

Quelques applications de traceurs radioactifs en immunologie

Autor(en): **Cerottini, J.-C. / Isliker, H.**

Objekttyp: **Article**

Zeitschrift: **Bulletin der Schweizerischen Akademie der Medizinischen Wissenschaften = Bulletin de l'Académie Suisse des Sciences Medicales = Bollettino dell' Accademia Svizzera delle Scienze Mediche**

Band (Jahr): **21 (1965)**

PDF erstellt am: **21.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-307606>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Institut de Biochimie de l'Université de Lausanne et Institut Suisse de Recherches
expérimentales sur le Cancer

Quelques applications de traceurs radioactifs en immunologie

Par J.-C. Cerottini et H. Isliker, Lausanne

L'utilisation d'isotopes radioactifs a favorisé de tels progrès dans la connaissance des phénomènes immunitaires que le nombre des méthodes radiochimiques ne fait qu'augmenter.

L'emploi d'antigènes marqués fournit d'amples informations sur leur élimination de la circulation, leur distribution dans les différents tissus, leur localisation intracellulaire et leur catabolisme.

L'injection d'acides aminés marqués chez l'animal immunisé permet d'étudier la vitesse et le lieu de formation des anticorps; la synthèse *in vitro* des anticorps peut également être suivie de façon précise. Grâce à la radio-immunoélectrophorèse, on peut apprécier le type d'immunoglobuline formé en réponse à une stimulation antigénique donnée.

L'étude de la structure des anticorps et de leurs produits de dégradation enzymatique a bénéficié de la très grande sensibilité des méthodes radiochimiques.

1. Catabolisme des antigènes

L'épuration sanguine d'une protéine hétérologue, après injection intraveineuse, présente trois phases bien distinctes [1]:

1. Une première phase, très rapide, représente l'équilibration entre les systèmes intra- et extravasculaires.

2. Dans une deuxième phase, la protéine étrangère est éliminée de la circulation de la même façon qu'une protéine homologue, c'est-à-dire selon une courbe exponentielle, qui est l'expression du catabolisme normal du type de protéine considéré.

3. Lors de la troisième phase, l'épuration sanguine de la protéine hétérologue est très rapide, à la suite de la combinaison de l'antigène (en l'occurrence la protéine) à l'anticorps dont il a provoqué la formation,

et de la phagocytose de ce complexe par le système réticulo-endothélial, où il est rapidement hydrolysé par des enzymes protéolytiques.

Chez l'animal immunisé qui possède des anticorps circulants, le catabolisme de l'antigène est accéléré, car la troisième phase de l'épuration sanguine débute peu après l'injection intraveineuse de la protéine hétérologue. En revanche, une dose de rayons X suffisante pour inhiber la réponse immunitaire entraîne une disparition de cette troisième phase, la protéine hétérologue étant considérée comme homologue [17]. Cette

