes (i.e. le fibrinogène) et avec des protéines adhérentes ou agglutinantes (i.e. les immunoglobulines). De nombreuses observations ont conduit à penser que le rôle des immunoglobulines sur l'agglutination des érythrocytes est un phénomène complexe. L'agglutination immunologique est un processus d'échange énergétique, comme celui de l'agrégation mais, à la différence de celle-ci, l'énergie dissipée pendant l'agglutination est plus faible que celle requise pour séparer les hématies agglutinées, ce qui lui donne une condition d'irréversibilité.

Les immunoglobulines sont des molécules spécialement adaptées qui, en réagissant sur la surface cellulaire, interviennent dans le processus

d'adhésion inter-érythrocytaire, altèrent le mouvement cellulaire dans la microcirculation et induisent l'occlusion capillaire, la capture et la phagocytose ou la lyse cellulaire. De ce fait, une connaissance précise de l'énergie impliquée dans l'agglutination immunologique conduira à une meilleure compréhension de ces phénomènes, ainsi qu'à une optimisation du traitement et à un meilleur contrôle de ces altérations.

Par ailleurs, un problème qui se présente fréquemment en immunohématologie clinique est celui de définir la qualité d'un anticorps, qualité en relation avec l'affinité ou constante d'association de ce dernier. Pour toutes ces raisons, le développement de techniques permettant de déterminer l'énergie d'adhésion intercellulaire à travers des anticorps monoclonaux est considéré comme un axe de recherche primordial.

Dans notre travail, deux approches ont été prises en considération.

Dans un premier temps, nous avons quantifié l'énergie impliquée dans la dissociation intercellulaire par une approche microscopique grâce à une chambre de flux. Cette méthode permet d'appliquer une contrainte de cisaillement uniforme parallèle à l'interface d'adhésion d'un agglutinat à deux cellules (doublet) et de rendre possible la quantification directe du degré de dissociation en réponse à la contrainte appliquée. D'après nos observations, nous en avons déduit que la contrainte de cisaillement nécessaire pour dissocier un doublet, induit par un anticorps monoclonal, est proportionnelle à la densité de surface des molécules d'anticorps ainsi qu'à la densité antigénique des érythrocytes. A partir de ces résultats, nous avons calculé l'énergie de dissociation par unité d'aire membranaire adhérente (γ_d), qui est égale à 8.92×10^{-19} N.cm par molécule d'anticorps.

Dans un second temps, nous avons étudié l'énergie impliquée dans l'agglutination immunologique par une approche plus globale par l'intermédiaire d'un érythroagrégamètre. Dans cette méthode, mettant en jeu un appareillage de type Couette, le signal d'intensité lumineuse rétrodiffusée augmente à mesure que les agglutinats sont dissociés par la contrainte de cisaillement constante appliquée. Par cette méthode, nous avons obtenu trois paramètres dynamiques. Ils permettent d'évaluer l'énergie dépensée dans le processus de dissociation. Ces paramètres présentent une corrélation significative avec la dilution de l'anticorps. En particulier, le paramètre d'énergie de dissociation (E_D) s'est révélé très précis et sensible pour estimer le degré d'affinité dans la réaction d'agglutination immunologique.

En acceptant des similitudes entre le mécanisme de séparation mécanique des membranes cellulaires mutuellement adhérees et le mécanisme de fracture de matériels inertes, nous avons utilisé l'analyse physico-mathématique proposée par Snabre (Snabre et col, 1987), pour estimer l'énergie superficielle spécifique d'adhésion (γ_e). La valeur obtenue a été de $8,73 \times 10^{-19}$ N.cm par molécule d'anticorps.

Dans ces deux méthodes, une énergie de dissociation a été calculée (γ_d et γ_e). Bien que les déterminations soient faites à différents niveaux sur les suspensions érythrocytaires (microscopique pour la chambre de flux et globale pour l'érythroagrégamètre) et avec des différences méthodologiques, les valeurs d'énergie obtenues ont été du même ordre de grandeur. Ceci démontre la validité de ces deux études.

En conclusion, l'énergie de dissociation cellulaire a été obtenue à partir des mesures expérimentales et de l'analyse théorique. Ainsi, la combinaison d'approches biochimiques et biophysiques a donné de nouvelles informations et entraîne de nouvelles questions sur les énergies impliquées dans la dissociation intercellulaire. Les approches utilisées pour l'étude de ce système érythrocytes-anticorps peuvent être étendues, moyennant certaines modifications, aux autres systèmes impliquant d'autres molécules d'interaction. De telles informations sur l'énergie existant entre les cellules peuvent aider à la connaissance d'importants phénomènes physiologiques et pathologiques, en particulier dans l'agrégation plaquettaire et l'hémostatique (Peyrou et col, 1999), certaines maladies immunologiques, hématologiques (Nash et col, 1992) et métaboliques (Wautier et col, 1984), le vieillissement cellulaire, le rejet de greffe (Fressy, 1992)...

Des études similaires concernant les maladies immunologiques (tels que les anémies auto-immunes), les diabètes, l'hypertension artérielle, les maladies liées aux problèmes de la coagulation, etc, pourraient être également réalisées grâce à ce travail sur la méthodologie et la faisabilité.

Cependant, il nous semble primordial de développer des techniques qui permettent de visualiser les interactions cellules-anticorps. L'accès à ce type d'information est nécessaire pour comprendre le mécanisme de l'agglutination immunologique au niveau moléculaire.

Quelques dispositifs expérimentaux peuvent être suggérés pour visualiser les agglutinats de globules rouges dans les conditions indiquées ci-dessus. Le marquage des anticorps à l'aide d'une sonde fluorescente permet la visualisation du complexe érythrocyte-anticorps marqué en microscopie de

fluorescence (Enderle et col, 1997 ; Stoltz et col, 1999). Une étude préliminaire a été réalisée en microscopie 3-D (figure 31). A partir de sectionnements optiques, il est possible de reconstituer des images tridimensionnelles des agglutinats avec une résolution élevée et en temps réel. Les expériences sont réalisées avec et sans cisaillement dans une chambre de flux, grâce à l'utilisation d'un microscope à sectionnement optique. Cette approche permettra d'étudier la localisation, la diffusion latérale et le décrochement des antigènes à la surface d'interaction sur la membrane pendant le processus de dissociation.

Par ailleurs, les pinces optiques (Hénon, 1999) constituent un autre outil très novateur pour manipuler des objets biologiques à l'échelle cellulaire et effectuer sur eux des mesures micromécaniques (Bronkhorst et col, 1997). Le principe consiste à utiliser les forts gradients de champ électrique qui existent au voisinage du point de convergence d'un faisceau laser pour attirer et piéger un petit objet diélectrique. Le faisceau est focalisé par un objectif de grande ouverture numérique d'un microscope inversé ou droit. Un objet micrométrique est piégé au point de focalisation, dans le plan d'observation du microscope. La force de piégeage est proportionnelle à la puissance du faisceau laser et à la différence d'indice entre l'objet et le milieu environnant. Il serait possible par cette nouvelle technique, de piéger les deux globules rouges d'un doublet et de calculer de manière directe la force d'interaction entre les deux cellules.

Enfin, la technique de résonance plasmonique de surface (SPR) offre la possibilité d'analyser les interactions biospécifiques dans un circuit sous flux en temps réel (Malmberg et col, 1995 ; Van der Merwe et col, 1996 ; Quinn et col, 1997). Cette technique fait intervenir le couplage d'un des deux partenaires sur

une surface biocompatible constituée par des molécules de dextran carboxylé.
Il serait alors possible d'étudier l'interaction érythrocyte-anticorps fixé grâce à cette technique.

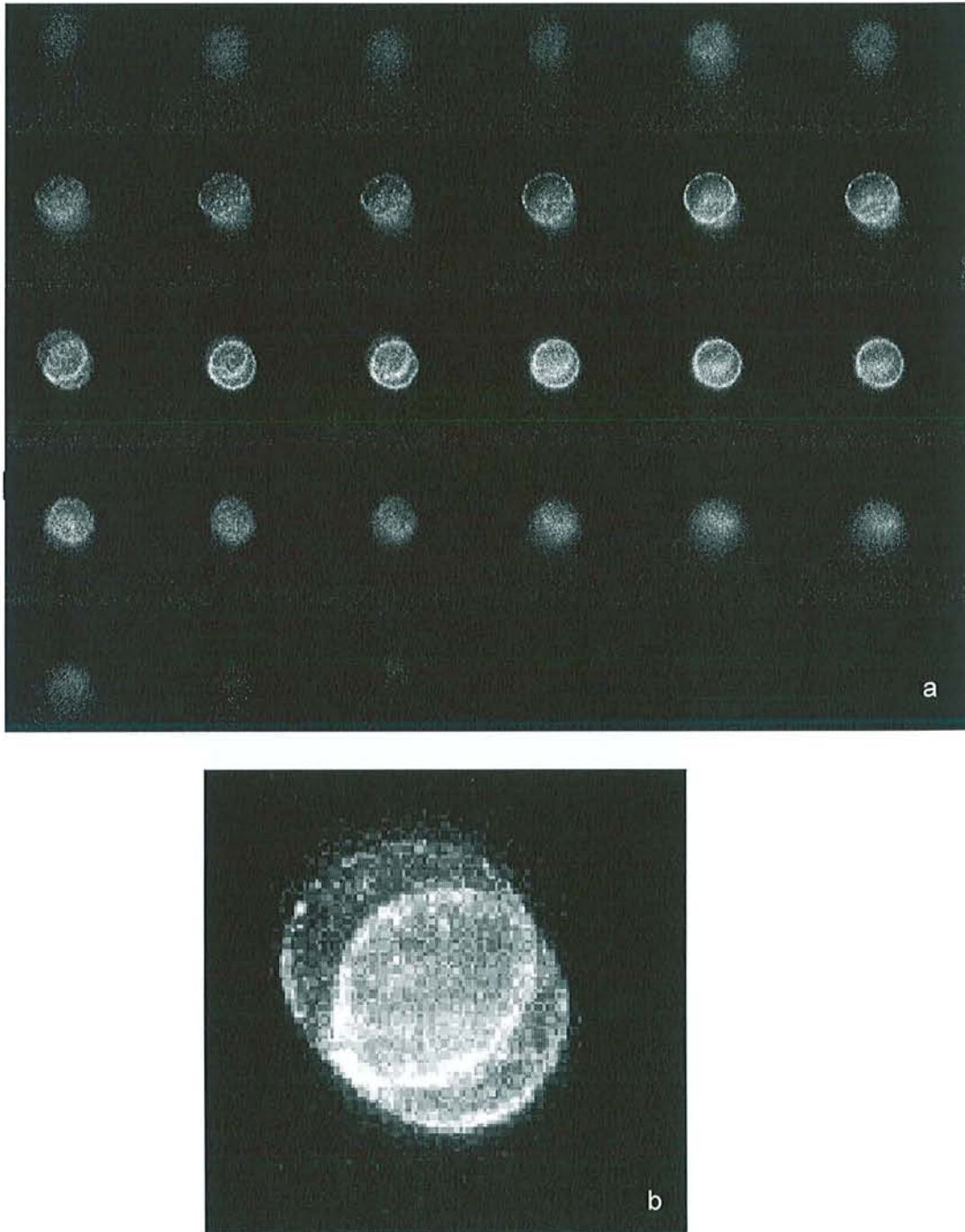


Figure 31 : Images d'un doublet marqué par un anticorps fluorescent anti-IgG murine, obtenues par microscopie à sectionnement optique (Système CELLscan, Olympus). a) Planche de 30 sections optiques (pas : $0,25 \mu\text{m}$), b) Reconstruction 3-D à partir de 30 sections optiques.

BIBLIOGRAPHIE

**BIBLIOGRAPHIE**

1. ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K. AND WATSON, J.D. (1995) *Biologie moléculaire de la cellule*. 3^{ème} éd. Médecine-Sciences, Flammarion, Paris, 1294 pages.
2. AUCOUTURIER, P. (1999) Structure des molécules de reconnaissance. Dans : Bach, J.-F. *Immunologie*, 3^e éd, Médecine-Sciences, Flammarion, Paris. 5-23.
3. AZIMZADEH, A. AND VAN REGENMORTEL, H.V. (1990). Antibody affinity measurements. **J. Mol. Recognit.** 3(3) : 108-116.
4. BÄUMLER, H., DONATH, E., PRATSCH, L. AND LERCHE, D. (1989). Aggregation and disaggregation of human red blood cells in neutral polymer electrolyte solutions. Dans : *Hémorhéologie et Agrégation Érythrocytaire*, Vol 3. J.-F. Stoltz, M. Donner, A.L. Copley, Ed., E.M.I., Paris, 24-37.
5. BELL, G.I. (1978). Models for the specific adhesion of cells to cells. **Science**, 2000 : 618-627.
6. BERNEMAN, Z.N., VAN BOCKSTAELE, D.R., UYTENBROECK, W.M., VAN ZAELEN, C., COLE-DERGENT, J., MUYLLE, L. AND PEETERMANS, M.E. (1991). Flow-cytometric analysis of erythrocytic blood group A antigen density profile. **Vox Sang**, 61: 265-274.
7. BERZOFSKY, J.A., BERKOWER, I.J. AND EPSTEIN, S.L. (1999). Antigen-antibody interactions and monoclonal antibodies Dans : *Fundamental immunology*. W.E. Paul ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 75-110.
8. BOIVIN, P. (1984). Interactions moléculaires des protéines de la membrane et déformabilité érythrocytaire. **Path. Biol.**, 32, 6 : 717-735.
9. BOIVIN, P. (1987). Biochemical parameters of red blood cell deformability. **Clin. Hemorheol.** 7: 25-33.
10. BRONKHORST, P.J.H., GRIMBERGEN, J., BRAKENHOFF, G.J., HEETHAAR, R.M. AND SIXMA, J.J. (1997). The mechanism of red cell (dis)aggregation investigated by means of direct cell manipulation using multiple optical trapping. **Brit. J. Haematol.** 96 : 256-258.

11. BULL, B.S. AND BRETON-GORIUS, J. (1995). Morphology of the erythron. Dans : Beutler, E. et al (Eds), Williams Hematology, Fifth Edition. International edition. McGraw-Hill, New York. 349-363.
12. CAPO, C., GARROUSTE, F., BENILIEL, A.-M., BONGRAND, P., RYTER, A. AND BELL, G.I. (1982). Concanavalin-A-mediated thymocyte agglutination : a model for a quantitative study of cell adhesion. **J. Cell Sci.** 56 : 21-48.
13. CARTRON, J.P. (1993). Groupes sanguins. Dans : Traité d'immunologie. J.-F. Bach éd. Flammarion Médecine-Sciences, Paris, 187-239.
14. CARTRON, J.P. (1998). Groupes sanguins et relation structure-fonction. **Transfus. Clin. Biol.**, 5 : 9s-32s.
15. CARTRON, J.P. AND ROUGER, P. (1979). L'agglutination des globules rouges. **Rev. Fr. Transfus. Immunohématol.** 3 : 277-299.
16. CARTRON, J.P., REYES, F., GOURDIN, M.F., GARRETA, M. AND SALMON, C. (1977). Antigen site distribution among « weak A » red cell populations. A study of A₃, A_x and A_{end} variants. **Immunology**, 32 : 233-244.
17. CHABANEL, A. AND SAMAMA, M.M. (1992). Hemorheology and vein thrombosis. Dans : Hémorhéologie et Agrégation Érythrocytaire, Vol. 4. J.-F. Stoltz, Ed., E.M.I., Paris, 151-157.
18. CHAPOVAL, A.I., NELSON, H., THIBAUT, C., PENNA, C. AND DEAN P. (1995). Bifunctional antibody retargeting in vivo-activated T lymphocytes : simplifying clinical application. **J. Hematother.** 4 : 571-577.
19. CHEN, S., GAVISH, B., ZHANG, S., MAHLER, Y. AND YEDGAR, S. (1995). Monitoring of erythrocyte aggregate morphology under flow by computerized image analysis. **Biorheology**, 32 : 487-496.
20. CHIEN, S. AND SUNG, L.A. (1986). Bases physicochimiques et implications cliniques de l'agrégation des globules rouges. Dans : Hémorhéologie et Agrégation Érythrocytaire, J.-F. Stoltz, Ed., E.M.I., Paris, 122-147.
21. CHIEN, S., FENG, S., VAYO, M., SUNG, L.A., USAMI, S. AND SKALAK, R. (1990). The dynamics of shear disaggregation of red blood cells in a flow channel. **Biorheology**, 27: 135-147.
22. CHIEN, S., SUN, L.A., KIM, S., BURKE, A.M. AND USAMI, S. (1977). Determination of aggregation force in rouleaux by fluid mechanical technique. **Microvasc. Res.**, 13 : 327-333.

23. CHIEN, S., SUNG, K.L., SKALAK, R., USAMI, S. AND TOZEREN, A. (1978). Theoretical and experimental studies on viscoelastic properties of erythrocyte membrane. **Biophys. J.**, 24 : 463-487.
24. CHIEN, S., USAMI, S., DELLENBACK, R.J. AND GREGERSEN, M.I. (1970). Shear-dependent interaction of plasma proteins with erythrocytes in blood rheology. **Am. J. Physiol.** 219, 1 : 143-153.
25. COPLEY, A.L. (1986). Agrégation et désagrégation érythrocytaires. Dans : Hémorhéologie et Agrégation Érythrocytaire. J.-F. Stoltz, Ed., E.M.I., Paris, 9-21.
26. CORBERAND, J.-X. (1998). Techniques en hématimétrie et cytochimie. Dans : Hématologie clinique et biologique. Arnette Initiatives Santé, Vélizy-Villacoublay.
27. COULIBALY, H., RAZAVIAN, M., DESAINT, C., GUILLET, R., BEUZARD, Y. AND BOYNARD, M. (1992). Agglutination immunologique des globules rouges étudiée par interférométrie ultrasonore: application au groupage sanguin. Dans : Hémorhéologie et Agrégation Érythrocytaire, Vol. 4. J.-F. Stoltz, Ed., E.M.I., Paris, 75-80.
28. DELAUNAY, J. (1998). La membrane du globule rouge. Structure et fonction. Dans : Cartron, J.-P. and Rouger, P. Bases moléculaires des antigènes des groupes sanguins. De l'immunogénétique à la biologie cellulaire. Masson, Paris. 1-37.
29. DENG, L.H., BARBENEL, J.C. AND LOWE, G.D.O. (1994). Influence of hematocrit on erythrocyte aggregation kinetics for suspensions of red blood cells in autologous plasma. **Biorheology**, 31 (2) : 193-205.
30. DERJAGUIN, B.V., MULLER, V.M. AND TOPOROV, Y.P. (1975). Effect of contact deformations on the adhesion of particles. **J. Colloid Interface Sci.** 53 : 314-326.
31. DETMERS, P.A., WRIGHT, S.D., OLSE, E., KIMBALL, B. AND COHN, Z.A. (1987). Aggregation of complement receptors on human neutrophils in the absence of ligand. **J. Cell Biol.**, 105 : 1137-1145.
32. DONNER, M AND STOLTZ, J.F. (1986). Rhéologie moléculaire : définition, méthodes d'approche et aspects cliniques. Dans : Hémorhéologie et Agrégation Érythrocytaire, J.-F. Stoltz, Ed., E.M.I., Paris, 84.97.

33. DONNER, M., MILLS, P. AND STOLTZ, J.F. (1988a). Influence des protéines plasmatiques sur l'agrégation érythrocytaire. Dans : Hémorhéologie et Agrégation Érythrocytaire, Vol. 2, J.-F. Stoltz, Ed., E.M.I., Paris, 3-9.
34. DONNER, M., SIADAT, M. AND STOLTZ, J.-F. (1988b). Erythrocyte aggregation : Approach by light scattering determination. **Biorheology**, 25 : 367-375.
35. ENDERLE, T., HA, T., OGLETREE, D.F., CHEMLA, D.S., MAGOWAN, C. AND WEISS, S. (1997). Membrane specific mapping and colocalization of malarial and host skeletal proteins in the Plasmodium falciparum infected erythrocyte by dual-color near-field scanning optical microscopy. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 94 : 520-525.
36. EVANS, E. AND LEUNG, A. (1984). Adhesivity and rigidity of erythrocyte membrane in relation to wheat germ agglutinin binding. **J. Cell Biol.** 98 : 1201-1208.
37. EVANS, E., BERK, D. AND LEUNG, A. (1991). Detachment of agglutinin-bonded red blood cells. I Forces to rupture molecular-point attachments. **Biophys. J.**, 59 : 838-848.
38. FAHRAEUS, R. (1929). The suspension stability of the blood. **Physiol. Rev.**, 9 : 241-274.
39. FLEMING, J.O. AND PEN, L.B. (1988). Measurement of the concentration of murine IgG monoclonal antibody in hybridoma supernatants and ascites in absolute units by sensitive and reliable enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA). **J. Immunol. Methods**, 110 : 11-18.
40. FRAZER, J.K. AND CAPRA, J.D. (1999). Immunoglobulins : structure and function. Dans : Fundamental Immunology. W.E. Paul ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 37-74.
41. FRESSY, P. (1992). Rôle du système ABO dans les transplantations et greffes. **Rev. Fr. Transfus. Hémobiol.** 35 : 363-377.
42. FUNG, Y.C., TSANG, W.C.O. AND PATITUCCI, P. (1981). High-resolution data on the geometry of red blood cells. **Biorheology**, 19 : 369-385.
43. GOUDEMAM, M. AND SALMON, C. (1980) Immuno-Hématologie et immunogénétique. Flammarion Médecine-Sciences, Paris, 588 pages.