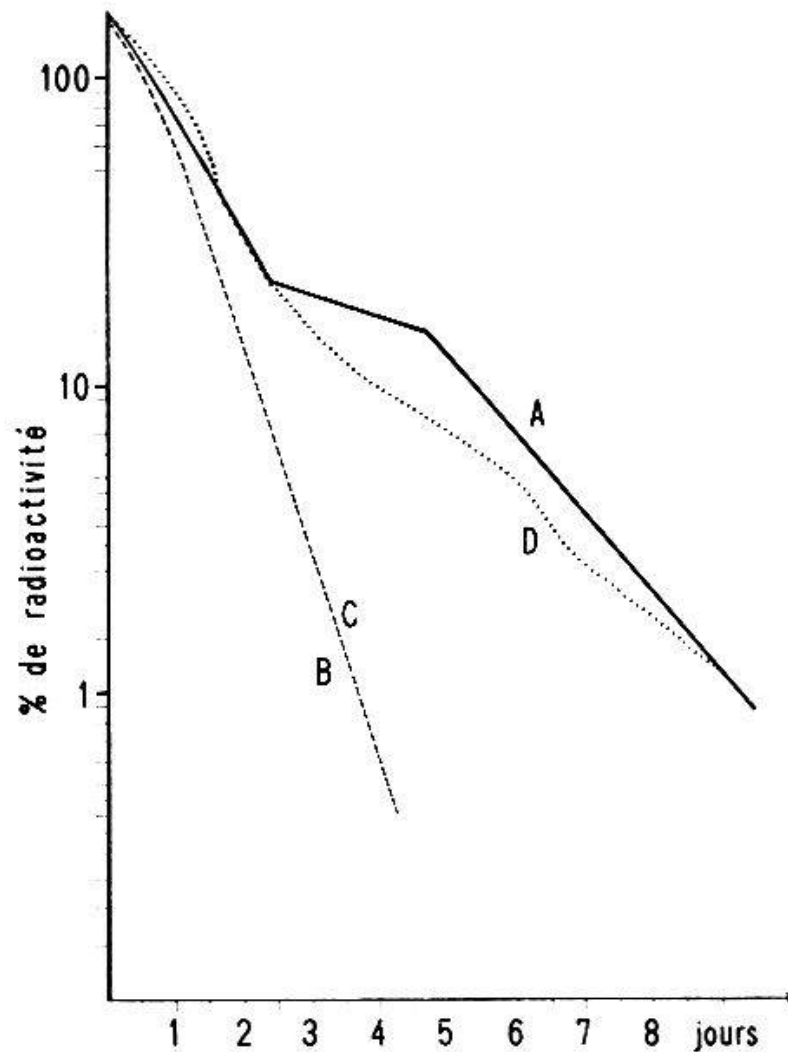


Fig. 1. Épuration sanguine chez la souris de la sérualbumine humaine marquée par ^{131}I (d'après Amiel et collab. [2]). - En abscisse: temps écoulé après l'injection intraveineuse de l'albumine marquée, en jours. En ordonnée: en échelle semi-logarithmique, pourcentage de la radioactivité sanguine, la radioactivité 24 h après l'injection étant prise comme valeur de référence. - A: souris non immunisées. - B: souris immunisées et non traitées par un antimétabolite. - C: souris immunisées et traitées par la 6-mercaptopurine, avant, pendant ou après l'immunisation. Dose de 6-mercaptopurine utilisée: 24 mg/kg/jour pendant 6 jours, puis 12 mg/kg tous les 2 jours pendant 14 jours. La courbe d'épuration ne se distingue pas de celle de B. - D: souris immunisées et traitées par la cyclophosphamide pendant et après l'immunisation. Dose de cyclophosphamide utilisée: 42,5 mg/kg/jour pendant 6 jours, puis 21,25 mg/kg tous les 2 jours pendant 14 jours. Ce traitement provoque une inhibition de la formation des anticorps circulants.

troisième phase permet donc d'apprécier indirectement la production des anticorps *in vivo*.

2. Production d'anticorps

Amiel et collab. [2] ont utilisé cette méthode pour étudier l'effet de divers antimétabolites sur la réponse immunologique. Par la mesure de l'épuration sanguine de la sérumalbumine humaine marquée par ^{131}I chez des souris immunisées contre ce même antigène, ils ont constaté que l'administration de 6-mercaptopurine avant, pendant ou après l'immunisation n'a pas d'effet sur la production des anticorps, l'albumine marquée disparaissant à la même vitesse que chez un animal immunisé mais non traité par un agent antimétabolite (fig. 1, C).

La cyclophosphamide n'a pas d'effet si elle est administrée avant l'immunisation; en revanche, si on commence le traitement médicamenteux au début de l'immunisation et si on le poursuit une semaine après la fin de l'immunisation, la production d'anticorps est fortement inhibée, ce qui se traduit par une nette diminution de l'épuration sanguine de l'albumine marquée (fig. 1, D).