44. HATO, T., PAMPORI, N. AND SHATTIL, S.J. (1998). Complementary roles for receptor clustering and conformational change in the adhesive and signaling function of integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$. **J. Cell Biol.**, 141 : 1685-1695.
45. HEALY, J.C. (1974). Méthode physique de mesure des énergies de liaison interérythrocytaire. **Biorheology**, 11 : 185-190.
46. HEALY, J.C. AND JOLY, M. (1975). Rheological behavior of blood in transient flow. **Biorheology**, 12 : 335-340.
47. HENON, S., LENORMAND, G., RICHERT, A. AND GALLET, F. (1999). A new determination of shear modulus of the human erythrocyte membrane using optical tweezers. **Biophys. J.**, 76 : 1145-1151.
48. HOCHMUTH, R.M., MOHANDAS, N. AND BLACKSHEAR, P.L.Jr. (1973). Measurement of the elastic modulus for red cell membrane using a fluid mechanical technique. **Biophys. J.**, 13 : 747-752.
49. IVANOV, I.B., HADJIISKI, A., DENKOV, N.D., GURKOV, T.D., KRALCHEVSKY, P.A. AND KOYASU, S. (1998). Energy of adhesion of human T cells to adsorption layers of monoclonal antibodies measured by a film trapping technique. **Biophys. J.**, 75 : 545-556.
50. KELLEY, R.F. AND O'CONNELL, M.P. (1993). Thermodynamic analysis of an antibody functional epitope. **Biochemistry**, 32 : 6828-6835.
51. KOHLER, G. AND MILSTEIN, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature**. 256 : 495-503.
52. KÖLTRINGER, P., LANGSTEGER, W., LIND, P. AND EBER, O. (1991). Erythrocyte aggregation in hypothyroid patients : measurement under fluid conditions as elasticity of blood at low shear-rates. Dans : Hémorhéologie et Agrégation Érythrocytaire, Vol 3. J.-F. Stoltz, M. Donner, A.L. Copley, Ed., E.M.I., Paris, 261-264.
53. KORNBERG, R.D. AND McCONNELL, H.M. (1971). Inside-outside transitions of phospholipids in vesicle membranes. **Biochemistry**, 10 : 1111-1120.
54. LAVALLE, P., STOLTZ, J.-F., SENGER, B., VOEGEL, J.-C. AND SCHAAF, P. (1996). Red blood cell adhesion on a solid/liquid interface. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 93 : 15136-15140.
55. LE DEVEHAT, C., BOISSEAU, M. AND BERTRAND, A. (1989) Signification physiopathologique des paramètres microrhéologiques dans l'insuffisance

- veineuse. Dans : Hémorhéologie et Agrégation Érythrocytaire, Vol. 2. J.-F. Stoltz, Ed., E.M.I., Paris, 181-199.
56. LE DEVEHAT, C., VIMEUX, M., BONDOUX, G. AND KHODABANDEHLOU, T. (1991) Anomalies de l'agrégation des hématies au cours de la maladie diabétique. Dans : Hémorhéologie et Agrégation Érythrocytaire, Vol 3. J.-F. Stoltz, M. Donner, A.L. Copley, Ed., E.M.I., Paris, 265-267.
57. LODISH, BALTIMORE, BERK, ZIPURSKY, MATSUDAIRA AND DARNELL (1997) Structure des membranes : membrane plasmique. Dans : Biologie moléculaire de la cellule, De Boeck Université, Italie, 595-632.
58. LONG, M., GOLDSMITH, H.L., TESS, D.F.J. AND ZHU, C. (1999) Probabilistic modeling of shear-induced formation and breakage of doublets cross-linked by receptor-ligand bonds. **Biophys. J.**, 76 : 1112-1128.
59. LOWE, J.B. (1998). Biochimie et biosynthèse des antigènes ABH et Lewis. Dans : Cartron, J.P. and Rouger, P. Bases moléculaires des antigènes des groupes sanguins. De l'immunogénétique à la biologie cellulaire. Masson, Paris. 77-115.
60. MAEDA, N. AND TAKESHI, S. (1985). Inhibition and acceleration of erythrocyte aggregation induced by small macromolecules. **Biochim. Biophys. Acta.** 843 : 128-136.
61. MALMBORG, A.-C. AND BORREBAECK, C.A.K. (1995). BIAcore as a tool in antibody engineering. **J. Immunol. Methods**, 183 : 7-13.
62. MARCELLI, A., FINE, J.M., HOMBERG, J.C. AND RIVAT, L. (1981). Techniques en immuno-hématologie. Flammarion Médecine-sciences. Paris, 163 pages.
63. MARTINEZ, M., VAYA, A. AND AZNAR, J. (1992). RBC aggregability and diabetes. Dans : Hémorhéologie et Agrégation Érythrocytaire, Vol. 4. J.-F. Stoltz, Ed., E.M.I., Paris, 179-182.
64. MEISELMAN, H.J., MERRIL, E.W., SALZMAN, E.W., GILLILAND, E.R. AND PELLETIER, G.A. (1967). Effect of dextran on rheology of human blood : low shear viscometry. **J. Appl. Physiol.**, 22 : 480-486.
65. MERKEL, R., NASSOY, P., LEUNG, A., RITCHIE, K. AND EVANS, E. (1999). Energy landscapes of receptor-ligand bonds explored with dynamic force spectroscopy. **Nature** 397 : 50-53.

66. MILLS, P. AND SNABRE, P. (1986). L'agrégation érythrocytaire. Dans : Techniques en biorhéologie. J.-F. Stoltz, M. Donner, E. Puchelle Ed., INSERM, Paris, 157-166.
67. MILLS, P., ADLER, P., DUFAUX, J. AND QUEMADA, D. (1979). Etude de l'agrégation d'une suspension sanguine par rétrodiffusion laser. **J. Mal. Vasc.**, 4 : 91-94.
68. MILLS, P., QUEMADA, D. AND DUFAUX, J. (1981). Mesure par rétrodiffusion laser des temps caractéristiques intervenant dans la rhéologie de suspension sanguine. **J. Mal. Vasc.**, 6 : 125-127.
69. NASH, G.B., COOKE, B.M., MARSH, K., BERENDT, A., NEWBOLD, C. AND STUART J. (1992). Rheological analysis of the adhesive interaction of red blood cells parasitized by *Plasmodium falciparum*. **Blood**, 79 : 798-807.
70. ORIOL, R. (1998). ABO, Hh, Lewis : sérologie génétique et distribution tissulaire. Dans : Bases moléculaires des antigènes des groupes sanguins. De l'immunogénétique à la biologie cellulaire. Cartron, J.P. and Rouger, P., Masson, Paris, 39-75.
71. PALEK, J. (1995). The red cell membrane. Dans : Beutler, E. et al (Eds), Williams Hematology, Fifth Edition. International edition. McGraw-Hill, New York. 406-417.
72. PALEK, J. AND LUX, S.E. (1983). Red cell membrane skeletal defects in hereditary and acquired hemolytic anemias. **Semin. Hematol.**, 20 : 189-224.
73. PERKINS, S. (1999). Normal blood and bone marrow values in humans. Dans : Wintrobe's Clinical Hematology. 10th ed. Lee, G.R., Foerster, J., Lukens, J., Paraskevas, F., Greer, J.P. and Rodgers, G.M., Williams & Wilkins, Baltimore, 2738-2748.
74. PEYROU, V. LORMEAU, J.C., HERAULT, J.P., GAICH, C., PFLIEGGER, A.M. AND HERBERT, J.M. (1999). Contribution of erythrocytes to thrombin generation in whole blood. **Thromb. Haemost.** 81: 400-406.
75. PIERRES, A., BENOLIEL, A-M. AND BONGRAND, P. (1996). Measuring bonds between surface-associated molecules. **J. Immunol. Methods**, 196 : 105-120.
76. PIGNON, B., ADJIZIAN, J.C., DONNER, M., STOLTZ, J.F. AND POTRON, G. (1991). Mesure de l'agrégation érythrocytaire par rétrodiffusion laser. Détermination des valeurs normales. Influence de différents facteurs. Dans :

- Hémorhéologie et Agrégation Érythrocytaire, Vol 3. J.-F. Stoltz, Ed., E.M.I., Paris, 53-64.
77. PIGNON, B., MULLER, S., JOLLY, D., SIADAT, M., PETITFRERE, E., VESSEL, B., DONNER, M., POTRON, G. AND STOLTZ, J.F. (1989). Validation d'une méthode d'approche de l'agrégation érythrocytaire par rétrodiffusion laser. Dans : Hémorhéologie et Agrégation Érythrocytaire, Vol 2. J.-F. Stoltz Ed., E.M.I., Paris, 65-74.
78. POLLACK, W. AND HAGER, H.J. (1965). A physico-chemical study of hemagglutination. **Bibl. Haematol.**, 23 : 802-813.
79. QUINN, J.G., O'KENNEDY, R., SMYTH, M., MOULDS, J. AND FRAME, T. (1997). Detection of blood group antigen utilising immobilised antibodies and surface plasmon resonance. **J. Immunol. Methods** 206 : 87-96.
80. RASIA, R.J. (1999). Thèse Universitaire, Faculté de Sciences Biochimique et Pharmaceutique. U.N.R., Rosario, Argentine.
81. RASIA, R.J., RASIA-VALVERDE, J.R. AND STOLTZ, J.-F. (1996). Weak "A" blood subgroup discrimination by a rheo-optical method: a new application of laser backscattering. **Optical Engineering**, 35 : 20-25.
82. RASIA, R.J., VALVERDE, J.R., SONDAG, D., RAPAILLE, A., PLA, L. AND STOLTZ, J.-F. (2000). Functional characterization of monoclonal antibodies applying a rheo-optical method. (*Suomis à Journal of Immunological methods*).
83. RASIA-VALVERDE, J.R., RASIA, R.J., BOTTE, C. AND STOLTZ, J.-F. (1997). Approche rhéologique de la réaction de dissociation d'agglutinats immunologiques érythrocytaires: application à des hématies du sous-groupe A. **Trans. Clin. Biol.**, 4 : 203-211.
84. RATNOFF, O.D. (1987). Componentes de la sangre. Dans : Fisiología, Berne, R.M. and Levy, M.N. Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires. 423-426.
85. ROITT, I.M., BROSTOFF, J. AND MALE, D.K. (1997). Immunologie, 4e édition De Boeck & Larcier, Département De Boeck Université, Bruxelles, 406 pages.

86. ROPARS, C., MULLER, A., HUREL, C. AND LEBLANC, J. (1981). A manual semi-micro method for quantitation of haemagglutination. **Rev. Fr. Transfus. Immunohematol.** 24 : 135-141.
87. ROUGER, P. NOIZAT-PIRENNE, F. AND LE PENNEC, P.-Y. (1997). Advances in the use of monoclonal antibodies for blood group testing. **Transfus. Clin. Biol.** 4 : 345-349.
88. SAGVOLDEN, G., GIAEVER, I., PETTERSEN, E.O. AND FEDER, J. (1999). Cell adhesion force microscopy. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 96 : 471-476.
89. SALMON, C. (1997) Les groupes sanguins ou l'écriture des gènes, Masson, Paris, 208 pages.
90. SALMON, C., CARTRON, J.-P. AND ROUGER, P. (1991). Les groupes sanguins chez l'homme. 2e édition, Masson, Paris, 560 p.
91. SARNO, A., SERRA, A. AND CAIMI, G. (1989). Fluidité membranaire et agrégation des globules rouges dans différentes pathologies vasculaires. Dans : Hémorhéologie et Agrégation Érythrocytaire, Vol 2. J.-F. Stoltz Ed., E.M.I., Paris, 150-155.
92. SCHMID-SCHÖNBEIN, H., GOSEN, J.V., HEINICH, L., KLOSE, H.J. AND VOLGER, E. (1973). A counter-rotating « rheoscope chamber » for the study of the microrheology of blood cell aggregation by microscopic observation and microphotometry. **Microvasc. Res.**, 6 : 366-376.
93. SCHMID-SCHÖNBEIN, H., VOLGER, E., TEITEL, P., KIESEWETTER, H. DAVER, V. AND HEILMANN, L. (1982). New hemorheological techniques for the routine laboratory. **Clin. Hemorheology**, 2 : 93.
94. SHECHTER, E. (1997). Biochimie et biophysique des membranes. Aspects structuraux et fonctionnels. 2^e éd. Masson, Paris, 466 pages.
95. SHEPARD, H.M., LEWIS, G.D., SARUP, J.C., FENDLY, B.M., MANEVAL, D., MORDENTI, J., ET AL (1991). Monoclonal antibody therapy of human cancer : taking the HER2 protooncogene to the clinic. **J. Clin. Immunol.**, 11: 117-127.
96. SINGER, S.J. AND NICOLSON, G.L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. **Science**, 175 : 720-731.
97. SKALAK, R. (1984). Aggregation and disaggregation of red blood cells. **Biorheology**, 21 : 463-476.

98. SKALAK, R. AND ZHU, C. (1990). Rheological aspects of red cell aggregation. **Biorheology**, 27 : 309-323.
99. SKALAK, R., ZARDA, P.R., JAN, K.M. AND CHIEN, S. (1981). Mechanics of rouleau formation. **Biophys. J.**, 35 : 771-781.
100. SKALAK, R. AND CHIEN, S. (1983). Theoretical models of rouleaux formation and disaggregation. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, 416 : 138-148.
101. SNABRE, P. AND MILLS, P. (1986). Rôle des interactions électrostatiques dans le phénomène d'agrégation érythrocytaire. Dans : Hémorhéologie et Agrégation Érythrocytaire. J.F.Stoltz, Ed., E.M.I., Paris, 98-110.
102. SNABRE, P., BITBOL, M. AND MILLS, P. (1987). Cell disaggregation behavior in shear flow. **Biophys. J.**, 51 : 795-807.
103. STOLTZ, J.-F. (1986a). Rappels concernant les paramètres contrôlant les processus fondamentaux en hémorhéologie : importance de l'agrégation érythrocytaire. Dans : Hémorhéologie et Agrégation Érythrocytaire. J.F. Stoltz, Ed., E.M.I., Paris, 22-30.
104. STOLTZ, J.-F., PAULUS, F. AND DONNER, M. (1986b). Techniques d'approches de l'agrégation érythrocytaire. Dans : Hémorhéologie et Agrégation Érythrocytaire. J.F.Stoltz, Ed., E.M.I., Paris, 111-121.
105. STOLTZ, J.F., STOLTZ, M., PETERS, A. AND LARCAN, A. (1969). Aspects théoriques des phénomènes de floculation en biologie. **Ann. Biol. Clin.** 27 : 1-10.
106. STOLTZ, J.F., VIRIOT, M.L., DUMAS, D., MULLER, S., LATGER, V., PADILLA, J.J., WOODARD, S., CARRE, M.C. AND BAROS, F. (1999). New trends in optical methods applied to cell biology. Dans : Medical Diagnostic Techniques and Procedures. Narosa Publishing House, New Delhi, India. 160-187.
107. STRYER, L. (1997). Biochimie, Lubert Stryer, 4th éd. Médecine-Sciences, Flammarion, Paris, 1065 pages.
108. STUART, J., STONE, P.C.W., FRAYBURGER, G., BOISSEAU, M.R. AND ALTMAN D.G. (1989). Instrument precision and biological variability determine the number of patients required for rheological studies. **Clin. Hemorheol.**, 9 : 181-197.

109. SUNG, K.-L.P., SUNG, L.A., CRIMMINS, M., BURAKOFF, S.J. AND CHIEN, S. (1986). Determination of junction avidity of cytolytic T cell and target cell. **Science**, 234 : 1405-1408.
110. SUNG, L.A. AND KABAT, E.A. (1994) Agglutination-induced erythrocyte deformation by two blood group A-specific lectins : studies by light and electron microscopy. **Biorheology**, 31: 353-364.
111. SUNG, L.A., KABAT, E.A. AND CHIEN, S. (1985). Interaction energies in lectin-induced erythrocyte aggregation. **J. Cell Biol.**, 101 : 652-659.
112. TEES, D.F.J. AND GOLDSMITH, H.L. (1996). Kinetics and locus of failure of receptor-ligand-mediated adhesion between latex spheres. I. Protein-carbohydrate bond. **Biophys. J.**, 71 : 1102-1114.
113. TEES, D.F.J., COENEN, O. AND GOLDSMITH, H.L. (1993). Interaction forces between red cells agglutinated by antibody. IV Time and force dependence of break-up. **Biophys. J.**, 65 : 1318-1334.
114. TERNYNCK, TH. AND AVRAMEAS, S. (1991). Techniques immunoenzymatiques. INSERM, Société Française d'Immunologie, Paris, 102 pages.
115. THA, S.P. AND GOLDSMITH, H.L. (1988). Interaction forces between red cells agglutinated by antibody. III. Micromanipulation. **Biophys. J.**, 53 : 677-687.
116. THA, S.P., SHUSTER, J. AND GOLDSMITH, H.L. (1986). Interaction forces between red cells agglutinated by antibody. II. Measurement of hydrodynamic force of breakup. **Biophys. J.** 50 : 1117-1126.
117. TOZEREN, A. (1989a) Adhesion induced by mobile cross-bridges : steady state peeling of conjugated cell pairs. **J. theor. Biol.** 140 : 1-17.
118. TOZEREN, A., SUNG, K.-L.P. AND CHIEN, S. (1989b). Theoretical and experimental studies on cross-bridge migration during cell disaggregation, **Biophys. J.**, 55 : 479-487.
119. TROMMLER, A. GINGELL, D. AND WOLF, H. (1985). Red blood cells experience electrostatic repulsion but make molecular adhesion with glass. **Biophys. J.** 48 : 835-841.
120. VAN DER MERWE, P.A. AND BACLAY, A.N. (1996). Analysis of cell-adhesion molecule interactions using surface plasmon resonance. **Curr. Opin. Immunol.**, 8 : 257-261.

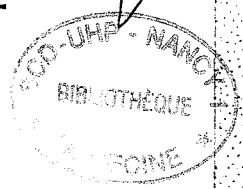
121. VAN OSS, C.J. (1997). Hydrophobic and hydrophilic interactions in antigen-antibody binding. **IJBC**, 3 :1-8.
122. WARD, M.D., DEMBO, M. AND HAMMER, D.A. (1994). Kinetics of cell detachment : peeling of discrete receptor clusters. **Biophys. J.** 67 : 2522-2534.
123. WAUTIER, J.L., WAUTIER, M.P., GUILLAM MEGNIN, C., PINTIGNY, D., GALACTEROS, F., PASSA, P., BESCOT LIVERSAC, J. AND CAEN J.P. (1984). Cellules endothéliales et adhésion des globules rouges diabétiques et drépanocytaires. Aspects quantitatifs et qualitatifs. **Nouv. Rev. Fr. Hematol.**, 26 : 379-385.
124. XIA, Z., GOLDSMITH, H.L. AND VAN DE VEN, T.G.M. (1993). Kinetics of specific and nonspecific adhesion of red blood cells on glass. **Biophys. J.**, 65 : 1073-1083.
125. XIA, Z., GOLDSMITH, H.L. AND VAN DE VEN, T.G.M. (1994). Flow-induced detachment of red blood cells adhering to surfaces by specific antigen-antibody bonds. **Biophys. J.**, 66 : 1222-1230.
126. YAUCH, R.L., FELSENFELD, D.P., KRAEFT, S.-K., CHEN, L.B., SHEETZ, M.P. AND HEMLER, M.E. (1997). Mutational evidence for control of cell adhesion through integrin diffusion/clustering, independent of ligand binding. **J. Exp. Med.** 186 : 1347-1355.
127. YELTON, D.E. AND SCHARFF, D. (1981). Monoclonal antibodies : a powerful new tool in biology and medicine. **Annu. Rev. Biochem.** 50 : 657-680.



→ L Pla

RHEOLOGICAL CHARACTERIZATION OF THE DISSOCIATION OF ERYTHROCYTE AGGLUTINATES INDUCED BY LECTINS

J.F. Stoltz*, R.J. Rasia**, J.R. Valverde***, L. Pla***



*Angiohematologie - Hemorheologie - UMR CNRS 7563 - Faculté de Médecine (Université H. Poincaré) - 54500 Vandoeuvre lés Nancy - France

**Grupo de Optica Aplicada - IFIR (CONICET - Univ. Nac. Rosario) - Rosario - Argentina

***Lab de Inmunohematologia, Hemorreologia e Inmunogenética - Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas - Universidad Nacional de Rosario - Argentina

Abstract: Energy evolved from hemagglutination reaction or spent in dissociating erythrocyte agglutinates has been proved to be an excellent parameter for analyzing cell-cell interactions mediated by bridging molecules such as antibodies or lectins. We developed a new rheo-optical method to estimate the energy of dissociation of red blood cell agglutinates. In a Couette shear field agglutinates can be dissociated until a suspension of monodispersed cell is obtained. Intensity of light backscattered by suspended agglutinates increases during their mechanical dissociation. Variation of backscattered light intensity correlates with the energy spent in the process. The adhesive energy of erythrocyte agglutination induced by lectins has been estimated by applying this method. Two specific lectins (Dolichus Biflorus agglutinin and Ulex Europaeus agglutinin) and a new lectin obtained from Amaranthus Gruentus seeds which specificity is unknown were studied. Results obtained in this work for Dolichus Biflorus lectin are comparable with values published by other authors. An asymptotic decrease of adhesive energy was observed when the mechanical dissociation was applied several times on the same sample. Our results suggest that the cell detachment is accompanied by the extraction of membrane receptors. This finding is consistent with results obtained by other authors.

Key words: agglutinate, lectin, dissociation, energy, blood group

Introduction

Lectins are carbohydrate-binding proteins which can be extracted from plants or animals and are capable of recognizing specific glycolipids and glycoproteins whose specificities are linked to glycosil residues. Some lectins can recognize carbohydrate receptor located on the human red blood cell (RBC) membrane leading to cell agglutination. Such lectins are called "*specific*". Other ones can agglutinate RBC of any blood group so they are called "*panagglutinating*" lectins. Other effects can be expected from these proteins on their activity on the cells as lysis or swelling of treated cells.

It is well known that erythrocyte agglutination results from molecular bridging between adjacent cell surfaces. Such cell adhesion is carried out with a little spent of energy. Separation of agglutinated cells can be attained if the work done by external stresses overcome the net agglutinating energy. In a previous paper [1] the authors reported a new rheo-optical method to analyze immunological erythrocyte agglutination by shear dissociation of suspended agglutinates and backscattering light measurement [2].

Backscattered light intensity correlates very well with the specific area (per volume unit) of suspended particles (isolated cells and agglutinates). Differences between backscattered intensities corresponding to agglutinates and to completely dissociated cells are used to estimate the specific area of membrane adhered cell. Hence the energy of agglutination can be expressed in term of contact surface in the agglutinate state. A parameter estimating the specific energy of cellular adhesion can be derived from data of backscattering light variation obtained while agglutinated cells become dissociated in a Couette shear field.

Theoretical approach

Rheological analysis of erythrocyte suspension requires the knowledge of aggregate formation and dissociation processes [3]. It is very important to emphasize at the outset that our calculations are approximate because an idealized condition of agglutination equilibrium has been assumed and some components of the energy in the equation of conservation of energy have been neglected. When shear stress generated in a Couette flow is applied to suspended agglutinates, they can be dissociated into smaller particles until only isolated cells remain in suspension.

Agglutinate dissociation increases the total scattering area of specific free surface increasing the diffuse reflectivity r of suspended particles [4]. The diffuse reflectivity can be related to the specific scattering area σ [5]

$$\frac{\sigma}{\sigma_0} = \frac{r}{r_0} \cdot \left[\frac{1-r_0}{1-r} \right]^2 \cong \frac{r}{r_0} \quad (1)$$

where r_0 and σ_0 are the diffuse reflectivity and the specific scattering area of completely dispersed red blood cells in suspension (monodispersed RBC). The macroscopic reflectometric relationship can be related to the specific bridging area average over the flow cross section [2]

$$\frac{r_c}{r_0} = 1 - \frac{r}{r_0} \cong \frac{\langle \sigma_c \rangle}{\sigma_0} \quad (2)$$

During dissociation process carried out under constant shear stress, backscattered light intensity increases with time. This variation can be fitted by an exponential expression

$$r(t) = r_0 \cdot (1 - e^{-t/\beta}) \quad (3)$$

that is, the velocity of dissociation is depending on β . This parameter characterizes the dissociation process. By combining eqs. (2) and (3)

$$r_c(t) = r_0 \cdot e^{-t/\beta} \quad \text{and} \quad \sigma_c(t) = \sigma_0 \cdot e^{-t/\beta} \quad (4)$$

Specific energy of adhesion (φ) have been defined as the energy required to separate an unit area of contact surface of adhered cells, starting from equilibrium distance [6]. Considering two self adhered cells (doublet) suspended in a viscous fluid, the balance of energy at the equilibrium state of adhesion can be expressed in a global form

$$\frac{dw_F}{dt} = -\varphi \cdot \frac{d\sigma_c}{dt} \quad (5)$$

where w_F is the specific work produced by external stresses. In expression (5) we have neglected variations of elastic and kinetic energies in order to simplify next deduction. By deriving expression (4) and introducing it in eq. (5)

$$\frac{dw_F}{dt} = -\varphi \cdot \left[\frac{\sigma_0}{\beta} \cdot e^{-t/\beta} \right] \quad (6)$$

integrating eq.(6)

$$w_F = \varphi \cdot \frac{\sigma_0}{\beta} \cdot \int e^{-t/\beta} dt \cong \varphi \cdot \sigma_0 \cdot \frac{t}{\beta} \cdot \left[\frac{S_0 - S_1}{S_0} \right] = \left(\varphi \cdot \sigma_0 \cdot \frac{t}{\beta} \right) \cdot E_d \quad (7)$$

where E_d can be defied as the dissociating fraction of the total work done by the instrument during the dissociation process. Surfaces S_0 and S_1 are indicated in Fig. 1, being $S_0 = r_0 \cdot t$.