La synthèse *in vivo* des anticorps peut être étudiée directement par l'administration d'acides aminés marqués lors de l'immunisation [3]. Plus remarquable encore est la démonstration de la synthèse *in vitro* d'anticorps: dans ce cas, on ajoute à un milieu de culture contenant le tissu à étudier des acides aminés marqués au ^{14}C . Après un temps d'incubation adéquat, ce milieu de culture est recueilli, concentré, les protéines sont isolées et soumises à une immunoélectrophorèse combinée à une autoradiographie. L'analyse des arcs de précipitation radioactifs permet de préciser la nature des immunoglobulines synthétisées [4].

Grâce à cette méthode, il a pu être démontré récemment que les lymphocytes humains en culture pouvaient synthétiser les trois types d'immunoglobulines. Après incubation pendant 48 h à 37°C de 10^8 lymphocytes dans un milieu de culture contenant de la glycine marquée au ^{14}C , du sérum humain est ajouté à ce milieu de culture pour favoriser la formation en immunoélectrophorèse des arcs de précipitation avec un sérum dirigé contre les constituants du sérum humain. Par comparaison avec une autoradiographie de la même préparation, on peut constater que la radioactivité se retrouve dans les γG , γA et γM [5, 6]¹.

¹ Une nouvelle terminologie a été adoptée récemment par l'Organisation Mondiale de la Santé [7]:

<i>ancien usage</i>	<i>nouvel usage</i>
$\gamma_2\gamma_2$	γG
$\beta_2\text{A} \cdot \gamma_1\text{A}$	γA
$\beta_2\text{M} \cdot \gamma_1\text{M}$	γM

La combinaison d'une immunoélectrophorèse et d'une autoradiographie permet également d'identifier le type d'anticorps produit lors d'une sensibilisation à un antigène donné. Dans ce cas, on ne marque pas l'anticorps mais l'antigène. Par exemple, le sérum de patients sensibilisés au «ragweed» est soumis à une immunoélectrophorèse à l'aide d'un sérum dirigé contre les composants du sérum humain. Puis l'antigène marqué par ^{131}I , en l'occurrence l'extrait du «ragweed», est ajouté: il va donc se combiner spécifiquement avec les anticorps qui sont dirigés contre lui. Ces anticorps sont alors visibles en autoradiographie. Dans ce cas particulier, on peut démontrer que des anticorps anti-«ragweed» appartiennent aux γG , aux γA ou aux γM [8].

Micheli et Goodman [9] ont utilisé la même méthode: un sérum de lapin antithyréoglobuline est révélé par un sérum de bouc antilapin. L'adjonction de thyroglobuline marquée par ^{131}I montre que les anticorps dirigés contre cette protéine appartiennent à la classe des γG -immunoglobulines.

Le grand avantage de cette méthode est son extrême sensibilité, puisqu'il est possible de détecter des anticorps antiprotéines dès que leur concentration dépasse $0,1 \mu\text{g/ml}$. D'autre part, la radio-immunoélectrophorèse se révèle également très utile dans l'étude des anticorps non précipitants et des fragments d'anticorps.

3. La structure des anticorps

L'application des isotopes à l'étude de la structure des anticorps a permis de progresser dans la connaissance de la composition chimique de ces anticorps, en particulier de leur site de combinaison. Ce dernier constitue environ 0,4 à 0,7% de la surface totale de l'anticorps.

Pressman constata que des anticorps dirigés contre divers groupes hapténiques perdaient leur activité, lorsqu'ils avaient été iodés. Si le site de combinaison était protégé pendant l'iodination par la fixation de l'haptène à son anticorps, l'activité n'était pas modifiée [10]. Cette constatation indiquait que le site de combinaison contenait un ou plusieurs résidus tyrosyl, capables de fixer l'iode. Par l'utilisation de cette méthode de protection spécifique, combinée à un double marquage, on a pu isoler des peptides appartenant au site de combinaison [11].