The force F required to dissociate the cell doublet attains its maximum value at the moment when the doublet is completely dissociated [7]. Its varies as the specific adhesive energy does. In a Couette flow the doublet will be separated if the critical shear stress acting on the exposed cell surface overcomes the force F .

The cell rotation in a Couette flow reduces the effectiveness of shear stress by a factor $\Gamma=10$ [2]. This equilibrium condition leads to the calculation of the specific adhesive energy

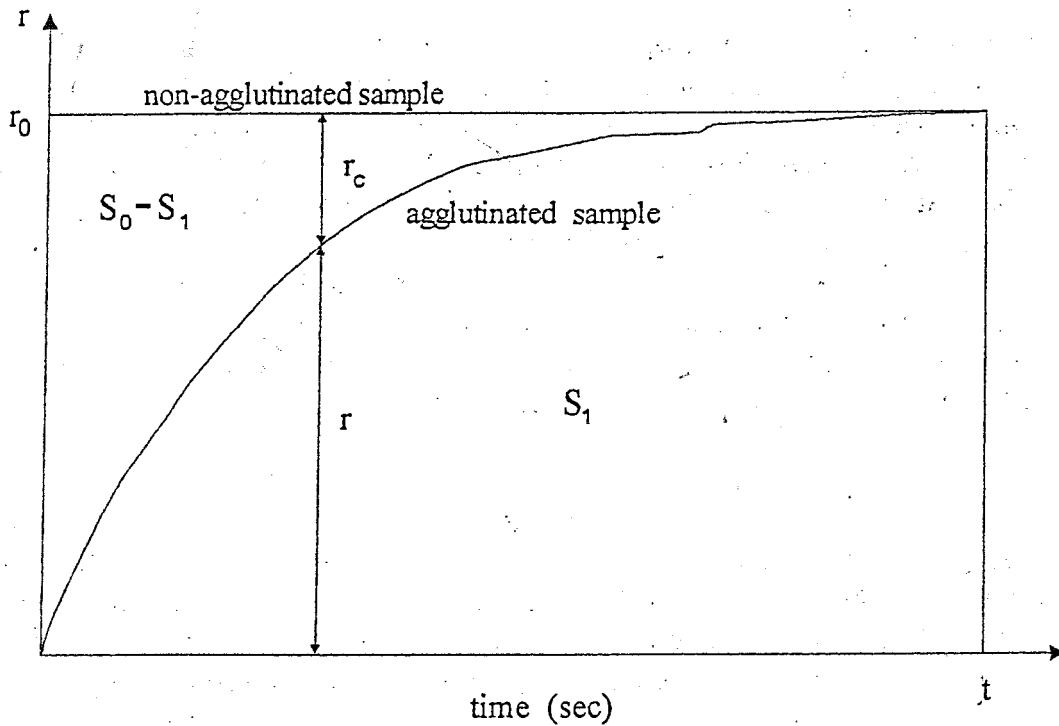


Fig. 1. Principle of determination of the parameter of energy E_d .

$$\phi = \frac{\dot{\gamma} \cdot \eta \cdot \sigma_0 \cdot E_d}{2 \cdot \pi \cdot R_p \cdot \Gamma} \quad (8)$$

where $R_p = 10^{-4}$ is the curvature radius of the bridged surface at the moment of the complete separation of cells, $\dot{\gamma}$ is the shear rate and η is the viscosity of the suspending medium.

Materials and methods

Lectins: DBA (Dolichus Biflorus Agglutinin) and UEA (Ulex Europaeus Agglutinin) were provided by the ETS of Lorraine (CHU - Nancy - France). ACA (Amarantus Cruentus Agglutinin) was obtained from seeds provided by the "Grupo de Energia Solar - Instituto de Fisica Rosario - Argentine", according to the technique as described by Moore et al [8].

Suspending Medium (SM): was prepared by dissolving Dextran 70 (D.1537 Sigma Chemical Co.) at 4.1% (w/v) in phosphate buffered saline (PBS). Its viscosity was adjusted to 1.8 mPa.sec at 36°C, measured in a Contraves LS 30 viscometer.

Fresh Human Erythrocytes of A1, A2, O and B blood groups were provided and classified by the ETS of Lorraine (France). Red blood cells (RBC) were washed three times in PBS and resuspended in SM at 40% hemotocrit.

Sample preparation: Serial two fold dilutions (from 1/4 to 1/64) of each lectin was prepared in suspension and gently homogenized. Control samples were also prepared by suspending washed erythrocytes in SM containing no lectin in solution.

Method: Experimental works were carried out using an Erythroaggregameter® (constructed by Regulest-Florange-France) which was described in detail in elsewhere [9]. An infrared (780 nm) laser beam incites laterally on the sample contained in the gap between two concentric cylinders. Particle suspensions are sheared between the inner static and the outer transparent rotating cylinder under constant shear rate (596 sec^{-1}). Laser backscattered intensities are measured every 10 msec by a solid state photodetector, during the total dissociation process (60 seconds). Read data are continuously transferred and stored in a PC while the curve of backscattered intensity vs. Time displayed in the PC monitor. This curve is called the "dissociation curve"[1].

A volume of 1.5 ml of the sample is poured into the gap between both concentric cylinders of the instrument. Cylinder rotation starts and the maximum shear rate is applied during 10 seconds. Rotation is then stopped and the sample is maintained at rest during 6 minutes to complete the erythrocyte agglutination. At the end of this period the outer cylinder is put again in rotation at maximum speed during 60 seconds. Six thousand readings are taken during this period, transferred and stored. Calculations performed on stored data leads to the obtention of five dynamic parameters which are displayed simultaneously with the dissociation curve.

Dissociation test was repeated five times on each agglutinated sample without remove it from the instrument. Sample was maintained at rest six minutes between repetitions in order to reestablish the agglutinated state. These repetitions were carried out to investigate if the energy spent during mechanical dissociation varied with successive repetitions.

Results and discussion

Several papers concerning cell-cell interaction mediated by lectin recognizing RBC surface glycoproteins and glycolipids and inducing erythrocyte agglutination have been published [10-18]. Only few of these papers analyze the energy evolved from the reaction. The technique applied in the present work can provide a useful parameter (E_d) to estimate the specific energy of dissociation of agglutinates (ϕ), which correlates with the energy evolved from the agglutination reaction. By measuring the intensity of light backscattered by suspended agglutinates under shear, the specific energy of dissociation has been approached.

To further validate the laser backscattering method for approaching the agglutination energy by dissociation of agglutinates we analyze by this method the binding reaction induced on human erythrocytes by two specific lectins and one lectin which specificity was unknown.

The macroscopic reflectivity relationship r/r_0 is suitable for interpreting the variation of adhered cell surfaces when agglutinates become dissociated by shear stresses in a Couette flow system. The quantitation of contact surface of agglutinates and its variation during shear separation provide a parameter of energy (E_d) and then a way for estimating the surface adhesive energy of bridged membranes in dynes per cm.

Erythrocytes of A₁, A₂, B and O groups have been tested against three vegetal lectins (DBA, UEA and ACA). Mean values (and SD) of ϕ (10^{-4} dyn/cm) are presented in table 1 for two lectin dilutions (1/4 and 1/32). Between these two dilutions linear regression of specific energy on the logarithm of dilution has been observed. The lowest dilution (1/4) becomes a threshold of saturation while the highest dilution (1/32) appears as limit for detectable energy.

Specificity of each lectin is also indicated in table 1, expected for ACA this agglutinin appears as a panagglutinating lectin. However ACA reacts differently with each tested blood group.

Studies carried out by Evans et al [12,13] on erythrocytes agglutinated by a monoclonal antibody specific to glycophorin A and also by a lectin extracted from *Helix Pomatia* (anti-A specific) demonstrated that mechanical separation of bonded cells was accompanied by the extraction of membrane receptors. This finding suggested that the agglutination energy is better estimated during agglutination rather than dissociation of agglutinates, hence, a repeated dissociation of agglutinates could lead to a decrease of spent energy with the number of repetitions. To test this assumption five repetitions of the mechanical dissociation were carried out on each agglutinated sample which was maintained six minutes at rest between two consecutive repetitions. The reduced value of E_d (R_d) was calculated at each repeated process

$$R_d = \frac{E_d^{(n)}}{E_d^{(0)}}$$

where $E_d^{(n)}$ is the energy parameter corresponding to the n th. Repetition and $E_d^{(0)}$ is the energy parameter corresponding to the first dissociation.

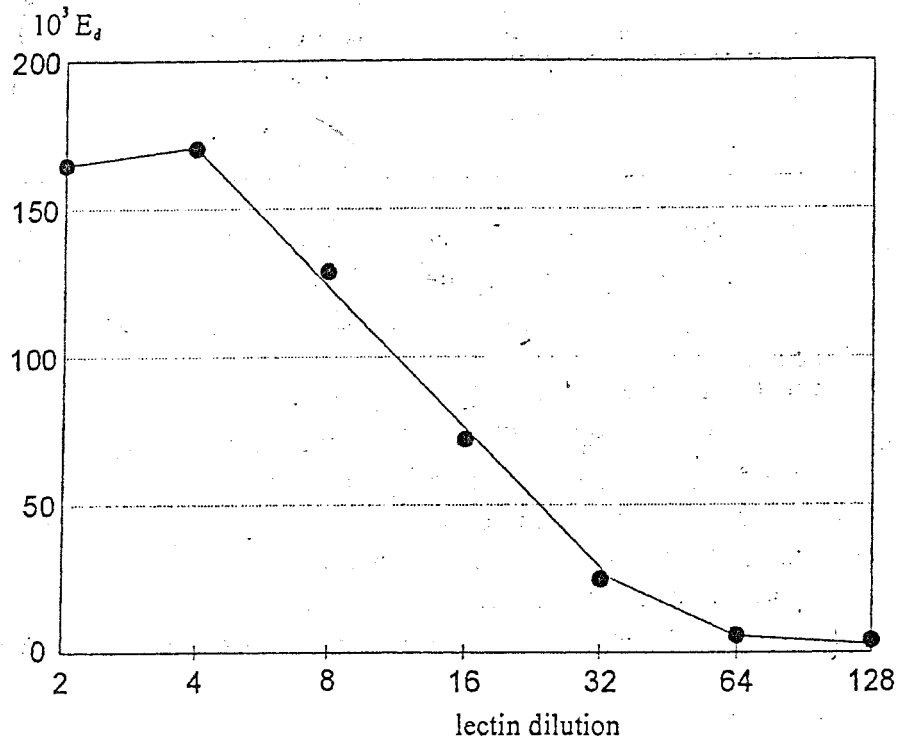


Fig. 2. Parameter of energy E_d plotted against lectin dilution.

Fig. 3 shows the plot of R_d values vs. the number of repetitions. R_d decreases asymptotically with repetitions of mechanical dissociations.

The dissociation of agglutinates in a shear field is a very complex phenomenon. Some work must be done to overcome the energy evolved during the agglutination reaction and stored. The behavior results from the ability of erythrocytes to store energy during agglutination and restore this energy during separation. However, as it was demonstrated by Evans et al. [12-13] adhesive energy should be better estimated during agglutination rather than during dissociation.

In our study we used an Erythroaggregameter® to measure and store backscattered light data from RBC agglutinates under shear dissociation in a Couette flow system. From those data we calculated the specific adhesive energy corresponding to different concentrations of lectin molecules on erythrocytes of A₁, A₂, O and B groups.

Table 1.
Mean Values and (Standard Deviations) of Specific Energy (ϕ) Required to Dissociate RBC Agglutinates Induced by DBA, UEA and ACA Lectins.

RBC group	Sample number	Lectin	Specificity	ϕ [10^{-4} dyn./cm]	
				1/4	1/32
A ₁	8	DBA	anti-A	1.23 (0.21)	0.53 (0.04)
		UEA	anti-H	0.03 (--)	0.03 (--)
		ACA	unknown	1.12 (0.28)	0.52 (0.06)
A ₂	5	DBA	anti-A	0.08 (--)	0.05 (--)
		UEA	anti-H	0.37 (0.05)	0.17 (0.03)
		ACA	unknown	1.63 (0.22)	0.74 (0.06)
		DBA	anti-A	0.02 (--)	0.02 (--)

O	8	UEA	anti-H	0.46 (0.04)	0.21 (0.03)
		ACA	unknown	1.85 (0.21)	0.85 (0.09)
B	4	DBA	anti-A	0.04 (--)	0.03 (--)
		UEA	anti-H	0.21 (0.01)	0.10 (0.01)
		ACA	unknown	0.89 (0.11)	0.42 (0.05)

As shown in Table 1 for DBA at maximal concentration on RBC of A₁ group the specific energy is 1.23×10^{-4} dyn./cm. This result appears very near of the energy calculated by Sung et al. [17] who determined the specific energy of 1.15 dyn./cm for DBA and A₁ erythrocytes having a density of 365 molecules of lectin per μm^2 .

Values of R_d decreases asymptotically as increases the number of mechanical dissociations applied to the sample as it is shown in Fig. 3. This finding suggests that the number of molecular bridges between bonded cell surface decreases by mechanical extraction of antigen receptors from the cell membrane. Hence the strength of molecular bridges to mechanical separation could be greater than membrane strength to mechanical extraction.

The results reported in this paper can be summarized as follows:

- The Erythroaggragmeter® enables the specific energy of RBC agglutinate dissociation to be estimate.
- A linear regression of E_d on the logarithm of lectin dilution has been observed between 1/4 and 1/32 dilutions.
- Agglutinate dissociation energy decreases as the mechanical dissociation process is repeatedly applied on the same agglutinated sample. This behavior suggest that the some membrane

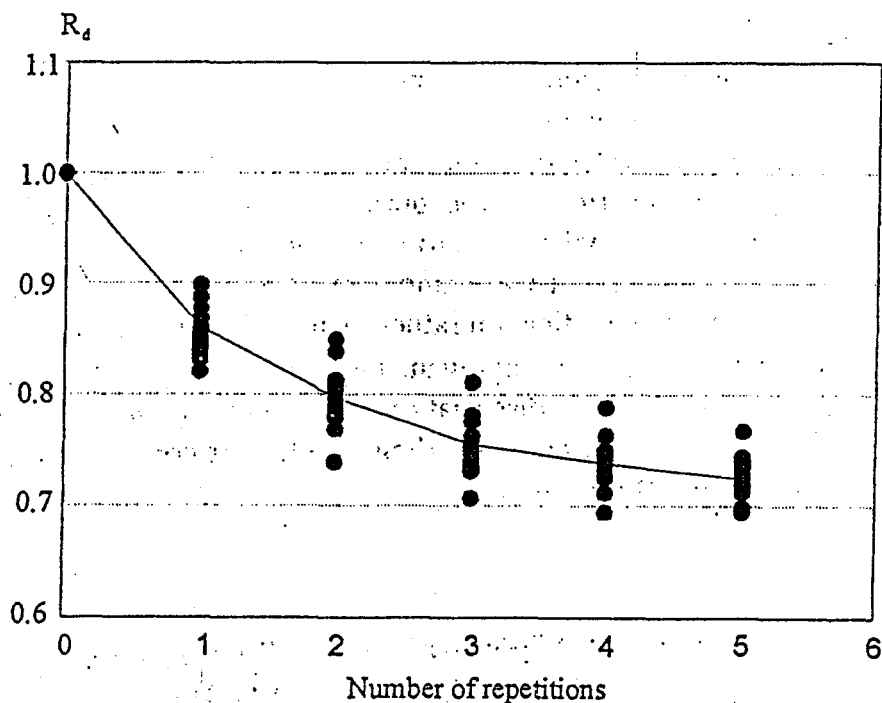


Fig. 3. Variation of E_d with the number of repetitions of mechanical dissociation.

receptors are extracted during shear detachment of bonded cells.

- The lectin extracted from *Amarantus Cruentus* seeds appears as a panagglutinating agglutinin. However it shows some specificity evidenced by differences between dissociation energies corresponding to different blood groups.

Acknowledgement

This research was supported by grants from CONICET (Argentina) and the Foreign Affairs Ministry (France) within a program of the Lorraine Region.

References

1. RASIA R.J., RASIA-VALVERDE J.R., STOLTZ J.F. Weak A blood subgroup discrimination by a rheo-optical method: a new application of laser backscattering. *Opt Eng*, 35: 20-25, 1996.
2. SBABRE P., BITBOL M., MILLS P. Cell disaggregation behavior in shear flow. *Biophys J*, 51: 795-807, 1987.
3. COPLEY A.L. Introduction: Agrégation et désagrégation érythrocytaires in *Hémorhéologie et agrégation érythrocytaire* J.F. Stoltz. Ed. Editions Médicales Internationales. Paris (France). 9-21, 1986.
4. MILLS P., QUEMADA D., DUFAUX J. Etude de la cinétique d'agrégation érythrocytaire dans un écoulement de Couette. *Rv Phys Appl.*, 15: 1357-1366, 1980.
5. MILLS P., SNABRE P. Agrégométrie optique de la suspension sanguine. In *Techniques avancée en Hémorhéologie*. DPIC - INPC Pucl. 580-598, 1983.
6. SKALAK R., ZHU Ch. Rheological aspects of red cell aggregation. *Bioheology*, 27: 309-324, 1990.
7. SNABRE P., MILLS P. Role des interactions électrostatiques dans le phénomène d'agrégation érythrocytaire. In *Hemorheologie et agrégation érythrocytaire*. J.F. Stoltz (ed.) Edition Médicales Internationales. (Paris-France) 98-110, 1981.
8. MOORE B.P.L.: Préparation des lectines. In *Techniques sérologiques et immunologiques*. Societé Canadienne de la Croix Rouge. 175-186, 1981.
9. PIGNON B., MULLER S., JOLLY D., SIADAT M., PETITFRERE E., VESSEL B., DONNER M., POTRON G., STOLTZ, J.F. Validation d'une méthode d'approche de l'agrégation érythrocytaire par retrodiffusion laser. In *Hémorhéologie et Agrégation Erythrocytaire*. Vol. 2. Applications Cliniques. J.F. Stoltz (ed.) Edition Médicales Internationales. (Paris-France) 65-74, 1989.
10. CHIEN S., SUNG L.A., SKALAK R. Energy balance in red cell aggregation. *Bibl Anat*, 20: 207-210, 1981.
11. CHIEN S., SUNG L.A. Bases physiocochimiques et implications cliniques de l'agrégation des globules rouges. In *Hémorhéologie et Agrégation Erythrocytaire*. J.F. Stoltz (ed.) Edition Médicales Internationales. Paris (France). 65-74, 1989.
12. EVANS E., BERK D., LUNG A. Detachment of agglutinin bonded red cells (I) Forces to rupture molecular point attachment. *Biophys J*, 59: 838-848, 1991.
13. EVANS E., BERK D., LUNG A., MONANDAS N. Detachment of agglutinin bonded red blood cells (II) Mechanical energies to separate large contact cells. *Biophys J*, 59: 849-860, 1991.
14. SUNG L.A., KABAT E.A. Agglutination induced erythrocyte deformation by two blood group A-specific lectin: Studies by light and electron microscopy. *Biorheol.* 31: 353-364, 1994.
15. SHARON N., LIS H. Lectins: cell agglutination and sugar specific proteins. *Science*, 177: 949-959, 1972.
16. SUNG L.A., KABAT E.A., CHIEN S. Interactions of lectins with membrane receptors on erythrocyte surfaces. *J Cell Biol*, 101: 646-651, 1985
17. SUNG L.A., KABAT E.A., CHIEN S. Interaction energies in lectin induced erythrocyte aggregation. *J Cell Biol*, 101: 652-659, 1985.
18. BIRD G.W.G. Anti-A hemagglutinins in saline extracts of dolichus biflorus-Belgaum 1-1-8: A comparison with human Anti-A sera. *Indian J Med*, 40: 289, 1952.

Реологическое описание распада агглютинаций эритроцитов, вызванных лектинами

Ж.Ф.Штольц, Р.Ж.Разиа, Ж.Р.Валверд, Л.Пла

Энергия, выделяющаяся при реакции слипания эритроцитов или затрачиваемая в процессах распада агглютинаций (склеенных групп) эритроцитов, оказывается прекрасным параметром для описания взаимодействия клеток, вызванных такими молекулами как антитела и лектины. В данной работе развит новый рео-оптический метод для оценки энергии распада агглютинаций красных кровяных клеток. Распад агглютинаций происходит в сдвиговом течении Куэтта вплоть до образования суспензии монодисперсных клеток. Интенсивность отраженного света после распада агглютинаций увеличивается из-за увеличения площади, отражающей свет. Энергия адгезии агглютинаций, вызванных лектинами, оценена теоретически с помощью этого метода. Два ранее известных лектина (*Dolichus Biflorus agglutinin* и *Ulex Europaeus agglutinin*) и новый лектин, полученный из семян тропического амарантового дерева, были изучены. Результаты, полученные для нового лектина, были сравнены с данными других авторов. Асимптотическое уменьшение энергии адгезии было отмечено, если механическая диссоциация проводилась несколько раз на одном и том же образце. Полученные результаты подтверждают, что разделение клеток сопровождается извлечением мембранных рецепторов. Это наблюдение согласуется с результатами других авторов. Библ. 18.

Ключевые слова: гемодинамика, агглютинация эритроцитов, лектин, диссоциация, энергия, отражение света.

Received 13 May 1998

Photonics in Immuno-Hemo-Rheology

Rodolfo J. Rasia⁽¹⁾, Juana R. Valverde⁽²⁾, Luciana Almada⁽²⁾, Mabel D'Arrigo⁽²⁾ and Laura Plá⁽³⁾

(1) Optica Aplicada, IFIR (CONICET-UNR), Bv.27 de Febrero 210 bis, 2000.Rosario, Argentina - FAX +54 341 482 1772 - E Mail : rasia@ifir.ifir.edu.ar

(2) Dpt. Bioquímica Clínica, Fac.Cs.Bioquímicas, U.N.Rosario, Suipacha 531, 2000.Rosario, Argentine

(3) Angiologie-Hemorheologie, Fac.Medecine, U.H.P., Nancy I, BP184, 54500 Nancy, France

1. Introduction

Photonics includes the technology of generating and managing light and other forms of radiant energy whose quantum unit is the photon, and applying them to solve research and clinical problems. This discipline has a successful history in helping a wide range of technologies like spectroscopy, laser diffraction and scattering, microscopy, imaging and optical biosensors. Photonic measures of physiological status are attractive because they can provide a simple, noninvasive, yet real-time assessment of biological conditions.

Three techniques based on Photonics have been developed in our laboratories to obtain data helping in clinical diagnostic purposes.

1) We have developed a new technique to evaluate the adhesion energy of erythrocyte agglutination using an Erythroaggregometer. This method was applied to help in the diagnostic of immunologic haemolytic anemias and in the quality control of polyclonal and monoclonal antibodies.

2) A rheo-optical cell, called ESR-meter that applies laser extinction by suspended particles has been developed to analyse erythrocyte aggregation and sedimentation rate.

3) The analyse the cellular binding energy of cells adhered to the chamber wall was performed with a modified Richardson's flow chamber mounted on the stage of an optical inverted microscope coupled to a digital video processor. This technology was applied to analyse adhesion molecules responsible of microcirculation impairment.

2. The dissociation method

Measurement of the physical strength or energy dissipated by bonds linking red blood cells to each other is an important requisite to characterize the adhesion

process occurring when those cells are agglutinated by specific antibodies directed against their antigens [1, 2].

Laser light backscattered by suspended particles under shear stress was applied in the Erythroaggregometer (Regulest - Florange - France) to analyse erythrocyte aggregation. We have improved this technique and adapted it for evaluating the energy of adhesion of erythrocytes agglutinated by immunologic reaction [3].

The intercellular binding energy is evaluated by estimating the shear work done to fully dissociate red cells agglutinated by antibodies. Skalak et al. [1,2,4,5,6,7] have made a general statement of energy conservation for the case in which contact area between cells increases or decreases: the rate of work per surface unit (dw / dt) done by external forces is proportional to the rate at which energy must be supplied to separate the adhered cells having a common contact surface σ_A

$$\frac{dw}{dt} \cong \gamma \cdot \frac{d\sigma_A}{dt}$$

where γ is the surface adhesive energy. Hence, the changes in the contact surface area are related to the energy supplied to separate bound surfaces.

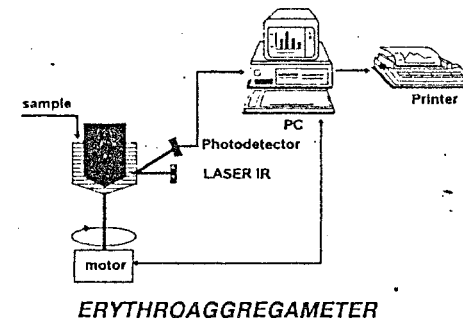


Figure 1. Scheme of the Erythroaggregometer

On the other hand there is a correlation between the backscattered light intensity and the specific area (per volume unit) of suspended particles (cells or agglutinates). Adhered surface of cells (σ_A) per unit volume of suspension can be estimated from differences between backscattered light intensities in the agglutinated state and in the monodispersed state of red cells [8]

$$\frac{\sigma_A}{\sigma_0} = 1 - \frac{\sigma'}{\sigma_0} = 1 - \frac{r'}{r_0}$$

σ' is the specific area of agglutinates, r' is the diffuse reflectance of agglutinates; σ_0 is the specific area of monodispersed RBC and r_0 is diffuse reflectance respectively of monodispersed RBC. When RBC non agglutinated the diffuse reflectance $r_0(t)$ is a constant so it appears as an horizontal line parallel to the abscissa axis but if RBC

are agglutinated $r'(t)$ varies with time giving a curve, called dissociation curve which can be adjusted by an exponential expression

$$r'(t) = r_0 \cdot \left[1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \right]$$

In this equation τ is a time characterizing the rate of the backscattering increase, it is called the characteristic time of dissociation (fig. 2).

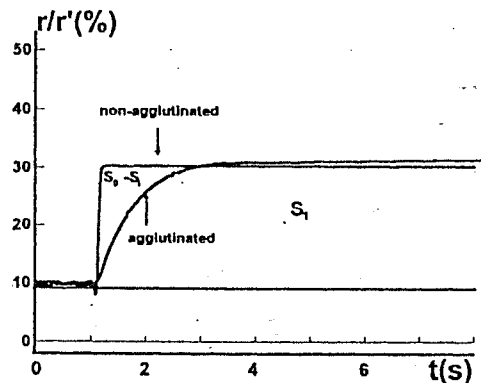


Figure 2 Typical dissociation curves indicating S_0 and S_1 surfaces

Under constant shear stress agglutinates are progressively dissociated decreasing the common contact area σ_A that vanishes in the monodispersed state of cells [9-11]. This process is time dependent and can furnish a good approach of the spent energy by integrating the curve of dissociation. The area subtended under each curve represents the energy non spent in the dissociation process. Hence, the area corresponding to the non agglutinated sample (S_0) represents the total energy furnished by the device and the work done to completely dissociate agglutinates can be calculated

$$\tilde{S} = (S_0 - S_1) = \int (r_0 - r') \cdot dt = r_0 \cdot \int \left(1 - \frac{r'}{r_0} \right) \cdot dt$$

S_1 represents the energy remaining from the dissociation of agglutinates. Now we introduce a new parameter E_D , called energy parameter, to approach the energy of dissociation [3,10,11] with:

$$E_D = \frac{S_0 - S_1}{S_0} = \frac{\int (r_0 - r') \cdot dt}{\int r_0 \cdot dt}$$

The Derjaguin theory [12] relates the disruption force F_E to the surface adhesive energy (γ) and to the mean curvature radius (R_C) of bridged membrane surfaces just before the adhesion rupture. Hence, the surface binding energy, also called the

fracture energy [1], can be calculated from Couette flow experimental data using the Derjaguin equation [12]

$$\gamma = \psi \cdot \frac{A_0 \cdot \zeta}{2\pi R_C} \cdot E_D$$

where ζ is the shear stress applied by the device over the upper area A_0 of external erythrocytes and ψ is a fitting coefficient related to the random orientation and the shape of agglutinates in a critical shear flow [9].

This method was successfully applied in helping the diagnostic of immunologic hemolytic anemias (see table I) and to the quality control of monoclonal antibodies.

TABLE I

Parameters	control	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4	Patient 5	Patient 6	Patient 7	Patient 8	Patient 9
MCHC (20°C) (g/dl)	32 -37	61.2	56.3	44.9	70.9	39.2	257.0	32.8	63.7	37.2
DAT (polyspecific + complement)	negat.	+	+	+	+	negat.	+	+	+	+
Title	1/16	1/8	-	1/16	1/1024	1/32	1/256	1/16	1/16	1/8
E_D a 37°C	0.0	14.6	29.3	6.5	2.5	15.1	0.6	0.0	0.0	0.0
E_D a 20°C	3.0±0.8	138.3	52.9	46.5	160.1	39.9	53.3	0.0	100.7	0.0

3. Aggregation and sedimentation of RBC by laser extinction

The sedimentation behavior of particles suspended in a liquid is a subject of great interest in fields such as chemistry and chemical engineering. But also in medicine the erythrocyte sedimentation rate (ESR) has been empirically used with a common interpretation: an increase in ESR is observed during inflammation or when globulins are elevated in the serum [13, 14, 15]. ESR is interdependent with the phenomenon of erythrocyte aggregation, consequently both determinations are important data in helping clinical diagnosis of microcirculatory impairments.

Optics and photonics became very useful tools in the development of medical instruments because their non invasive characteristics. Both disciplines have contributed to the development of a lot of devices giving precise scope of different biological processes involving red blood cell adhesion [16, 17, 18]. It is well known that both, light scattering and absorption are sensitive phenomena which have been successfully used to build technologies applied in the diagnosis of several diseases. We have developed a new device, the ESR-meter (figure 3), that applies total laser extinction to the analysis of the self-aggregation and sedimentation of red blood cells [19]. Kinetics of both red cell aggregation (sylectogram) and sedimentation (ESR) (fig. 4) can be recorded by measuring the rate of extinction of a laser beam traversing the cell suspension. A laser diode beam ($\lambda = 680$ nm) traverses vertically the erythrocyte suspension and falls on the bottom tip of a light guide partially immersed

in the suspension. This guide leads the laser light onto the windows of a photodetector that measures the light extinction and stores the output signal in a analog-digital converter.

A special relationship exists between the light extinction and the aggregation time τ when the aggregation process is fitted by a time function of the form (figure 4):

a and b are the characteristic coefficients of the equation

$$y(t) = a + b \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right)$$

y_{\min} : is the minimum value of $y(t)$

AMP: is the amplitude of the sylectogram

$t_{1/2}$: is the time at which $y(t) = \frac{1}{2} \text{AMP} + y_{\min}$

$S_1 / S_0 = [A / (A+B)]$: is the ratio of two surfaces enclosed by the sylectogram.

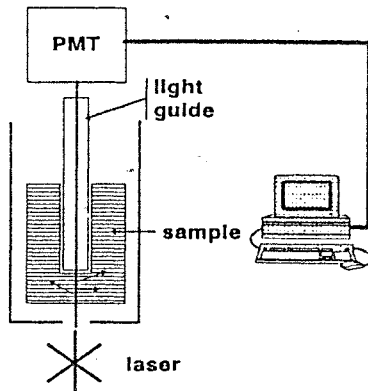


Figure 3. Schematic of the ESR-meter

When the aggregation-sedimentation process starts, the photodetector output signals are transmitted to an analog-digital converter that memorizes 256 data during 25 minutes. During the first phase (approximately 5 minutes) extinction decreases because erythrocytes tend to aggregate, suspended particles become greater and less numerous, both effects reduce light scattering. During the second phase the formed aggregates become to settle increasing the extinction of light. Both phases are clearly differentiated in the aggregation-ESR curve (figure 4). This second phase usually presents a smooth slope (P_1), a secondary steeper slope (P_2) and a final slope (P_3). An additional parameter is the total amplitude of the ESR curve which correlates very well with ESR values of the Westergren method.

We have analyzed the aggregation parameters and the three slopes of each ESR curve which might be relevant not only to screen inflammation or immunological diseases but also to monitor patients such as diabetic patients and to evaluate

therapies and treatments. In the Table II we have presented all the nine parameters for two blood samples, one from a healthy donor and the other from a diabetic patient

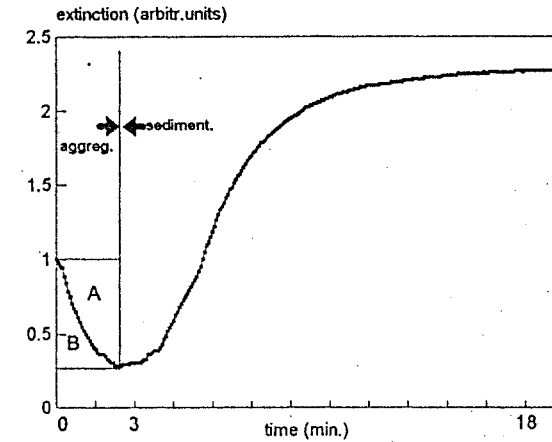


Figure 4 Typical aggregation-sedimentation curve

TABLE II

Sample	Aggregation parameters					ESR parameters				
	C_0	C_1	AMP	y_{\min}	$t_{1/2}$	S_1/S_0	$10^3 P_1$	$10^3 P_2$	$10^4 P_3$	H
normal	0.886	0.0033	0.463	0.537	41.77	0.342	4.97	1.34	3.10	0.836
Diab.	0.960	0.0023	0.267	0.733	44.67	0.173	1.29	3.41	4.58	0.672

4. Adhesion energy studies with the flow channel technique

Cells of the vascular system are constantly exposed to mechanical hemodynamic actions due to the blood flow. The forces generated in the vasculature include the frictional force, a fluid shear stress caused by blood flowing tangentially across the vascular endothelium, a tensile stress caused by vessel wall deformations and a normal stress caused by hydrodynamic pressure.

We will restrict our discussion to analyzing the mutual adhesion of circulating cells (erythrocytes) and the adhesion of these cells to a tissue surface or to a biomaterial surface.

In vivo studies aimed at understanding cellular responses to shear forces have the inherent problem that they cannot quantitatively define the exact features of the hemodynamic environment. Hence it is very difficult to verify if the resultant response is due to shear stress or some other factor associated with the hemodynamic environment.

Shear stress is typically generated in vitro by flowing fluid across immobilized cells under controlled kinematic conditions in the laminar flow regime. To accomplish this, a parallel plate flow chamber was built that allows one to have a controlled and well defined flow environment. It is based on the chamber geometry, which is fixed while the flow rate through the chamber is variable. In addition, individual cells can be visualized in real time or recorded using video microscopy. Assuming parallel plate geometry and Newtonian fluid behavior, the shear stress on the cell exposed surface in the flow chamber is calculated as [20, 21]

$$\tau_w = (6 \cdot Q \cdot \eta) / (b \cdot h^2)$$

where Q is the volumetric flow rate, η is the fluid viscosity, b and h are the height and the width of the channel.

The flow chamber [22] (a modified Richardson's flow chamber) was designed such that the entrance length is very small compared with the effective length of the flow chamber (Frangos et al, 1985 pp 1639). Therefore the parabolic flow becomes fully developed over the entire length of the chamber because the entry effects are negligible.

Flow chamber consists of a machined block of transparent acrylic and a glass coverslip sandwiching a silastic gasket whose thickness (0.25 mm) determines the channel depth. The three components are held together by vacuum, thereby ensuring a leakproof chamber. For short-term experiments the flow chamber has an entry port connected to a syringe pump and an exit port connected to a waste reservoir. For long term experiments, the chamber can be placed in a flow loop with a peristaltic pump. Red blood cells are introduced into the chamber by a syringe and left to settle and adhere on the glass coverslip after what the fluid flow starts.

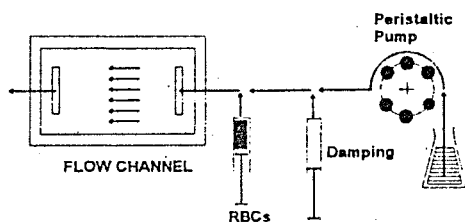


Figure 5. Flow chamber circuit

We have built a flow chamber, having a channel 250 μm thick which was mounted on the stage of an optical inverted microscope connected to a digital video system. Using this device we have analyzed the separation of self-adhered cells bound to the chamber wall and also the peeling of a single cell adhered to the coverslip. An

peristaltic pump perfuses a saline solution through the chamber in laminar Poiseuille flow inducing shear rates varying from 25 to 600 s^{-1} .

When a Tris buffered saline solution containing 1.4% of Dextran 40 (TSD) was pumped through the channel the shear stress acting on a doublet that has settled and adhered to the glass coverslip was calculated from the flow rate. With increasing levels of shear stress in the channel laminar flow, external cells of agglutinates are separated by peeling (fig. 6). The shear force and the relative displacement of the top erythrocyte are measured at each shear step and these data was used to compute the intercellular binding energy due to monoclonal ligand-receptor recognition.

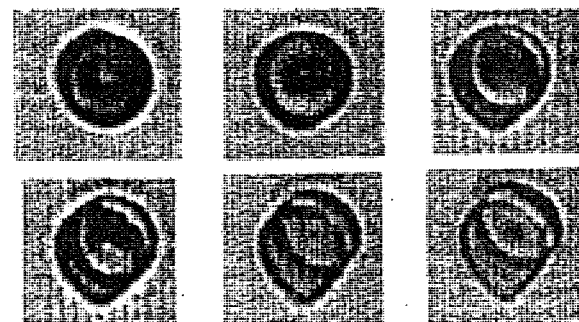


Fig.6 Digitized images of increasingly dissociated doublet

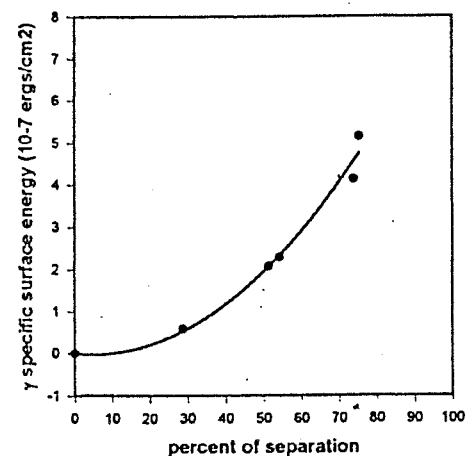


Fig. 7. Surface adhesive energy as a function of fractional area separation

When TSD was pumped through the channel the shear stress acting on a single erythrocyte that has settled and adhered to the glass coverslip was also calculated

from the flow rate. The specific energy (γ_s), that is, the energy required to disrupt a unit area of adhesion is, then:

$$\gamma_s = \frac{\tau_w(Q) \cdot d \cdot A_0}{2 \cdot A_i} = \frac{\tau_w(Q) \cdot d}{2 \cdot \phi}$$

where A_0 is the exposed area of the cell, A_i is the detached area, d is the distance through which the cell moves and $\phi = A_i / A_0$ is the fractional area separation.

As the level of shear stress rises in the channel, the adhered cell rolls being separated from the wall chamber. The shear force and the relative displacement of the erythrocyte are measured at each shear step and these data were used to compute the binding energy (fig. 7) by adhesion molecules (hialuronate which is the ligand of the membrane receptor CD 44). It may be seen that the adhesion energy appears to increase as the area of contact decreases. Such results imply some molecular rearrangement producing an increased concentration of cross links at the edge of the contact area as it becomes reduced. This concentration has been demonstrated by fluorescent labeling studies [23].

Acknowledgements

The authors are particularly grateful to Professor Jean F. Stoltz for his technical assistance and his useful discussions with these studies.

References

- [1] Skalak R., Zarda P.R., Jan K.M. and Chien S. Mechanics of rouleaux formation. *Biophys. J.* 35 (1981) 711-781
- [2] Skalak R., Zarda P.R., Jan K.M. and Chien S.. Theory of rouleaux formation. *INSERM. Euromech 92 - Cardiovasc. and Pulmonary dynamics.* 71, 299-308, (1977)
- [3] Rasia R.J., Rasia-Valverde J.R. and Stoltz J.F.. Weak «A» blood subgroup discrimination by a rheo-optical method: a new application of laser backscattering. *Opt. Eng.*, 35, (1996).20-25
- [4] Skalak R., Tözere A., Zarda P.R. and Chien S.. Strain energy function of red blood cell membranes. *Biophys. J.* 13, 245-264, (1973)
- [5] Skalak, R. and Zhu, Ch. Rheological aspects of red blood cell aggregation. *Biorheol.*, 27, 3/4, (1990) 309-325
- [6] Skalak R.. Aggregation and disaggregation of red blood cells. *Biorheology* 21, 463-476. (1984)
- [7] Skalak R.. Rheology of red cell membrane. *Microcirculation (Grayson and Zingg Eds.)* V.1, 53-70, Plebum Press (1976)
- [8] Mills P. et Snabre P.. Agregométrie optique de la suspension sanguine. In *Techniques avancées en hémorhéologie. DPIC-INPL Publ. (Nancy - France) (M.L.Viriot, S.E.André, M.Lucius, J.F.Stoltz -Eds.).* (1983) 580-598.

- [9] Snabre P., Bitbol M., and Mills P.. Cell disaggregation behavior in shear flow. *Biophys. J.* 51 (1987) 795-807.
- [10] Rasia-Valverde J.R., Rasia R.J., Botté C. and Stoltz J.F.. Approche rhéologique de la réaction de dissociation d'agglutinats immunologiques érythrocytaires : Application à des hématies du sous-groupe A. *Transf. Clin. et Biol.* 4, (1997) 203-211.
- [11] Rasia R.J., Valverde J.R., Gentils M., Cauchois G. and Stoltz J.F.. Rheologic characterization of vegetal lectins by dissociation of induced erythrocyte agglutinates. *Clin. Hemorheol and Microcirc.* (1997) 17, 4, 333-340
- [12] Derjaguin B.V, Muller V.M., and Toporov Y.P.. Effect of contact deformations on the adhesion of particles. *J. Colloid Interface Sci.* 53, (1975) 314-326.
- [13] Bedell S.E. and Bush B.T.. Erythrocyte sedimentation rate: from folklore to fact. *Am. J. Med.* 78, 1001-1009. (1985)
- [14] Burton R.R., Sluka S.J., Krone R.B. and Smith A.H.. The physical characteristics of erythrocyte settling in a liquid medium. *J. Biomech.* 2, 389-396, (1969)
- [15] Westwrgren A.. Die Sekungreaction. *Ergeb inn Med. Kinderheilk.* 26, 577-732, (1924)
- [16] Groom A.C. and Anderson J.C.. Measurements of the size distribution of human erythrocytes by a sedimentation method. *J Cell Physiol.* 79, 127-138, (1971).
- [17] Muralidharan E., Tateishi N. and Maeda N.. A new laser photometric technique for the measurement of erythrocyte aggregation and sedimentation kinetics. *Biorheol.* 31, 3, 277-285, (1994)
- [18] Potron G., Jolly D., Nguyen P., Maillot J.L. and Pignon G.. Approach to erythrocyte aggregation through erythrocyte sedimentation rate: application of a statistical model in pathology. *New. Rev. Hematol.* 36, 241-247, (1994)
- [19] Rasia R. J., Almada L., Valverde J. and Stoltz J. F.. Erythrocyte aggregation and sedimentation rate evaluated by total laser extinction. *Mechanics of fluids and disperse systems rheology and biomechanics.* Vol. 1, 314-321. (1999)
- [20] Chien S., Sung L. A., Kim S., Burke A. N. and Usami S.. Determination of aggregation force in rouleaux by fluid mechanical technique. *Microvasc. Res.* 13, 327-333, (1977).
- [21] Sung L. A., Kabat E. A. and Chien S.. Interaction energies in lectin-induced erythrocyte aggregation. *J. Cell Biol.* 101, 652-659, (1985)
- [22] Patrick Ch. W. (jr.), Sampath R. and McIntire L. V.. Fluid shear stress effects on cellular function. In *The Biomedical Engineering Handbook.* (J.C.Bronzino Ed.) ch.110, 1636-1642, CRC Press and IEEE Press, (1995).
- [23] Vayo M.. Theoretical and experimental analysis of shear disaggregation of red cell rouleaux. Doctor Dissertation, Columbia Univ., N.Y. (1986)

Inmuno-hemo-reología. Análisis termodinámico de la aglutinación eritrocitaria inmunológica

RODOLFO J. RASIA*, JUANA R. VALVERDE**, JEAN F. STOLTZ***,
LAURA V. PLA***, DANIELLE SONDAG****

* Grupo de Optica Aplicada (Bio-Optica), Instituto de Física Rosario (CONICET, U.N. Rosario).

** Inmunología, Departamento Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, U.N. Rosario. *** Laboratorio de Angiohematología-Hemorreología, Facultad de Medicina, Universidad H. Poincaré, Nancy I, Francia.

**** Centro de Transfusión Sanguínea, Centro Hospitalario Universitario (CHU) de Lieja, Bélgica

INTRODUCCION

Los fundamentos de la reología son frecuentemente aplicados para analizar y explicar los fenómenos inmunohematológicos y sus mecanismos. La Hemorreología es una rama de la Biofísica relacionada con el flujo sanguíneo, que estudia la respuesta de la sangre y el tejido vascular a los efectos de coacciones externas. El vocablo compuesto inmuno-hemo-reología ha sido introducido en un intento de dar una identidad a toda la serie de estudios que se llevan a cabo en la interface entre la inmunohematología y la hemorreología.

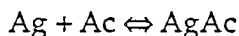
La aglutinación eritrocitaria es un fenómeno de considerable interés para los investigadores del área bioquímica y médica, porque ofrece un modelo para el estudio de las interacciones intercelulares en el área de los sistemas inmunohematológicos.

Actualmente se admite que, en la reacción de aglutinación, la distancia de acercamiento de dos hematíes es crítica para favorecer la formación de los puentes moleculares intercelulares. Sin embargo, esta distancia depende de muchos factores fí-

sico-químicos. En una solución salina, los glóbulos rojos se encuentran rodeados de una nube de iones de cargas opuestas (doble capa eléctrica), lo que crea una diferencia potencial (potencia zeta)¹, lo que depende de la fuerza iónica (μ) y la constante dieléctrica del medio de suspensión (D), y la densidad de carga eléctrica superficial del hematíe (σ).

ENFOQUE TERMODINAMICO DE LA AFINIDAD

La reacción Ag-Ac, que conduce a la aglutinación inmunológica, se produce con disipación de energía. Es posible disociar al inmunocomplejo, que enlaza células adyacentes, restituyendo la energía que disipa en la reacción:



Ag es la concentración de epítopes antigénicos libres (mol/l) y Ac es la concentración de anticuerpos libres (mol/l). La ley de acción de masas, en equilibrio, expresa: *la velocidad de una reacción química es pro-*

proporcional a las masas activas de las sustancias reaccionantes. La aplicación de esta ley a la reacción Ag-Ac permite precisar que, en condiciones de equilibrio, se tiene:

$$\frac{(AgAc)}{(Ag)(Ac)} = \frac{k_{(+)}}{k_{(-)}} = K \quad (1)$$

donde $k_{(+)}$ y $k_{(-)}$ son las constantes de velocidad de asociación y de disociación, respectivamente, del inmunocomplejo y K es la "constante de asociación" del sistema, que mide la "afinidad intrínseca" del anticuerpo por el antígeno. El análisis de las variaciones introducidas por la reacción en las constantes de equilibrio permite describir las variaciones termodinámicas².

Combinando la *variación de energía estándar* (ΔF^0) con la ecuación de Gibbs-Helmholtz, se obtiene la ecuación de Van't Hoff:

$$\frac{\partial (\ln K)}{\partial T} = \frac{\Delta H^0}{RT^2} \quad (2)$$

En el método de Wurmser³, basado en la ley de acción de masas, la concentración de Ac en presencia de concentraciones variables de glóbulos rojos se expresa por una recta cuya pendiente P es proporcional al producto del número medio de sitios antigénicos sobre los hematíes, multiplicado por la inversa de la concentración de haptenes libres, necesaria para bloquear la mitad de los sitios Ac. La variación de entalpía (ΔH^0) puede ser medida por la relación de las pendientes experimentales (P1 y P2), correspondientes a dos temperaturas absolutas diferentes (T1 y T2), calculadas con la ecuación de Van't Hoff:

$$\Delta H^0 = 4.6 \cdot \left| \ln \frac{P1}{P2} \right| \cdot \left| \frac{T1 \cdot T2}{T1 - T2} \right| \quad (3)$$

LAS INTERACCIONES INTERCELULARES

La teoría macroscópica de la adhesión eritrocitaria está basada en la teoría (de la mecánica clásica) de fractura en materiales inertes. La adhesión celular y la disociación de los agregados se plantean en términos de energía de fractura o de adhesión, suponiendo que es aportada por las fuerzas electrostáticas, las fuerzas de van der Waals y los anclajes moleculares. Si la energía de disociación (γ_D) es la misma que la energía de adhesión (γ_A), el proceso total es *reversible*, como sucede en la agregación eritrocitaria normal espontánea. Por el contrario, si el valor de (γ_D) resulta mayor que el valor de (γ_A), el ciclo completo conduce a una pérdida de energía. Es el caso de adhesión celular por anticuerpos o aglutininas, denominada *aglutinación*. Los anclajes son mucho más resistentes a la disociación, y la reacción es considerada *irreversible*.

Volviendo al caso de los hematíes agregados en *rouleaux*, en realidad la energía específica de adhesión γ no es constante durante la separación, sino que aumenta a medida que el área de contacto disminuye⁴. Se produce cierta reacomodación molecular, con un significativo incremento de concentración de anclajes en los bordes del área de contacto, a medida que ésta disminuye.

Se puede analizar la variación temporal de energía y trabajo, estableciendo la ecuación del "principio de conservación de la energía", como se lo hace en el análisis de propagación de fisuras, en estudios de fractura mecánica⁵. Consideremos dos células, mutuamente adheridas, en suspensión en un medio de igual viscosidad y densidad que el plasma sanguíneo. El balance de gradientes temporales de trabajo se expresa:

$$\frac{dw}{dt} = -\gamma \cdot \frac{d\sigma_c}{dt} \quad (4)$$

donde w es el trabajo externo, σ_c es el área específica de contacto celular (por unidad de volumen) y γ es la energía específica de adhesión (por unidad de volumen).

El segundo miembro de la ecuación (4) es positivo cuando σ_c disminuye, indicando que se debe consumir trabajo mecánico para separar las células en contacto. Por el contrario, cuando aumenta la adherencia, aumenta σ_c y el término negativo actúa como fuente de energía. Esta ecuación es válida en ambos sentidos del proceso, independiente del tiempo y la posición. Pueden aparecer dos valores diferentes de γ y constantes, uno para la adhesión y otro diferente para la separación, como sucede en la aglutinación, siendo la energía de asociación superior a la de aglutinación y la reacción es considerada *irreversible*.

Bell⁶ impulsó la teoría microscópica de la adhesión celular en un estudio termodinámico. Constató que durante la separación, se produce una concentración de anclajes en el área remanente de contacto. Dembo⁷ suministró una base molecular para explicar las diferencias de fuerzas macroscópicas requeridas durante la adhesión y la disociación. Evans y Leung⁸ demostraron que en la aglutinación eritrocitaria por lectinas vegetales se producía una concentración de anclajes moleculares en las áreas de contacto, en la medida que las células eran mecánicamente separadas, que no volvía a adherirse espontáneamente, indicando irreversibilidad.

Si se consideran dos células, mutuamente adheridas por ligandos enlazados a sus receptores moleculares superficiales, sobre un área específica de contacto σ_c , podemos suponer que hay v_1 anclajes moleculares de la célula C_1 , anclados a v_2 anclajes moleculares de la célula C_2 . Al alcanzar la condición de equilibrio, la velocidad q por unidad de área, de la reacción de adhesión, es nula y se puede definir un parámetro de equilibrio K :

$$K = \left[\frac{k\{+\}}{k\{-}} \right]^\alpha \equiv \frac{n}{m_1^{v_1} \cdot m_2^{v_2}} \quad (5)$$

$k\{+\}$ y $k\{-}$ son las constantes de velocidad de aglutinación y de disociación respectivamente, m_1 y m_2 son las densidades numéricas de receptores en las células C_1 y C_2 , respectivamente, n es la densidad numérica superficial de anclajes concretados, y α es un índice de orden de la reacción de adhesión (generalmente muy próximo a 1). Esta expresión es equivalente a la "afinidad" analizada por Wurmser⁹ y expresada en la ecuación 1.

EL METODO DE LA DISOCIACION

Intercambio energético. Partimos del balance de energías en estado de equilibrio de la aglutinación, es decir, cuando el número de anclajes que se forman es igual al número de los que se destruyen, planteado en términos de velocidades de variación de la energía externa y del área de contacto, para la unidad de volumen de suspensión:

$$\frac{\partial w}{\partial t} = -\gamma \frac{\partial \sigma_c}{\partial t} \quad (6)$$

w : trabajo específico (por unidad de volumen) de las fuerzas externas.

σ_c : superficie específica (por unidad de volumen) de los aglutinados.

Retrodifusión. De acuerdo con Mills y colaboradores¹⁰, la intensidad láser retrodifundida por una suspensión de hematíes de elevado hematocrito (mayor de 30%) es:

$$\frac{r}{r_0} = \frac{\sigma}{\sigma_0} \quad (7)$$

r : intensidad láser retrodifundida por la suspensión de aglutinados.

r_0 : intensidad láser retrodifundida por la suspensión de hematíes monodispersos.

σ : superficie específica de los aglutinados.

σ_0 : superficie específica de hematíes en monodispersión.

Separación celular progresiva. La superficie específica de contacto entre células es igual a la diferencia entre la superficie específica de los glóbulos rojos monodispersos (σ_0) y la superficie específica externa de los aglutinados (σ)¹¹, es decir, $\sigma_c = \sigma_0 - \sigma$. Se verifica que, cuando los aglutinados son sometidos a un esfuerzo cortante elevado, la superficie específica de contacto disminuye en forma exponencial, hasta alcanzar la monodispersión celular:

$$\sigma_c = \sigma_0 \cdot e^{-\frac{t}{\theta}} \quad (8)$$

expresión gobernada por θ , denominado *tiempo característico de la disociación*. Incorporando las expresiones (7) y (8) a la (4) e integrando resulta:

$$w = \left| \frac{\partial w}{\partial t} dt = \frac{\gamma \cdot \sigma_0}{\theta \cdot r_0} \right|_{r_c} \cdot dt = \frac{\gamma \cdot \sigma_0}{\theta \cdot r_0} \cdot [S_0 - S_1] \quad (9)$$

Los aglutinados, sometidos a un campo constante de tensiones de corte, son progresivamente disociados, de manera que el área de contacto σ_c decrece de manera monótona hasta anularse para la suspensión de células monodispersas^{12,13}. Este proceso es función del tiempo y permite estimar la energía o trabajo realizado. La Figura 1 muestra dos curvas de disociación, una correspondiente a una muestra no aglutinada y la otra a la misma muestra medianamente aglutinada. El área subtendida por cada una de las curvas (S_0 y S_1) representa la energía excedente del traba-

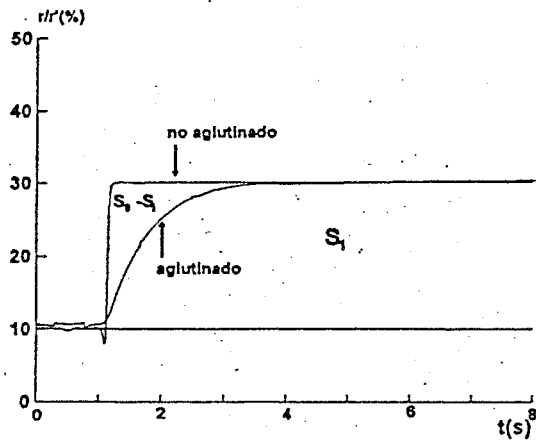


Fig. 1. Curvas típicas de disociación para muestras aglutinadas y no aglutinadas. El área encerrada entre ambas estima la energía disipada en la disociación de la muestra aglutinada.

jo de disociación. Así, S_0 representa la energía excedente de la consumida para disociar la muestra no aglutinada. Como esta muestra no "consume" trabajo al ser disociada, podemos considerar que S_0 representa el total de energía mecánica entregada por el instrumento¹⁴. En consecuencia, $[S_0 - S_1]$, que es el área comprendida entre la curva de disociación de la muestra aglutinada y la curva de disociación de la muestra no aglutinada, representa la energía requerida para disociar completamente los aglutinados de la segunda muestra.

Si multiplicamos y dividimos la ecuación (9) por $S_0 - (r_0 \cdot t) = w_0$, resulta:

$$w = \frac{\gamma \cdot \sigma_0}{\theta \cdot r_0} \cdot (r_0 \cdot t) \left| \frac{S_0 - S_1}{S_0} \right| = \left| \frac{\gamma \cdot \sigma_0 \cdot t}{\theta} \right| \left| \frac{S_0 - S_1}{S_0} \right| = \left| w_0 \cdot \frac{t}{\theta} \right| \cdot [E_p] \quad (10)$$

La cantidad entre paréntesis es, para cada muestra, un valor constante de energía y w_0 es el trabajo específico entregado por el instrumento, en tanto que

$$ED = \frac{S_0 - S_1}{S_0} \quad (11)$$

es el parámetro de energía que estima la fracción de trabajo empleada en la disociación de los aglutinatos. E_D es adimensional, y por lo tanto, independiente de la calibración del instrumento.

ENERGIA ESPECIFICA ADHESIVA DE SUPERFICIE

La teoría de Derjaguin¹⁵ relaciona la fuerza de disrupción F_E con la energía específica adhesiva de superficie (γ) y con el radio medio de curvatura de la membrana (R_c), adherida por aglutininas, un instante antes de la rotura total de adhesión. Al aumentar las tensiones de cizallamiento, las membranas adheridas son separadas, como si se tratara de una cinta adhesiva (*peeling*), lográndose la separación total cuando la tensión de corte, que actúa sobre el

$$F_E = 2\pi \cdot R_c \cdot \gamma = \tau_E \cdot A_0 = E_D \cdot \tau \cdot A_0 \quad (12)$$

área superficial de los aglutinatos (A_0), alcanza valores críticos τ_E la energía específica superficial γ , se calcula:

$$\gamma = \Psi \frac{A_0 \cdot \tau}{2\pi \cdot R_c} E_D \quad (13)$$

donde Ψ es un coeficiente de ajuste, en un flujo cortante crítico, relacionado a la orientación aleatoria y a la forma de los aglutinatos¹⁶⁻¹⁹.

MATERIALES

Glóbulos rojos: Se utilizaron glóbulos de grupos A_1 , A_2 , A_3 , A_m , AB, $A_x B$, B y O. La sangre era extraída por punción venosa, anticoagulada con heparina y centrifugada para separar los glóbulos rojos del plasma. Los hematíes separados eran lavados tres veces en PBS (solución

salina tampón fosfato) y finalmente concentrador por centrifugación a 1.500 g. El valor del hematocrito del concentrado globular (0,84 a 0,90) debía ser medido con precisión, para ajustar las suspensiones a un hematocrito de 0,40, óptimo para obtener la mayor sensibilidad, en el fenómeno de retrodifusión láser.

Reactivos

Anticuerpos policlonales humanos anti-A, anti-AB y anti-D (IgG)

Lotes preparados, calibrados y controlados por el Servicio de Inmunoematología del Centre Hospitalier Regional Universitaire (CHRU) de Nancy (Francia).

Anticuerpos monoclonales anti-A y anti-B

Lotes separados y controlados por el Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Lieja (Bélgica).

Reactivos anti-A

- Anticuerpo monoclonal murino P47-2: 10 ml
- Composición: Sobrenadante de cultivo puro
- Título: 1/1024 con glóbulos $A_2 B$
- Dosaje IgM: entre 40 y 50 $\mu\text{g/ml}$

Reactivos anti-B

- Anticuerpos monoclonal murino P47-4B6: 10 ml
- Composición: Sobrenadante de cultivo puro
- Título: 1/1024 con glóbulos $A_1 B$
- Dosaje IgM: entre 40 y 50 $\mu\text{g/ml}$

Medios de suspensión

Se preparan dos medios de suspensión, uno no aglutinante, para las muestras control (aglutinación nula) y el segundo, aglutinante, para las muestras en las que se determina la energía de aglutinación.

Medio de suspensión no aglutinante

(MSNA): Se prepara de forma de ajustar su viscosidad con la del suero sanguíneo (1,6 mPa.s). Para ello se disuelve Dextran 70 (Sigma D 1537 - PM 70.000 daltons) en PBS al 4,1% (P/V). La viscosidad de cada MSNA es medida en un viscosímetro Contraves LS30, a 36°C de temperatura y a diferentes velocidades de corte.

Medio de suspensión aglutinante (MSA): Se prepara agregando anticuerpos (policlonales o monoclonales según el caso) al MSNA, en proporciones precalculadas, para obtener la serie de dobles diluciones (desde $1/2$ hasta $1/236$). La viscosidad de cada MSA es medida en un viscosímetro Contraves LS30, a 36°C de temperatura, a diferentes velocidades de corte y ajustada a 1,8 mPa.s.

Suspensiones de glóbulos aglutinados: Se preparan suspensiones de glóbulos rojos en el medio MSA, en el que se ha incorporado, en la dilución prevista, anticuerpos específicos dirigidos contra los antígenos ABO de los glóbulos en suspensión.

Suspensiones de glóbulos no aglutinados: Se preparan suspensiones de glóbulos rojos en el medio MSA, en el que se ha utilizado, en la dilución prevista, anticuerpos que no reaccionan contra los antígenos ABO de los glóbulos de la suspensión. Esto se hace para mantener constantes las características físicas de la suspensión utilizada como testigo control.

INSTRUMENTAL Y METODO

Eritroagregámetro: Las cinéticas de agregación, aglutinación y disociación fueron realizadas con un Eritroagregámetro Regulet. Este instrumento, cuyo esquema se presenta en la Figura 2, consta de un viscosímetro rotacional de cilindros coaxiales (tipo Couette). La muestra se coloca en el espacio, de 1 mm, entre el cilindro exterior giratorio, transparente, y el cilindro interior, opaco, fijo y termostatizado. Una

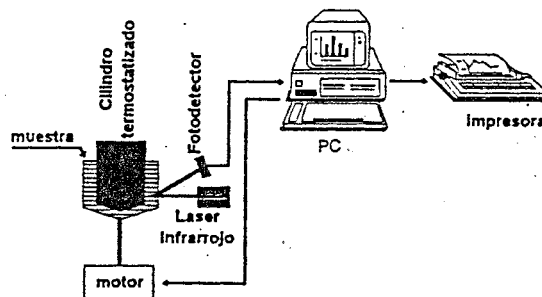


Fig. 2. Esquema del Erythroagregámetro Regulet. Viscosímetro Couette transparente y termostizado. Detección por retrodifusión de un diodo láser infrarrojo.

computadora, conectada en línea con el instrumento, comanda todas las operaciones, y registra y procesa los datos.

El haz de un diodo láser infrarrojo incide perpendicularmente sobre la muestra. Un fotodetector toma una lectura de la intensidad retrodifundida por los hematíes cada 10 mseg, y transfiere esta señal digitalizada a la computadora.

A medida que los aglutinatos se disocian la computadora va trazando la curva de disociación que, al alcanzar la monodispersión celular, se asintoniza en el valor correspondiente a la suspensión totalmente disociada. La computadora procesa los datos y exhibe los resultados. El valor S_0 se obtiene multiplicando el valor asintótico de la curva por el tiempo total de rotación (60 seg). El área S_1 se calcula integrando, a lo largo de ese mismo tiempo, la curva de disociación de la muestra aglutinada.

METODO

El sistema termostático es ajustado a 19°C, temperatura adecuada para el sistema ABO. La suspensión preparada en un tubo es suavemente homogeneizada, mediante 30 inversiones del tubo tapado (una inversión por segundo), e inmediatamente colocada en la celda del instrumento. La celda es puesta en rotación, a máxima velocidad de corte (400 s^{-1}), durante 10 segun-

los, para homogeneizar y favorecer la glutinación por los choques erráticos de las células. Luego es detenida y mantenida en reposo durante seis minutos, hasta completar el proceso de aglutinación. Inmediatamente, el instrumento es puesto nuevamente en rotación a la máxima velocidad de corte, durante 1 minuto, tiempo que se considera suficiente para disociar totalmente cualquier aglutinación. Durante este tiempo, 6.000 lecturas de retrodifusión láser son registradas y almacenadas, para ser procesadas, y obtener los parámetros de la disociación mecánica:

- τ : Tiempo característico de la disociación.
- E_D : Parámetro de energía.
- T_D : Tiempo de disociación final, correspondiente al momento en que se alcanza el 90% de la disociación total de los aglutinatos.

RESULTADOS

Glóbulos A_1 y antisuero anti- A_1 comercial

Se determinaron los tres parámetros de la disociación, en experimentos realizados con diez muestras de sangre A_1 , enfrentadas a una serie de dobles diluciones (desde 1/4 hasta 1/128) de un antisuero anti-

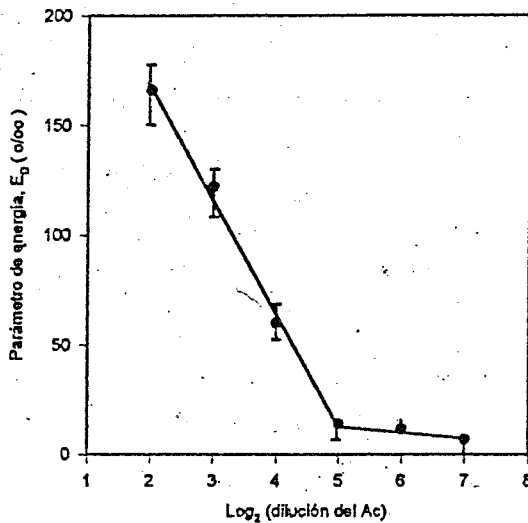


Fig. 3. Gráfica de regresión lineal y valores medios de E_D en función de la dilución del anticuerpo.

A_1 comercial. Como control se utilizaron:

- eritrocitos O suspendidos en medio antiaglutinante anti- A_1 (MSA),
- eritrocitos A_1 suspendidos en medio de suspensión no aglutinante (MSNA).

Los resultados se presentan en la Tabla 1 y en la Figura 3.

Evaluación de la precisión del método

La precisión del método fue evaluada para cada parámetro, calculando el coeficiente de variación (CV) sobre veinte alícuotas de una misma muestra de glóbu-

TABLA 1
PARAMETROS DINAMICOS DE LA DISOCIACION PARA MUESTRAS DE GLOBULOS A_1
Variación de los tres parámetros dinámicos determinados sobre 10 muestras de glóbulos rojos A_1 enfrentados a la serie de 6 diluciones de razón 2 de un anticuerpo policlonal específico

Diluciones	τ (\pm DS)	Coef. correl (promedio)	E_D (\pm DS)	T_D (\pm DS)
1/4	4,68 \pm 0,19	0,945	165,22 \pm 9,18	32,58 \pm 2,04
1/8	2,65 \pm 0,14	0,880	130,64 \pm 7,32	9,97 \pm 3,52
1/16	1,87 \pm 0,13	0,916	46,30 \pm 3,05	6,45 \pm 2,77
1/32	0,935 \pm 0,10	0,930	18,30 \pm 1,25	1,90 \pm 0,24
1/64	0,575 \pm 0,06	0,897	14,00 \pm 1,02	1,09 \pm 0,36
1/128	0,386 \pm 0,07	0,865	4,50 \pm 1,25	0,74 \pm 0,28
A1 + MSNA	0,280 \pm 0,02	0,786	0,00 \pm 0,00	0,35 \pm 0,01
O + MSA	0,274 \pm 0,03	0,658	0,00 \pm 0,00	0,36 \pm 0,01

TABLA 2
MEDIA, DESVIO ESTANDAR Y COEFICIENTE DE VARIACION DE LOS PARAMETROS
 Resultados estadísticos obtenidos para series de 20 alícuotas de la misma muestra enfrentada a diferentes diluciones del mismo anticuerpo específico, en determinaciones realizadas por triplicado

Dilución	τ (seg)		Ed (%)		Td (seg)	
	M (DS)	CV (%)	M (DS)	CV (%)	M (DS)	CV (%)
1/4	4.785 (0,14)	2,93	175,7 (6,58)	3,75	44,23 (2,31)	5,23
1/8	3.257 (0,08)	2,49	133,0 (4,74)	3,56	24,91 (1,54)	6,38
1/16	2.375 (0,01)	4,21	43,0 (1,60)	3,72	5,93 (0,45)	7,55
1/32	1.021 (0,04)	3,16	19,3 (0,69)	3,58	1,84 (0,17)	9,26
Media	—	3,20	—	3,65	—	5,37
± DS		± 0,63		± 0,08		± 2,02

los rojos de donante sano, enfrentados a la misma dilución del mismo antisuero. Las determinaciones se hicieron por triplicado, por tres operadores distintos. Esto se hizo para cuatro diluciones diferentes (1/4, 1/8, 1/16 y 1/32). Para cada dilución se determinaron la media, la desviación estándar (DS) y el coeficiente de variación (CV) correspondientes a cada uno de los tres parámetros fundamentales de la disociación: τ, Ed y Td. La Tabla 2 presenta los resultados. Cuando menor es el CV mayor es la precisión del parámetro.

Evaluación de la sensibilidad del método

Para determinar la sensibilidad del método, se aplicó el concepto de "diferencias normalizadas". Dos grupos de muestras, uno de hematíes clasificados A₁, definidos como de "fuerte aglutinabilidad", y

el otro de hematíes A₂, definidos como de "débil aglutinabilidad", aunque sólo tienen una aglutinabilidad algo menor que los A₁ (Tabla 3). Cuanto mayor es la diferencia normalizada, mayor será la sensibilidad del parámetro para detectar variaciones. Todas las muestras fueron aglutinadas por el mismo anticuerpo a la misma dilución (1/4). La diferencia normalizada entre los parámetros característicos de estos dos grupos se calcula por el cociente:

$$DN = \frac{\text{Diferencia entre las medias de los dos grupos}}{\text{Media de los desvíos estándar de los dos grupos}} = \frac{\mu_1 - \mu_2}{(DS)_1; (DS)_2 >}$$

DISCUSION

El fenómeno de la aglutinación eritrocitaria inmunológica ha sido intensivamente

TABLA 3
ANALISIS DE LA SENSIBILIDAD DEL METODO
 Se determinan las diferencias porcentuales y las diferencias normalizadas, para dos tipos de muestra consideradas de alta (A₁) y reducida (A₂) aglutinabilidad. Ambas diferencias son índices de la sensibilidad del parámetro analizado

Parámetro	A ₁ (fuerte)	A ₂ (débil)	Diferencia porcentual	Diferencia normalizada
τ	4,55 ± 0,49	3,94 ± 0,36	15,5	1,42
Ed	168,8 ± 9,5	133,2 ± 8,4	26,7	3,98
Td	42,8 ± 3,8	38,1 ± 3,5	12,3	1,29

estudiado y extensivamente aplicado, habiéndose desarrollado varias técnicas y métodos para analizar y cuantificar la reacción Ag-Ac. Todos esos métodos están profusamente documentados en numerosos artículos y capítulos de libros^{4,5,17-19}. En este fenómeno, el papel más importante en las interacciones intercelulares es cumplido por la densidad de sitios antigénicos de la membrana eritrocitaria y por la afinidad del anticuerpo. Aun cuando el mecanismo de esta reacción es muy bien conocido, y la relación estructura-función se halla en la frontera del conocimiento, no resulta simple evaluar la energía intercambiada durante la reacción, que puede ser cualitativamente estimada por la estabilidad de los aglutinados. Una posibilidad de estimar esta energía es midiendo el trabajo mecánico requerido para disociar completamente los aglutinados.

Nuestro objetivo es presentar un nuevo método, que fue desarrollado para analizar dinámicamente la aglutinación eritrocitaria inmunológica y para evaluar su capacidad para discriminar subgrupos eritrocitarios (Figura 4). Los resultados obteni-

dos demostraron, además, la utilidad del fenómeno de retrodifusión lumínica para estudiar la energía intercambiada en la reacción de aglutinación inmunológica y, por lo tanto, para estimar la afinidad de los anticuerpos estudiados.

En este método, las fuerzas producidas por un flujo rotacional de tipo Couette son las únicas involucradas en la disociación de aglutinados. La intensidad retrodifundida por los aglutinatos en suspensión aumenta en la medida que éstos son disociados, es decir, la señal óptica es inversamente proporcional al tamaño de las partículas suspendidas y proporcional a su concentración. Esta situación conduce a la obtención de parámetros dinámicos correlacionados con la energía intercambiada en el proceso de disociación, los cuales permiten estimar la afinidad del anticuerpo involucrado y discriminar subgrupos sobre la base de la potencia de la reacción.

Este método no sólo proporciona detalles dinámicos sobre la disociación de aglutinatos, sino que también puede suministrar información sobre las velocidades de aglutinación ($k\{+\}$) y de disociación ($k\{-}$). La reorientación inicial de las partículas se observa en la fuerte pendiente que muestra la curva de disociación en su origen y resulta más claramente marcada cuanto menor es la potencia de la aglutinación. Al final de esta primera fase, la segunda fase muestra un incremento de la intensidad retrodifundida cada vez menor a medida que se aproxima a la monodispersión total, al punto que para la muestra control (no aglutinada) la segunda fase es tan sólo una recta horizontal. En la medida en que la reacción es más débil, la primera fase se hace más corta y la segunda más larga. Para el caso de la muestra control, no-aglutinada, la primera fase llega instantáneamente al valor máximo y, en consecuencia, la segunda fase aparece como una recta horizontal.

Esta nueva técnica está basada en una combinación de retrodifusión láser por

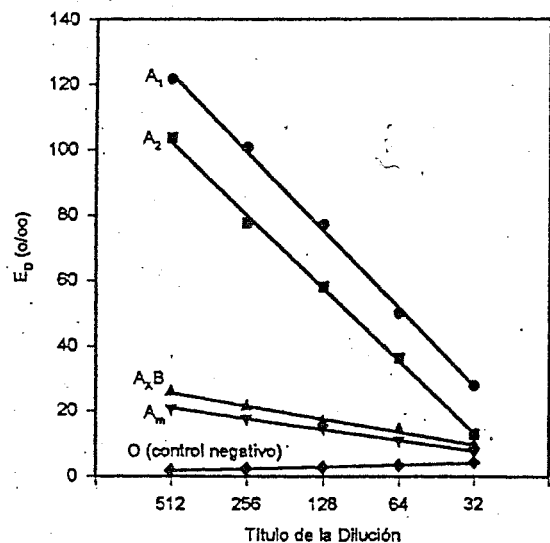


Fig. 4. Discriminación de distintos fenotipos A por análisis de la evolución de E_D con la dilución del anticuerpo policlonal anti-A.

partículas en suspensión y disociación mecánica de los aglutinatos. Por lo tanto es capaz de suministrar información detallada de la forma en que los aglutinatos se van disociando por corte, hasta alcanzar el estado de monodispersión eritrocitaria. Un extenso protocolo de experimentaciones está siendo ejecutado para validar el método y correlacionar sus parámetros con la constante de afinidad.

RESUMEN

La aglutinación inmunológica es la consecuencia de la reacción Ag-Ac que adhiere eritrocitos adyacentes. Los anticuerpos se fijan a los sitios antigénicos distribuidos sobre la superficie de la membrana eritrocitaria, actuando como anclajes moleculares para unir células adyacentes y formas aglutinadas. Una pequeña cantidad de energía es disipada durante la reacción. Si se suministra una cantidad de trabajo mecánico equivalente a la energía disipada, los aglutinatos pueden ser disociados. El trabajo mecánico es realizado por tensiones de corte generadas en un viscosímetro de tipo Couette. Se propone una nueva técnica que utiliza la retrodifusión de un haz láser para analizar la cinética de disociación de aglutinatos eritrocitarios inmunológicos, producida por cizallamiento de los aglutinatos en suspensión. La intensidad del láser, retrodifundida, aumenta en la medida que los aglutinatos son disociados por corte. El registro de la intensidad retrodifundida suministra una curva de disociación que es ajustada por una ecuación exponencial. Los parámetros que caracterizan esta ecuación muestran una buena correlación con la potencia de la aglutinación. La integración numérica de las curvas de disociación conduce a la obtención de un parámetro E_D que estima la energía intercambiada en el proceso de disociación y, en consecuencia, la constante de afinidad.

SUMMARY

Immunologic hemagglutination is the common consequence of the in vitro antibody-antigen reaction linking adjacent erythrocyte membranes. Antibodies fixed to antigenic sites on the red cell membranes act as molecular bridges, adhering adjacent cells to form erythrocyte agglutinates. A little amount of energy is dissipated in this reaction. Agglutinates can be dissociated by providing enough energy which may be mechanically supplied by the shear stress applied in a Couette viscometer. A new method is proposed in this paper to determine the dissociation kinetics of erythrocyte immunologic agglutinates using laser backscattered by sheared suspended particles. Backscattered light intensity increases as the agglutinates are dissociated by applying a controlled shear field in a transparent Couette viscometer. Recording of backscattered intensity gives curves of dissociation that can be fitted by an exponential equation. Parameters characterizing this equation show good correlation with the strength of the agglutination. A numerical integration of the dissociation curve leads to a non dimensional parameter E_D that estimates the energy spent (work done) in the dissociation process that is, the affinity.

BIBLIOGRAFIA

1. Pollack W, Hager HJ, Reckel R, Toren DA, Heron OS: A study of the forces involved in the second stage of hemagglutination. *Transfusion* 1965; 5 (2): 158-183.
2. Salmon Ch, Cartrons JP, Rouger P: *Immunologie. En: Les groupes sanguins de l'homme*. Ed Masson (Paris), 1991; cap 3; pp 33-50.
3. Salmon Ch, Hautenave M: Etude thermodynamique de l'anticorps anti-B des sujets de phenotype Ax. *Nouv Rev Franc Hemat* 1961; 1 (6): 847-871.
4. Skalak R, Cheng Zhu: Rheological aspect of red blood cell aggregation. *Biorheology* 1990; 27 (3/4): 309-324.
5. Griffith AA: The phenomena of rupture and flow

in solids. *Philos Trans R Soc Lond. A Math Phys Sciences* 1921; 221: 163-198.

6. Bell G: Models for the specific adhesion of cells to cells. *Science* 1978; 200: 618-627.
7. Dembo M, Torney DC, Saxman K, Hammer D: The reaction-limited kinetics of membrane to surface adhesion and detachment. *Proc Royal Soc London B* 1988; 234: 55-83.
8. Evans E, Leung A: Adhesivity and rigidity of erythrocyte membrane in relation to wheat germ agglutinin binding. *J Cell Biology* 1984; 98: 1201-1208.
9. Wurmser R: Thermodynamic study of antigen-antibody reactions. *In: Experimental methods in Biophysical Chemistry*. Wiley Ed, London, 1972.
10. Snabre P, Bitbol M, Mills P: Cell disaggregation behavior in shear flow. *Biophys J* 1987; 51: 795-807.
11. Rasia RJ, Valverde JRR, Stoltz JF: Weak "A" blood subgroup discrimination by a rheo-optical method: A new application of laser backscattering. *Opt Eng* 1996; 35 (1): 20-25.
12. Rasia RJ, Rasia-Valverde JR, Stoltz JF: Binding energy analysis in immunological hemagglutination by using a hemorheological method. *Proc First China France Symp on Biorheology*. Beijing (China), 1994; pp 90-95.
13. Rasia-Valverde JR, Rasia RJ, Botte C, Stoltz JF: Approche de la réaction de dissociation d'agglutinats immunologiques erythrocytaires: Application à des hématies de sous-groupe A. *Trans Clin Biol* 1997; 4: 203-211.
14. Rasia RJ, Valverde JR, Gentils M, Cauchois G, Stoltz JF: Erythrocyte immunologic affinity evaluated by dynamic parameters determined using a rheo-optical method. *In: Singh M, Saxena VP: Advances in Physiological Fluid Dynamics*. Narosa Ed, 1995; PP 54-62.
15. Derjaguin BV, Muller VM, Toporov YP: Effect of contact deformations on the adhesion of particles. *J Colloid Interface Sci* 1975; 53: 314-326.
16. Rasia RJ, Rasia-Valverde JR, Stoltz JF: Rheologic characterization of vegetal lectins by dissociation of induced erythrocyte agglutinates. *Clin Hemorheol Microcirc* 1997; 17 (4): 333-340.
17. Sung LA, Kabat EA, Chien S: Interactions of lectins with membrane receptors on erythrocyte surface. *J Cell Biol* 1985; 101: 646-651.
18. Sung LA, Kabat EA, Chien S: Interaction energy in lectins induced erythrocyte aggregation. *J Cell Biol* 1985; 101: 652-659.
19. Sung LA, Kabat EA: Agglutination induced erythrocyte deformation by two blood group A-specific lectins. Study by light and electron microscopy. *Biorheology* 1994; 31 (4): 353-364.

J. F. Stoltz
R. J. Rasia
J. R. Valverde
L. Pla
D. Sontag
A. Rapaille
S. Muller

A rheo-optical method for the study of aggregated particles: application to the characterization of ABO blood group monoclonal antibodies

Received: 7 May 1999
Accepted: 30 May 2000

J. F. Stoltz (✉) · L. Pla · S. Muller
Angiohématologie Hémorhéologie
Equipe LEMTA UMR CNRS 7563
Faculté de Médecine (U.H.P.), 54505
Vandoeuvre-lès-Nancy, France
e-mail: stoltz@hemato.u-nancy.fr

R. J. Rasia · J. R. Valverde · A. Rapaille
Instituto de Física Rosario (CONICET-
U.N.R.), Bv. 27 de Febrero 210 bis and
Inmunohem., Hemorreol. e Inmunogen
Fac. C. Bioq. y Farm., U.N.R., Suipacha
531, 2000 Rosario, Argentina

D. Sontag
Blood Transfusion Centre, CHU Liège
Sart Tilman, Liège, Belgium

Abstract The adhesive energy of monoclonal antibody induced agglutination can be assessed from the shear dissociation of agglutinates. Anti-A, anti-B, and anti-AB monoclonal antibodies agglutinate erythrocytes with variable strength, depending on the affinity of antibodies and on the antigenic density on the cell surface. The time required for an applied shear stress to dissociate cell agglutinates completely is depending on the strength of the agglutination reaction. The dissociation process under constant shear stress can be followed by measuring intensity of light backscattered by

suspended particles. The obtained dissociation curves could be adjusted by an exponential expression governed by a parameter called characteristic time of dissociation. This parameter decreases with increasing antibody concentration. Integration of dissociation curves provided an approach of adhesive energy induced by monoclonal antibody.

Key words Red blood cell · Dissociation shear stress · Light backscattering · Agglutination · Monoclonal antibodies

Introduction

Measurement of physical strength or energy dissipated by bonds linking red blood cells to each other is an important requisite to characterize the agglutination process occurring when those cells are put in contact with specific antibodies directed against their antigens (Skalak et al. 1981). Some years ago it was demonstrated that the total break-up of crossbridges occurred when the shear stress acts on the mutually adhered cells during a period of time which depends on the bonds density on the red cell surface and on the affinity of molecular ligands (Evans et al. 1991; Sung et al. 1985; Tvees et al. 1993; Tha et al. 1986). Experiments were carried out to investigate the time dependence of the al dissociation of cells under constant shear stress.

In other respects, we have previously reported the interaction of polyclonal antibodies (Rasia, et al. 1997) and specific lectins with human red blood cells and assessed the energy of cell-cell adhesion in erythrocyte

immunological agglutinates induced using a rheological dissociation method in this paper. Cell separation by shear stresses was followed by measuring laser intensity backscattered by suspended particles (free cells or agglutinates) under shear. This rheo-optical method which applies backscattered light measurements during shear dissociation of suspended red blood cell (RBC) agglutinates was reported by the authors in previous paper (Stoltz et al. 1996) - *Rasia et al. 1997*.

One of the most popular application of antibodies is blood typing by RBC agglutination reaction. Erythrocyte agglutination results from molecular bridging between adjacent cell surfaces which is carried out with little expenditure of energy (Salmon et al. 1991). Understanding the interaction (bridging) of two biological molecules such as antigens (Ag) and antibodies (Ab) requires not only the knowledge of the molecular structure but also the functional characterization. The functional activity can be assessed from the adhesive energy evolved from agglutination reactions. Separation

of agglutinated cells can be done by external stresses doing work to overcome the net agglutinating energy. In this paper a simple and reproducible technique based on the shear dissociation of agglutinates and on the measurement of the light backscattered by suspended particles is applied to the investigation of the agglutinating energy of monoclonal antibodies.

This paper describes a rheological approach that measured the time necessary to separate, with a constant shear stress, suspended RBC agglutinated by monoclonal antibodies specific to the A, B and AB blood group antigens.

Optical and rheological data analysis

A parameter estimating the specific energy of cellular agglutination, expressed in terms of contact surface in the agglutinate state can be derived from data of backscattering light variation obtained during dissociation of agglutinated cells in a Couette shear field.

Skalak et al. (1981) have proposed a general statement of energy conservation for the case in which contact area between cells increases or decreases: the rate of work per surface unit (w) done by external forces is proportional to the rate at which energy must be supplied to separate the adhered cells having a contact area σ_A :

$$\frac{dw}{dt} \cong \gamma \cdot \frac{d\sigma_A}{dt} \quad (1)$$

where γ is the surface adhesive energy. Hence, the changes in the contact surface area are related to the energy supplied to separate bound surfaces.

On the other hand, there is a direct relation between backscattered light intensity and the specific area (per volume unit) of suspended particles (cells or agglutinates). Contact area of cell adhered surface (σ_A) can be estimated by the differences between backscattered intensities from the agglutinated state and the monodispersed state of red cells (Mills and Snabre 1983):

$$\frac{\sigma_A}{\sigma_0} = 1 - \frac{\sigma'}{\sigma_0} = 1 - \frac{r'}{r_0} \quad (2)$$

where σ' and r' are the specific area and the diffuse reflectance, respectively, of agglutinates and, (functions of time) σ_0 and r_0 are the specific area and diffuse reflectance, respectively, of monodispersed RBC; these parameters are functions of time. If RBCs are isolated (non-agglutinated) the corresponding diffuse reflectance r_0 is constant but if RBCs are agglutinated r' varies with time giving a curve which can be approached by an exponential expression:

$$r'(t) = r_0 \cdot \left[1 - \exp\left(-\frac{t}{\beta}\right) \right] \quad (3)$$

This curve is called a dissociation curve (Fig. 1) involving β , the characteristic time of dissociation. The time elapsed from the start of the dissociation process up to the moment at which 90% of the complete dissociation of red blood cells is obtained is called the dissociation time (T_D).

Under constant shear stress RBC agglutinates are progressively dissociated, decreasing the contact area σ_A that vanishes in the monodispersed state of cells. This process is time dependent and can furnish an approach of the spent energy by integrating the curve of dissociation (diffuse reflectance vs time). The area subtended under each curve represents the remaining energy not spent in the dissociation process. The area corresponding to the non-agglutinated sample (S_0) represents the total energy furnished by the device, so the work done in completely dissociating red cell agglutinates can be calculated:

$$\bar{S} = (S_0 - S_1) = \int (r_0 - r') \cdot dt = r_0 \cdot \int \left(1 - \frac{r'}{r_0} \right) \cdot dt \quad (4)$$

where S_1 represents the energy remaining from the agglutinate dissociation. We can then introduce a new parameter E_D , called relative surface binding energy, to find the energy of dissociation:

$$E_D = \frac{S_0 - S_1}{S_0} = \frac{\int (r_0 - r') \cdot dt}{\int r_0 \cdot dt} \quad (5)$$

Improvements of red cell aggregometry by laser backscattering have made it possible to determine the free energy of antigen antibody binding from a single experiment of agglutinate shear dissociation. Furthermore, by accepting some hypothetical conditions the specific energy of adhesion can be calculated.

The Derjaguin theory (Derjaguin et al. 1975) relates the disruption force F_E to the surface adhesive energy (γ)

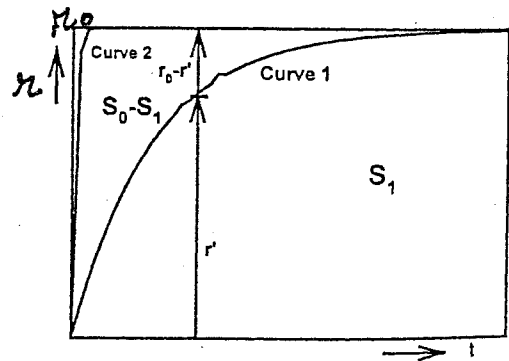


Fig. 1 Schematic representation of the variation of the intensity of light Backscattered " r " in functions of time (in Stoltz et al. 1996 and Rasia et al. 1997). Curve 1: - Agglutinated RBC; Curve 2 - Non-agglutinated RBC. Time T_D is defined as the time required to obtain 90% of the total dissociation

Fig. 2 Variation of the surface binding energy parameter E_d ($m \pm SD$) for A_1 ($n=10$) and A_1B ($n=10$) red blood cells agglutinated by a monoclonal anti A antibody. (It can be noted that red blood cells O and B do not react with the monoclonal antibody)

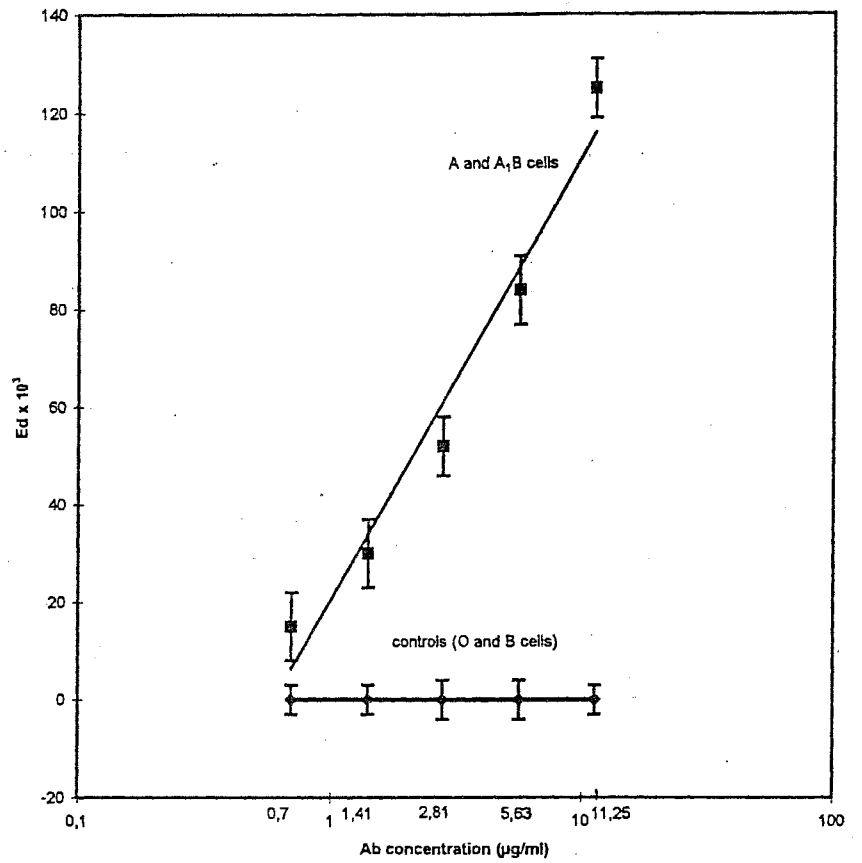


Fig. 3 Variation of the surface binding energy parameter E_d ($m \pm SD$) for B ($n=10$) and A_1B ($n=10$) red blood cells agglutinated by a monoclonal anti B antibody (It can be noted that red blood cells O and A_1 do not react with the monoclonal antibody)

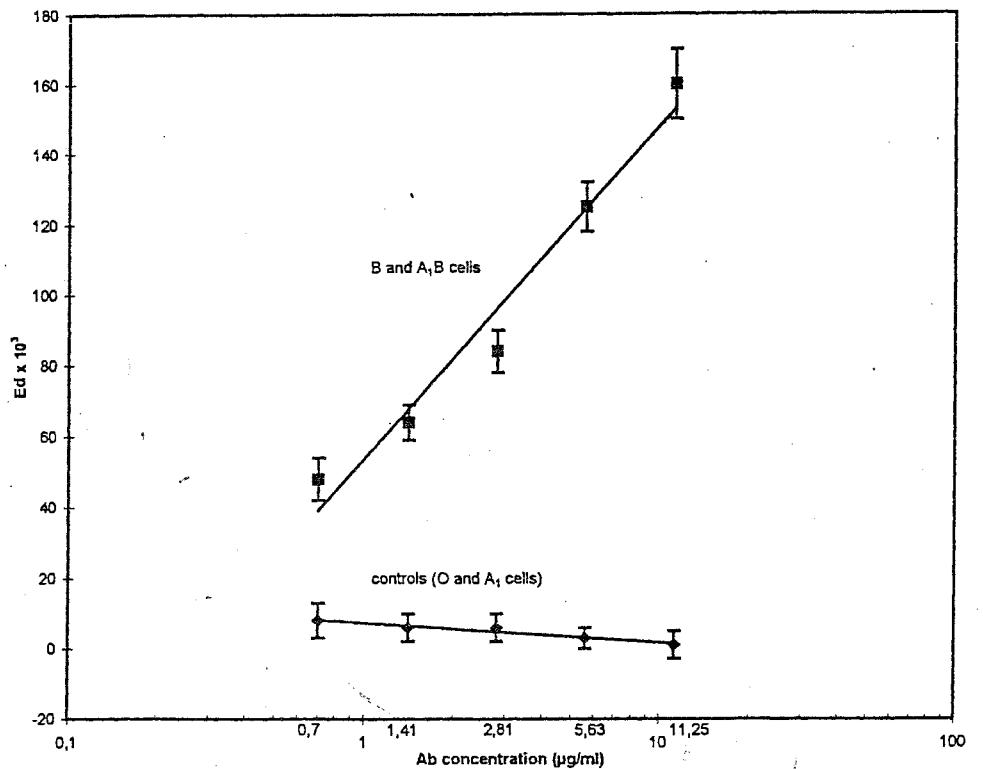
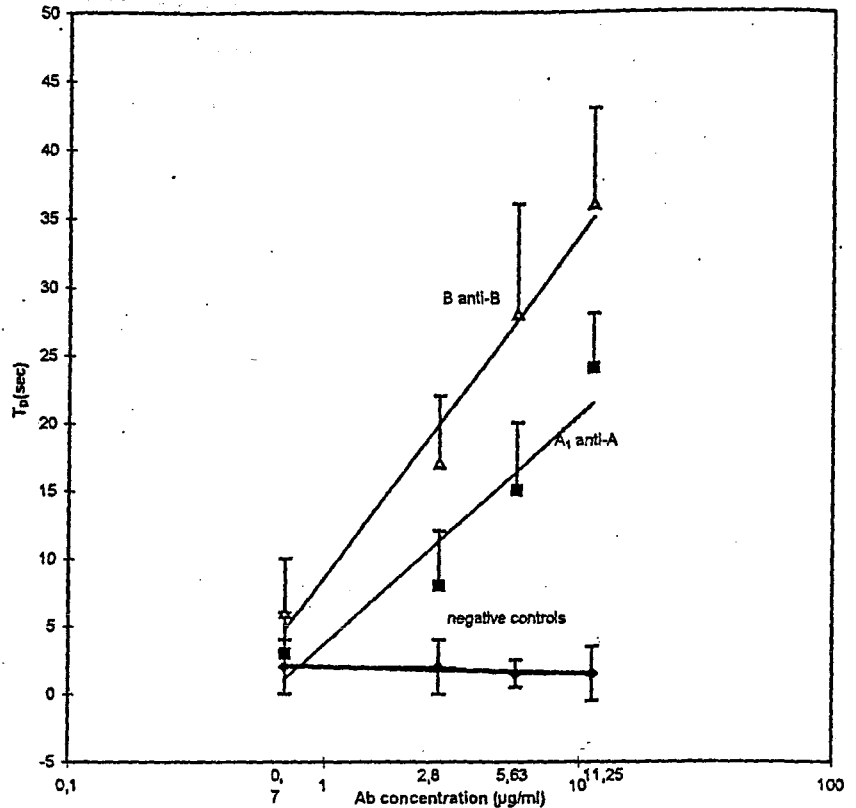


Fig. 4 Variation of the dissociation time (T_D) ($m \pm SD$) for an anti A with A_1 erythrocytes ($n = 10$) and an anti B sera with B erythrocytes ($n = 10$). Negative control is erythrocytes O with anti A ($n = 10$) and anti B sera ($n = 10$)



and to the mean curvature radius (R_C) of bridged membrane surfaces just before the adhesion rupture. With increasing levels of shear stress in a laminar flow channel flow, external cells of agglutinates are separated by peeling and the complete separation occurs for a critical shear stress τ_E acting over the upper area A_0 of the external cell:

$$F_E = 2\pi \cdot R_C \cdot \gamma = \tau_E \cdot A_0 \quad (6)$$

Hence, the surface adhesive energy can be calculated from Couette flow experimental data using the Derjaguin equation (Snabre et al. 1987):

$$\gamma = \psi \cdot \frac{A_0 \cdot \tau_E}{2\pi \cdot R_C} \quad (7)$$

where ψ is a fitting coefficient related to the random orientation and the shape of agglutinates in a shear flow. Assuming that

$$\tau_E = E_D \cdot \tau \quad (8)$$

where τ is the shear stress applied by the device, we can write

$$\gamma = \psi \cdot \frac{A_0 \cdot \tau}{2\pi \cdot R_C} \cdot E_D \quad (9)$$

where E_D is the relative surface binding energy (Mills and Snabre 1983; Skalak et Zhu 1990). It has been determined by comparing our experimental data with those of

energy values obtained by other authors on agglutination of red blood cells reacting against different lectins.

Materials and methods

Monoclonal antibodies. Anti A (murine monoclonal antibody P47-2) and anti B (murine monoclonal antibody P47-4B6) monoclonal antibodies were prepared and provided by the Laboratory of Blood Transfusion Center of the CHU of Liege (Belgium). Rat monoclonal antibodies against mouse k light chain were obtained, characterized, produced, and purified according to the methods described by Delaunay et al. (1990). Mouse immunoglobulin reference serum was purified by ICN Immunobiologicals (Cat no.° 64-901) and Mouse hybridoma culture supernatants samples were collected after a few days of culture of mouse hybridoma cells secreting Mabs against ABO human blood group. Title of anti-A (45 µg/ml) determined with red blood cells A_2B was 1024 and title of anti-B (45 µg/ml) determined with red blood cells A_1B was also 1024.

Antibody dilutions. Serial two-fold dilutions were prepared, from 1/4 (11.25 µg/ml) to 1/64 (0.7 µg/ml) of each antibody in the suspending medium.

Blood samples. Blood samples from 36 healthy blood donors were used in this study. Blood samples were drawn by venepuncture from the antecubital vein, anticoagulated with EDTA Na_2 , into sterile vials. (Etablissement de Transfusion Sanguine de Lorraine France). Erythrocytes were typed in the ABO system in a automatic analyzer before being washed three times with isotonic phosphate buffered saline (PBS). Blood samples were of group A (10), B (10), A_1B (6), and O (10). Red cells of O group were used as negative control.

Red blood cells suspensions. Each erythrocyte sample was washed three times with PBS and resuspended as 40% suspension in a medium containing monoclonal antibodies at different concentrations. Red blood cell suspensions were adjusted to 40% because this hematocrit is the standard suggested by the Erythroaggregometer for an optimal backscattering signal.

Suspending medium. A solution of dextran 70 (Sigma D1537; MW = 70,000) in a PBS medium at 4.1% was used as suspending medium (viscosity = 1.82 mPa.s at 37 °C). The addition of dextran 70 caused red blood cells aggregation but with a negligible dissociation energy. Surface S_0 could be obtained by integrating the corresponding dissociation curve.

Experimental procedure. The procedure (Donner et al. 1988; Rasia et al. 1996) involved experimental determinations carried out with the Erythroaggregometer (University H. Poincaré licence to Regulest-Florange-France). Erythrocyte suspension (1.4 ml) is poured into the gap between both concentric cylinders of the device. The internal cylinder is fixed and thermostatically controlled, whereas the external one is transparent and rotates at controlled speed. The instrument is connected with a personal computer (PC) which pilots the whole operation, stores values of backscattered light, displays the dissociation curve, and calculates the dynamic parameters of dissociation. At the start the external cylinder is set at maximal rotation (600/sec) for 10 s to homogenize the suspension and put erythrocytes into contact. Then the instrument is stopped and the sample is maintained at rest for 6 min to let the reaction reach equilibrium. Immediately the PC restarts the rotation of the external cylinder at 600/sec. The sample undergoes this shear rate for 1 min and the agglutinates become dissociated. Readings of light intensity are taken every 10 ms. A total of 6000 readings are taken and stored. Numerical data are rapidly processed and three parameters are calculated (Ed, Td, and τ).

Results

Shear-dissociation experiments were carried out on RBCs agglutinated by five different concentrations (11.25 $\mu\text{g/ml}$, 5.63 $\mu\text{g/ml}$, 2.81 $\mu\text{g/ml}$, 1.41 $\mu\text{g/ml}$, and 0.70 $\mu\text{g/ml}$) of each of both monoclonal Ab, calculated from content values provided by the Belgium Laboratory.

Anti A monoclonal antibody was tested against human red cells of A_1 , A_1B , B, and O (B and O cells were considered negative controls) groups. Similar tests were carried out with the same RBC but with anti B monoclonal antibody (A_1 and O cells were negative controls). \times

As the antibody concentration decreased there was a corresponding decrease in the energy spent to obtain the complete dispersion of agglutinated cells.

Averaged values of the three parameters obtained by shear dissociation for each monoclonal antibody corresponding to the highest concentration (11.25 $\mu\text{g/ml}$) are presented in Table 1. Calculated mean values of the specific adhesive energy γ are also given. *and Dissociation time Td are given on figure 4. Variations of*

Conclusion

Different quantitative hemagglutination techniques have been developed for many years (Salmon et Hautenave 1961; Streiff et al. 1969; Tha and Goldsmith 1986; Pollak et al. 1965; Stoltz et al. 1976; Rasia et al. 1990). Autoanalyzers and electronic particle counters gave reproducible results with reduction in variability. However, there are very few techniques able to determine the agglutination energy. In general, known techniques to determine the energy evolved in the hemagglutination reaction analyze the agglutination process, but these meticulous and reproducible techniques do not overcome the disadvantages of being very laborious and time-consuming. By contrast, the method presented here applies the shear dissociation of agglutinates. The stronger the immunologic reaction, the larger the agglutinates and the higher the energy required to dissociate them.

This study represents a first attempt to determine thermodynamic parameters of the RBCs-specific antibody interactions by measuring the time dependent separation of agglutinated cells using laser backscattering and shear dissociation of agglutinates. A frequent problem in clinical immunohematology was to define the antibody quality which is related to its affinity and to its association constant. Hence an important subject of research are the techniques developed for the quality control of antibodies and the possibility of determining the monoclonal antibody quality which opens significant perspectives in biophysics.

Estimation of the reaction energy by shear dissociation of agglutinates can be helpful in comparing different antibodies. Techniques capable of measuring the agglutination energy have been searched for and developed for many years. In general these techniques analyze the agglutination process rather than the dissociation one, but they are meticulous, laborious, and time-consuming

Table 1 Determination of dissociation parameters for the two monoclonal antibodies (anti A and anti B) and erythrocytes A_1 , A_1B and B

Group of red blood cells	Antibody	Energy parameter $10^3 E_D$	Specific energy γ (N/m) $\cdot 10^{-7}$	Characteristic time of dissociation β (sec)	Dissociation time T_D (sec)
A_1	anti A (P47-2)	126.9 \pm 10.0	3.0 \pm 0.2	2.33 \pm 0.11	26.82 \pm 1.83
A_1B	anti A (P47-2)	134.3 \pm 8.3	2.4 \pm 0.15	2.48 \pm 0.08	27.72 \pm 1.35
A_1	anti B (P47-4B6)	168.4 \pm 7.8	3.04 \pm 0.14	2.77 \pm 0.10	35.28 \pm 1.72
A_1B	anti B (P47-4B6)	165.3 \pm 5.4	3.0 \pm 0.1	2.8 \pm 0.10	36.17 \pm 1.43

Variations of E_D for the different A_1 , A_1B , B, and O RBC samples at various concentrations of anti-A antibody are given in Figs. 2 and 3 for the anti-B monoclonal antibody. The variations of the dissociation time T_D with the antibody concentration are given in Fig. 4

(Salmon and Hautenave 1961). By contrast, the rheological technique presented in this paper is simple and leads to the estimation of the energy of dissociation. The stronger the reaction the flatter the dissociation curve and the greater the relative area of the surface enclosed by the curves.

Table 1 shows four parameters which characterize the antibodies (particularly E_D and γ). When antibody P47-2 reacts against RBCs of AB group, values of E_D

and γ show a significant difference with the same parameters obtained with antibody P47-4B6 reacting against the same sample of cells. These results are coherent with those obtained from both antibodies reacting against their specific RBCs. We can conclude that the energy parameter obtained by the laser back-scattering method in a viscosimeter represents an index of the antibody affinity and, more generally, to the study of agglutinated particles in suspension.

References

- Delanay T, Louahed J, Bazin H (1990) Elisa measurement of Ig production in mouse hybridoma culture supernatants. *J Immunol Methods* 131:33-39
- Derjaguin BV, Muller VM, Toporov YP (1975) Effect of contact deformations on the adhesion of particles. *J Colloid Interface Sci* 53:314-326
- Donner M, Siadat M, Stoltz JF (1988) Erythrocyte aggregation: approach by light scattering determination. *Biorheology* 25:367-375
- Evans E, Berk D, Lung A (1991) Detachment of agglutinin bonded red blood cells (I) ~~to~~ ^{Force} rupture molecular point attachment. *Biophys J* 59:849-860
- Mills P, Snabre P (1983) Agrégométrie optique de la suspension sanguine. In: Viriot ML, André JC, Lucius M, Stoltz JF (eds) *Techniques avancées en hémostase*. DPIC-INPL Publ, Nancy, France, pp 580-598
- Pollack W, Hager HJ, Reckel R, Toren DA, Singer HO (1965) A study of the forces involved in the second stage of hemagglutination. *Transfusion* 5:158-183
- Rasia RJ, Rasia-Valverde JR, Gentils M, Cauchois G, Stoltz JF (1997) Rheological characterization of vegetal lectins by dissociation of induced erythrocytes agglutinates. *Clin Hemorheol Microcircul* 17:333-340
- Rasia RJ, Rasia-Valverde JR, Stoltz JF (1996) Weak "A" blood subgroups discrimination by a rheo-optical method: a new application of laser back-scattering. *Opt Eng* 35:20-25
- Rasia RJ, Valverde JR, Garcia Rosasco M (1990) Manual quantitative method for the study of red cell agglutination using light diffraction by suspended particles. *Vox Sang* 58:112-117
- Rasia-Valverde JR, Rasia RJ, Botté C, Stoltz JF (1997) Approche rhéologique de la réaction de dissociation d'agglutinats immunologiques érythrocytaires: Application à des hématies du sous-groupe A. *Transf Clin Biol* 4:203-211
- Salmon Ch, Cartron JP, Rouger Ph (1991) Immunologie. In: *Les groupes sanguins chez l'homme*. Masson ~~Ed~~ ^{Pub} (Paris), pp 33-50
- Salmon Ch, Hautenave M (1961) Etude thermodynamique de l'anticorps anti B des sujets de phenotype Ax. *Nouv Rev Fr Hematol* 4:847-871
- Skalak R, Zarda PR, Jan KM, Chien S (1981) Mechanics of rouleaux formation. *Biophys J* 35:771-781
- Skalak R, Zhu Ch (1990) Rheological aspects of red blood cell aggregation. *Biorheology* 27:309-325
- Snabre P, Bitbol M, Mills P (1987) Cell disaggregation behavior in shear flow. *Biophys J* 51:795-807
- Stoltz JF, Raffoux C, Janot C (1976) Study of antigenic varieties of group A red cells, platelet and lymphocytes using liquid phase electrophoresis. *Vox Sang* 30:139-143
- Stoltz JF, Rasia-Valverde JR, Rasia RJ, Botté C (1996) Etude rhéologique de la dissociation d'agglutinats immunologiques d'hématies A. *Cah Rheol* 15:399-406
- Sung LA, Kabat EA, Chien S (1985) Interaction energies in lectin induced erythrocyte aggregation. *J Cell Biol* 101:652-659
- Streiff F, Stoltz JF, Peters A, Genetet B, Larcan A (1969) Effets electrocinétiques dans la suspension sanguine. 2ème Partie: Essais de corrélation immunohématologique. *Rev Fr Transfus* 12:423-429
- Tees DFJ, Coenen O, Goldsmith HL (1993) Interaction forces between red cells agglutinated by antibody. IV Time and force dependence of break-up. *Biophys J* 65:1318-1334
- Tha SP, Goldsmith HL (1986) Interaction forces between red cells agglutinated by antibodies. *Theor Biophys J* 50:1109-1116

Biochemical and Biophysical Research Communications

Date: Sept. 22, 2000

Ms. No.: Ka-5695

Author(s): Pla L., RASIA R.J., Valverde J.R., Muller S. and Stoltz J.F.

Mailing Address: Laboratoire d'Angiohematologie-Hemorheologie BP 184,
Faculte de Medecine, UHP-Nancy I,
54500 Vandoeuvre-les-nancy, France.

Ms. Title: Evaluation of the energy of red blood cell agglutination by monoclonal antibodies.

Dear Dr. R.J. Rasia:

Your manuscript has been reviewed and
~~_____~~ accepted for publication. You will not receive any confirming proofs of your article and the material you submit will appear "as is" in the journal. However, should you have any corrections to your accepted manuscript:

changes only should be faxed today to:

Production Editor, BBRC at 619-699-6700.

Any changes may cause a delay in the publication of your work.

You will receive a reprint package, including the reprint order form, once your manuscript has been received at Academic Press. Reprints of your article should arrive four to six weeks post-publication.

~~_____~~ is / herewith returned / not acceptable / for the following reasons:

~~_____~~ not clear as checked in the manuscript.

~~_____~~ the manuscript is too long.

Other Comments:

The revised version of manuscript is now acceptable.

(The old number is Ka-5655).

On behalf of the Editors _____

Yasuo Kagawa

Yasuo Kagawa

AUTHOR'S COPY

Evaluation of the energy of red blood cell agglutination by monoclonal antibodies

Plá L.¹, Rasia R.J.², Valverde J.R.³, Muller S.¹, Stoltz J.F.¹

¹ Angiohématologie-Hémorhéologie – UMR CNRS 7563 - Fac. Médecine – 54500
Vandoeuvre-lès-Nancy – France.

² Optica Aplicada - IFIR (CONICET-UNR) - Rosario – Argentine.

³ Inmunohematología-Hemorreología - Fac.Cs.Bioq. y Farm. - UNR - Rosario – Argentine.

Address:

Professeur R.J. RASIA

Laboratoire d'Angiohématologie-Hémorhéologie BP 184,

Faculté de Médecine, UHP-Nancy I

54500 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

E-mail: rasia@hemato.u-nancy.fr

Phone: 33 (0)3 83 59 26 42

Fax: 33 (0)3 83 59 26 43

ABSTRACT

The knowledge of the energy involved in cell-cell interactions has significant implications in biological and medical sciences. Red blood cells (RBC) become mutually adhered when specific (agglutinins) or nonspecific macromolecules bind adjacent cells in an irreversible or reversible form. Flow chamber technique with digital image processing was successfully applied to determine the partial separation, by shear stress, of two RBC agglutinated face to face (doublet) by specific monoclonal antibodies (MAb) and also to evaluate the shear stress required to attain this separation. The work done in separating adhered cells is then easily calculated and serves to evaluate the antibody affinity.

In this work, this technique was applied to evaluate the affinity of a monoclonal antibody specific to the blood group A antigen. The specific disaggregation energy γ (i.e., the work done by the shear stress) required to disrupt a unit of adhered membrane areas between agglutinated cells was calculated. On play back the image analysis, measurements were taken to determine the force applied to the doublet and the relative separation between both RBC. Values of γ_d (from 2.70 to 4.61 x 10⁻⁹ N/cm) were found to be proportional to the density ($D = 27$ to 55 molecules/ μm^2) of MAb molecules bound on the RBC membrane.

Key words:

dissociation energy, flow chamber, immunologic agglutination, red blood cells, shear stress

INTRODUCTION

Measurement of the physical strength of the bonds linking cells to each other or to adjacent tissue surfaces is an important prerequisite for the characterization of adhesion processes occurring in the blood circulation and elsewhere, such as cancer metastasis, platelet thrombosis, and leukocyte margination and extravasation. In recent years, considerable efforts have been made to develop experimental methods to measure the force involved in cell-cell adhesion. Chien et al. (1,2) have measured the hydrodynamic force necessary to disaggregate an individual doublet of discoid erythrocytes. They used the bulk fluid shear stress as the disrupting force, which is an approximation of forces acting on such a doublet. Evans et al. (3-5) have developed techniques of micromanipulation (micropipette aspiration) of individual cells whereby analysis of their deformation when brought into contact provides a measurement of surface affinity. With this technique they have measured the force required to disrupt two erythrocytes that have been agglutinated (6). Tha et al (7-9) have developed theoretical and experimental approaches, with a traveling microtube apparatus, to calculate the force required to separate two red blood cells spheres crosslinked by antibody. Rasia et al (10,11) have attempted to determine thermodynamic parameters of red blood cells (RBC) specific-antibody interaction by analyzing laser intensity backscattered by suspended agglutinates mechanically dissociated in a Couette shear flow.

The present paper describes experiments carried out to measure the work done to detach red cells agglutinated by specific monoclonal antibodies applying hydrodynamic forces in a shear flow. Flow chamber technique was applied to determine the partial separation of two RBC agglutinated face to face (doublet) and to evaluate the force required to separate both cells.

MATERIALS AND METHODS

Red Blood Cells: fresh blood samples were drawn from healthy volunteers of A₁ group (12) with EDTA-K₃ as anticoagulant. Each sample was centrifuged at 3000g during 10 minutes. After centrifugation, the plasma and buffy coat were removed and the settled RBC were washed three times in phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.4, containing 0.20 % human serum albumin (HSA).

Monoclonal antibodies (MAb): the culture supernatant of a murine hybridoma cell line producing the S10-11A6 IgG₁ anti-A monoclonal antibody was the generous gift of Dr. Sondag (Centre de Transfusion Sanguine of the Centre Hospitalier Universitaire, Liege, Belgium). The supernatant was centrifuged to remove cells and debris, supplemented with 0.1 % sodium azide to maintain sterility and stored at 4°C.

Red cell suspensions: RBCs were resuspended at a final concentration of approximately 5.1×10^6 RBC/ml (≈ 0.07 %) in PBS-HSA containing MAb dilutions ranging from 11.6 to 18.6 ng/ml (dilutions of 1/1000, 1/1200, 1/1400, 1/1500 and 1/1600).

Flow chamber: the experiments were carried out in a geometrically defined channel of a parallel plate flow chamber (1). The chamber was made by sandwiching an 840 μ m thick parafilm sheet with a cut out of 1.8 x 4.3 cm, between a thick Plexiglas base (6.7 x 4.2 x 0.8 cm) and a thin cover glass (53 x 78 x 0.32 mm). The channel was sealed by vacuum. The acrylic base has two rectangular apertures 4 cm apart, which was used as inlet and outlet of the fluid for the channel. The inlet was connected to a servo-controlled peristaltic pump (Masterflex, Cole Palmer Instrument, USA) having a continuous variable speed control to induce controlled flow of PBS-HSA in the channel. This channel was installed on the stage of an optical inverted microscope (magnification x 60) which a CCD camera and connected to a Digital Image Processor (Visilog 5.1, Noesis, France) to analyze microscopic images.

Experimental procedure

The cell suspension was incubated at room temperature for 45 min while stirred on a rotary mixer at 3 rpm to homogenize the antibody fixation in order to attain the formation of agglutinates by MAbs. After the introduction of the cell suspension in the flow channel 30 min was allowed for the agglutinates to settle on the channel floor. All the experiments were performed at room temperature. A cell free PBS-HSA was then pumped through the channel. The flow rate (Q) was increased, in a stepwise fashion to achieve a shear stress range from 4 to 150 mPa. By scanning microscopically the channel floor while the suspension was at rest, a two cells agglutinate (doublet) was chosen to be observed, recorded and analyzed at each level of shear stress. The degree of disaggregation in response to shear flow was correlated with the shear stress acting on the doublet.

Controlled shear stress: the shear stress (τ , in mPa) acting on the aggregates that had settled on the channel floor was calculated from the channel geometry (height [h] and width [w], in cm), the flow rate (Q , in cm^3/s) and the viscosity of the fluid (η_0 , in mPa.s) as follows (13):

$$\tau = \frac{6\eta_0 Q}{h^2 w} \quad (1)$$

RESULTS

Experiments were performed on agglutinates having five different levels of density of bound antibodies on the RBC membrane. Experiments of shear stress separation were performed on two-cell agglutinates induced by each of the five different antibody dilutions. A RBC doublet that stacked itself in a top-bottom configuration adhered to the channel floor was chosen in each experiment to be subsequently analyzed. At the start of the separation process one can assume that the cross-links distribution is homogeneous in the adhered area

of membrane. This condition can be accepted until the contact area attains the 50 % of the original value. After applying the shear stress, the top cell was peeled away from the bottom cell, which remained attached to the channel floor because of its adherence to the slide base (figure 1). The process of dissagregation of the cell doublets under shear was analyzed. A fraction of the initial agglutinated area between both cells became separated at each stress step. Figure 2 shows the relationship between the fraction of separated area and the applied shear stress. It is important to indicate that every point in the curves represent averaged values obtained from n analyzed doublets. With increasing shear stress the adhered area progressively decreases and the length of separation increases. When the contact area is only a few percent of the original value, there is a molecular rearrangement with an increased concentration of cross-links at the edge of the adhered area. This behavior, as described by Skalak and Zhu (14), could demonstrate why the separation curves appear going to an apparent saturation as the shear stress increases.

The MAb density (D , in molecules/ μm^2) for each dilution was estimated as follows (15):

$$D = \frac{B \cdot N}{mw \cdot N_c \cdot A} \quad (2)$$

where B is the concentration of Mab-bounds estimated by ELISA (16) (in g/ml), mw is the molecular weight of the MAb (150 kDaltons), N is the Avogadro's number (6.02×10^{23} molecules/mol), N_c is the total number of RBCs in the suspension, and A is the surface area of each RBC ($150 \mu\text{m}^2$).

The energy (γ_d) required to separate a unit area of adhesion between both cells of any doublet can be calculated from the work done by the shear stress (15):

$$\gamma_d = \frac{A_E \cdot \tau_{50} \cdot d_{50}}{A_E} = \tau_{50} \cdot d_{50} \quad (3)$$

where A_E ($50 \mu\text{m}^2$) is the projected area of the top cell (area of cell exposed to the shear stress), τ_{50} is the shear stress required to separate 50 % of the interaction area and d_{50} ($4 \mu\text{m}$) is the distance through which the top cell was moved when 50 % of interaction area becomes separated.

The τ_{50} and γ_d values for agglutinates having different surface antibody densities are given in table 1. As the surface density of the MAb molecules increased, an increase of the shear stress required to separate a determined fraction of adhered area of the agglutinated cells has been observed. Furthermore, a direct correlation between γ_d and D ($r = 0.987$) was found. The mean ratio of γ_d/D was 8.92 ($SD = 0.50$) $\times 10^{-19}$ N.cm/molecule.

DISCUSSION

The development of methods for analyzing the capability of human and murine antibodies lead to the improvement of the quality and the standardization of the reagents used in immunohematology. The use of monoclonal antibodies as routine reagents obliged the producers to revise both the composition and the concentration of reagents. Indeed the performance of an immunological reagent depends on several factors, but at least two of them are very important: the immunological and physicochemical characteristics of the antibody and the medium.

In order to avoid some risks it is important to consider the nature, the affinity and the thermic optimum of the antibody. So it is important to define criteria for the selection of monoclonal antibodies and derived reagents. Essential criteria may be: the patterns of agglutination of common phenotype and variants, the affinity, the avidity and the specificity.

The comparative analysis of the specific energy determined for monoclonal antibodies can reveal the properties, particularly, the affinity, and hence the quality of each type of reagent.

One of the questions suggested by the use of monoclonal antibodies as immunohematological reagents is concerning the analysis of results of the molecular biology studies of blood groups. In practice, the use of selected monoclonal antibodies instead of polyclonal ones provides real advantages in the domain of blood transfusion biology: (a) the supply is unlimited, (b) the concentration of antibodies can be measured (ELISA, cytometry, etc), (c) there is significant reductions in the risk of contamination of the reagent, (d) antibodies can be selected a priori for their specificity and affinity. Hence, in immunohematology, the production of monoclonal antibodies will allow to develop new methods of testing.

One of the most important properties of an antibody is its affinity, which can be approached by determining the energy expended in the agglutination reaction. This energy could be quantitated applying a model propose by Sung et al. (15). These researchers used a flow chamber in which a cell doublet attached to the floor of the chamber was dissociated applying increasing fluid drag forces. These forces were calculated from the flow rate. The specific energy required to dissociate a unit area of interaction between two membranes mutually adhered, was estimated from the work done by the drag force in separating 50% of the adhered area. Indeed, it is possible that the specific energy calculated in such form would be lower than the effective energy used in separating completely two adhered cells. Studies carried out by Evans and Leung (6) have shown that disaggregation of red blood cells agglutinated by vegetal lectins may involve the planar displacement of the bridging molecules. Also Skalak and Zhu (14) indicated that there should be some molecular rearrangement which produces an increased concentration of bridges at the edge of the adhered area as it is reduced. However, in our studies as well as in the studies carried out by

Sung et al. (15) the percent of area separation increases proportionally to the applied shear stress. Indeed, the increasing work required causing additional separation support the hypothesis that the bridging MAb molecules are collected at the leading edge of the separation area. Thus, it is reasonable to think that one can have a lower value of γ , than the free energy change derived from MAb-receptor interaction. However, the adhesive energy determined with the flow chamber on RBC doublets, induced by low concentrations of MAb, can be considered as a good parameter to compare the quality of different monoclonal reagents because it estimates the affinity of the antibody.

The energy involved when human erythrocytes become agglutinated by MAb was quantified in an experimental setup that applies the flow channel technique. In our study a monoclonal antibody specific to the blood group A was used as an experimental model to investigate the energy of RBC agglutination through the mechanism of specific antigen-antibody recognition.

The energy exchanged in cell agglutination-dissociation has been assessed with the flow chamber method. The disaggregation γ_d/D ratio derived from our flow channel studies for the S10-2G12 IgG anti-A monoclonal antibody reacting against RBC of A₁ group was 8.92×10^{-19} N.cm/molecule. Sung et al. (15) were found γ_d/D values of 0.25×10^{-19} and 0.29×10^{-19} N.cm/molecule for aggregates induced by two lectins specific to blood group A, *Helix pomatia* (HPA) and *Dolichos biflorus* (DBA), respectively. The shear stress needed to separate MAb-induced two-cell aggregates was found to be proportional to the surface density of antibody molecules. Comparative results of several dilutions of the same antibody reacting against the same blood sample showed markedly different dissociation curves demonstrating the importance of the surface density of cross-linking molecules in determining the energy exchanged in red blood cell agglutination.

Thus this biophysical approach can provide new and interesting information about the intercellular adhesion and, consequently, may suggest new questions on the energies involved in immunological RBC agglutination. Such information on the energy existing between membranes agglutinated by MAb may help to understand many important physiological and pathological phenomena but particularly, it can help in the quality control of monoclonal antibodies.

References:

1. Chien, S., Sung, L.A., Kim, S., Burke, A.M., and Usami, S. (1977). Determination of aggregation force in rouleaux by fluid mechanical technique. *Microvasc. Res.* **13**, 327-333.
2. Chien, S., Sung, L.A., Simchon, S., Lee, M.M.L., Jan, K.M., and Skalak, R. (1983). Energy balance in red cell interactions. *Ann. NY Acad. Sci.* **416**, 190-206.
3. Evans, E; Berk, D., and Leung, A. (1991). Detachment of agglutinin-bonded red blood cells. I. Forces to rupture molecular-point attachments. *Biophys. J.* **59**, 838-848.
4. Evans, E; Berk, D.; Leung, A., and Mohandas, N. (1991). Detachment of agglutinin-bonded red blood cells. II. Mechanical energies to separate large contact areas. *Biophys. J.* **59**, 849-860.
5. Berk, D., and Evans, E. (1991). Detachment of agglutinin-bonded red blood cells. III. Mechanical analysis for large contact areas. *Biophys. J.* **59**, 861-872.
6. Evans, E., and Leung, A. (1984). Adhesivity and rigidity of erythrocyte membrane in relation to wheat germ agglutinin binding. *J. Cell Biol.* **98**, 1201-1208.
7. Tha, S.P., and Goldsmith, H.L. (1986). Interaction forces between red cells agglutinated by antibody. I. Theoretical. *Biophys. J.* **50**, 1109-1116.

8. Tha, S.P., Shuster, J., and Goldsmith, H.L. (1986). Interaction forces between red cells agglutinated by antibody. II. Measurement of hydrodynamic force of breakup. *Biophys. J.* **50**, 1117-1126.
9. Tha, S.P., and Goldsmith, H.L. (1988). Interaction forces between red cells agglutinated by antibody. III. Micromanipulation. *Biophys. J.* **53**, 677-687.
10. Rasia, R.J., Rasia-Valverde, J.R. and Stoltz, J.F. (1996). Weak «A» blood subgroup discrimination by a rheo-optical method: a new application of laser backscattering. *Optical Engineering*, **35**, 20-25.
11. Rasia-Valverde, J.R., Rasia, R.J., Botte, C., and Stoltz, J.F. (1997). Approche rhéologique de la réaction de dissociation d'agglutinats immunologiques érythrocytaires: application à des hématies du sous-groupe A. *Trans. Clin. Biol.* **4**, 203-211.
12. Oriol, R. (1998). ABO, Hh, Lewis: sérologie génétique et distribution tissulaire. *In Bases moléculaires des antigènes des groupes sanguins. De l'immunogénétique à la biologie cellulaire.* (Cartron, J.P., and Rouger, P., Eds.), pp. 39-75, MASSON, Paris.
13. Pierres, A., Benoliel, A-M., and Bongrand, P. (1996) Measuring bonds between surface-associated molecules. *J. Immunol. Methods*, **196**, 105-120.
14. Skalak, R., and Zhu, C. (1990). Rheological aspects of red cell aggregation. *Biorheology*, **27**, 309-323.
15. Sung, L.A., Kabat, E.A., and Chien, S. (1985). Interaction Energies in Lectin-induced Erythrocyte Aggregation. *J. Cell Biol.* **101**, 652-659.
16. Fleming, J.O., and Pen, L.B. (1988) Measurement of the concentration of murine IgG monoclonal antibody in hybridoma supernatants and ascites in absolute units by sensitive and reliable enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA). *J. Immunol. Methods*, **110**, 11-18.

Figure 1:

Effect of the shear stress on a doublet. The top cell being peeled away from the bottom cell as the shear stress increases: 1) $\tau = 0$ mPa; 2) $\tau = 4.8$ mPa; 3) $\tau = 13.2$ mPa; 4) $\tau = 35.4$ mPa; 5) $\tau = 63.2$ mPa; 6) $\tau = 96.5$ mPa.

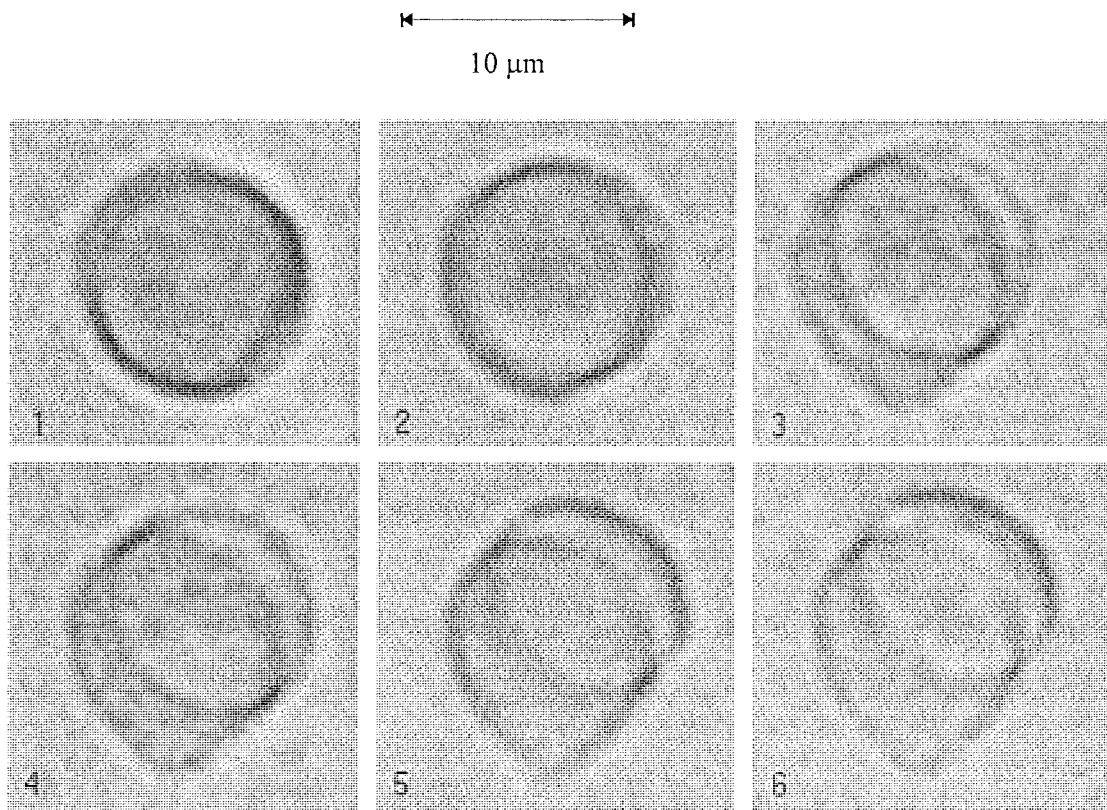


Figure 2

Percentage of separation from n cell doublets in function of the shear stress for different concentrations of MAb: ▼ 1/1000 (n = 8), ■ 1/1200 (n = 8), ● 1/1400 (n = 10), ▲ 1/1500 (n = 8) and ◆ 1/1600 (n = 8).

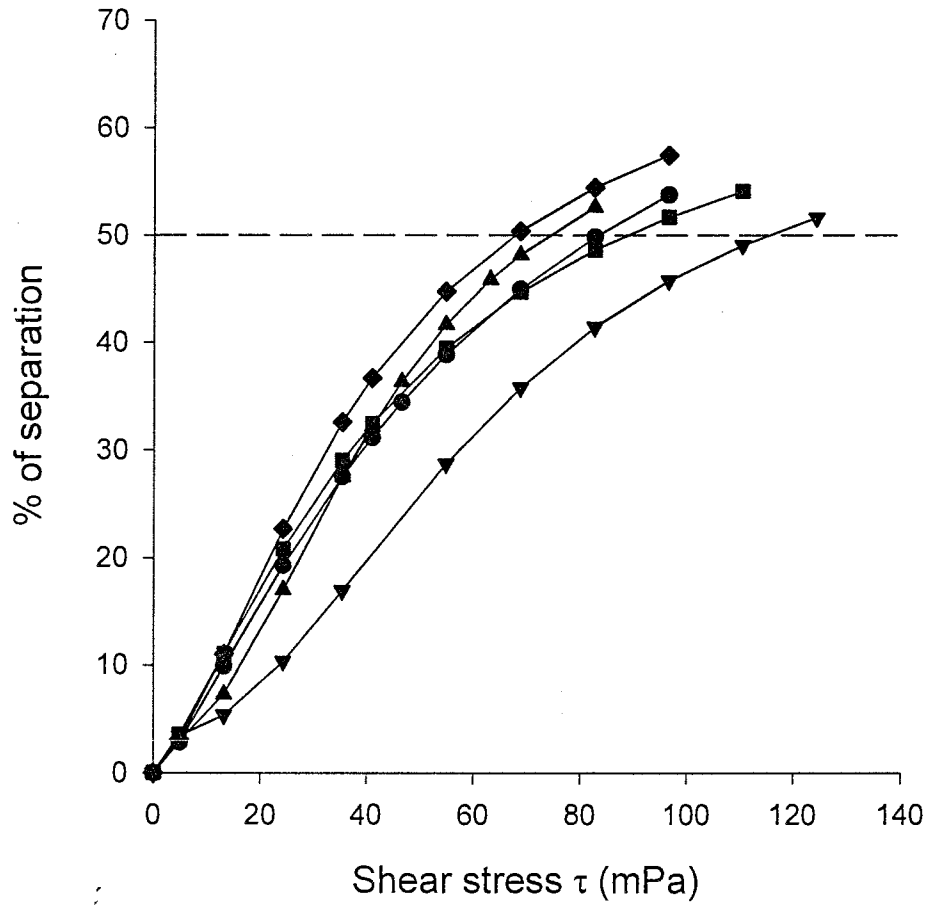




Table I

The disaggregation energy (γ_d) for MAb-induced erythrocyte agglutinates.

Dilution	D^* (molecules/ μm^2)	τ_{50}^* (mPa)	γ_d^* (10^{-9} N/cm)
1 / 1000	55 \pm 2	115.2 \pm 28.1 (n=8)	4.61 \pm 1.12
1 / 1200	41 \pm 2	88.4 \pm 18.1 (n=8)	3.54 \pm 0.73
1 / 1400	38 \pm 3	83.2 \pm 18.9 (n=10)	3.33 \pm 0.76
1 / 1500	34 \pm 3	73.8 \pm 17.1 (n=8)	2.95 \pm 0.68
1 / 1600	27 \pm 4	67.6 \pm 16.1 (n=8)	2.70 \pm 0.65

* \pm SD

Nom : Mlle PLA
Prénom : Laura

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ, NANCY 1

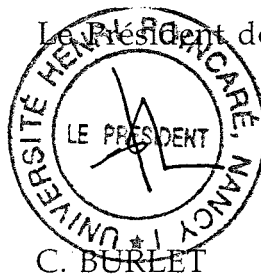
en BIOLOGIE ET SANTÉ

Spécialité : GÉNIE BIOLOGIQUE ET MÉDICAL

VU, APPROUVÉ ET PERMIS D'IMPRIMER

Nancy, le 4 décembre 2000 n°427

Le Président de l'Université



Contribution à l'étude de l'affinité des anticorps monoclonaux par des méthodes d'optique physique

RESUME : Les mécanismes d'interaction conduisant à l'adhésion cellulaire présentent un intérêt fondamental pour les sciences biologiques et médicales. En particulier, l'interaction et l'adhésion érythrocytaire ont été considérées.

L'objectif de ce travail était d'étudier les interactions cellule-cellule, par la détermination de l'énergie de liaison intercellulaire en utilisant deux techniques rhéo-optiques. Nous avons utilisé des agglutinats érythrocytaires induits par un anticorps monoclonal comme modèle expérimental d'interaction cellulaire spécifique. Dans un premier temps, nous avons quantifié l'énergie impliquée dans la dissociation intercellulaire par une approche microscopique (chambre de flux). Cette méthode permet d'appliquer une contrainte de cisaillement parallèle à l'interface d'adhésion d'un agglutinat à deux cellules (doublet). Les agglutinats, soumis à une contrainte de cisaillement, sont observés au microscope et les images prises sont enregistrées. L'analyse de ces images rend possible la quantification directe du degré de dissociation en réponse à la contrainte appliquée. Dans un second temps, nous avons étudié l'énergie impliquée dans l'agglutination immunologique par une approche plus globale (érythroagrégamètre). Dans cette méthode, le signal d'intensité lumineuse rétrodiffusée par des agglutinats en suspension est mesuré. Les agglutinats sont dissociés par la contrainte de cisaillement constante appliquée dans l'entrefer d'un viscosimètre du type Couette.

Dans ces deux techniques, une corrélation entre la densité en anticorps sur la membrane érythrocytaire et les différents paramètres expérimentaux obtenus a été mise en évidence.

En conclusion, l'énergie de dissociation cellulaire a été obtenue à partir des mesures expérimentales et de l'analyse théorique. Les approches utilisées pour l'étude de ce système érythrocytes-anticorps peuvent être étendues, moyennant certaines modifications, aux autres systèmes impliquant d'autres molécules d'interaction.

Mots clés : érythrocyte, anticorps monoclonal, agglutination immunologique, adhésion cellulaire, chambre de flux, érythroagrégamètre, contrainte de cisaillement.

Contribution to the study of affinity of monoclonal antibodies for optical-physical methods

ABSTRACT : The mechanism of interaction involved in cell-cell adhesion has significant implications in biological and medical sciences. Particularly, the erythrocyte interaction and erythrocyte adhesion to the vascular tissue have been widely studied.

The purpose of this work was to study the cell-cell interaction, by the quantification of the intercellular binding energy by two reo-optical techniques. In the present study, red blood cell agglutinates induced by monoclonal antibodies have been used as an experimental model system of specific cell-cell interaction.

First, the energy involved in intercellular dissociation was quantified by a microscopic approach (flow channel). By this method a uniform shear stress parallel to the two-cells agglutinate interface is applied. The agglutinates, subjected to the shear stress, were observed under the microscope and the images were recorded. The analysis of these images allowed the direct quantification of the degree of dissociation in response to applied shear flow. Second, the energy involved in immunological agglutination was studied by a global approach (erythroaggregometer). Backscattered light intensity from the agglutinate suspension was evaluated. These agglutinates were dissociated by imposing a constant shear stress in a transparent Couette viscometer.

In both techniques, a direct correlation between the surface density of monoclonal antibody molecules on the erythrocyte membrane and the different parameters was found.

In conclusion, the energy involved in cell-cell dissociation has been assessed by experimental measurements and theoretical analysis. The approaches used in this erythrocyte-antibody system may be extended, with proper modifications, to other cell systems involving other interacting molecules.

Keywords : erythrocyte, monoclonal antibody, immunological agglutination, cellular adhesion, flow channel, erythroaggregometer, shear stress

Spécialité:

Génie Biologique et Médical

Angiohématologie-Hémorhéologie

LEMTA – UMR CNRS 7563

Faculté de Médecine, BP 184, UHP – Nancy 1

54500 Vandoeuvre-lès-Nancy