Dans une première expérience, le fragment d'anticorps purifié, contenant un site de combinaison dirigé contre le *p*-azobenzoate, est iodé par ^{125}I ; dans une seconde expérience, un fragment identique est combiné à l'haptène et iodé par ^{131}I . Le degré d'iodination est le même pour les deux portions. Les fragments sont réunis et digérés à la pepsine: on obtient ainsi des peptides qui peuvent être séparés par électrophorèse à haut voltage.

^{125}I et ^{131}I possédant des énergies très différentes, il est possible de déterminer le rapport $\frac{^{125}\text{I}}{^{131}\text{I}}$ de chaque peptide et de le comparer à celui du digestat total (fig. 2).

Ce dernier présente un rapport égal à 1, puisque le nombre d'atomes d'iode est le même dans les deux portions. Il en va de même pour la plupart des autres peptides, sauf s'ils appartiennent au site de combinaison. Dans ce cas, le rapport s'élève au-dessus de 1, il est de 2 dans le schéma et serait infini si la protection était complète.

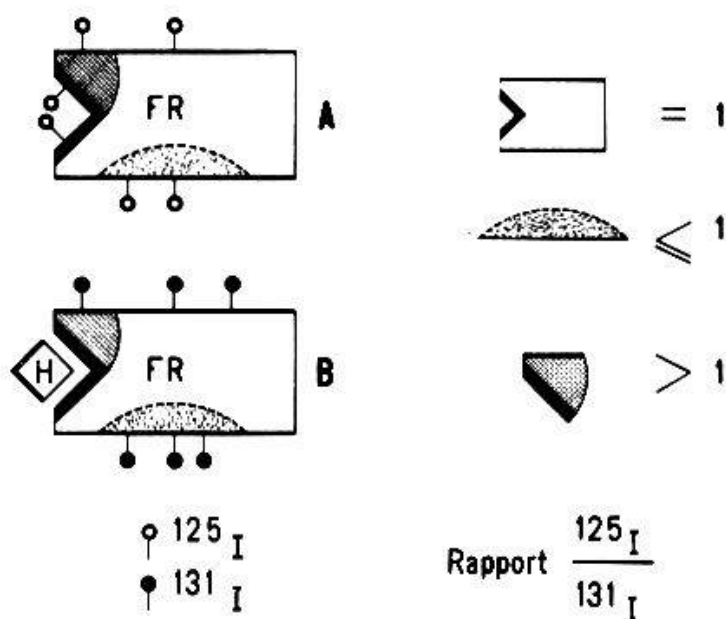


Fig. 2. Isolement des peptides appartenant au site de combinaison d'un anticorps. — A: le fragment Fab (FR) d'un anticorps est marqué par ^{125}I en absence de l'haptène. — B: un fragment identique est combiné à l'haptène (H), puis marqué par ^{131}I , à la même étendue que A. Les fragments sont réunis et digérés à la pepsine: le rapport $\frac{^{125}\text{I}}{^{131}\text{I}}$ du digestat total est égal à 1. Après séparation par électrophorèse à haut voltage, la plupart des peptides (aire pointillée) possèdent un rapport égal ou inférieur à 1. En revanche, si les peptides appartiennent au site de combinaison (aire quadrillée), ce rapport est supérieur à 1, car le ou les résidus tyrosyl du site de combinaison de B n'ont pas réagi avec ^{131}I .

En remplaçant l'iode par le chlorure de l'acide p-iodo-benzoïque, qui réagit, non pas avec un résidu tyrosyl, mais amino, *Grossberg* et collab. [12] ont montré que les sites de combinaison d'anticorps dirigés contre le même déterminant ne possédaient pas tous la même teneur en acides aminés, les sites d'un groupe d'anticorps ayant un résidu amino, absent du site d'un autre groupe.

Dans notre laboratoire, nous nous sommes intéressés à l'étude des propriétés des fragments d'anticorps. Si on schématise la molécule de

γ G-immunoglobuline 7S par l'assemblage de quatre chaînes polypeptidiques [16], il est possible par réduction partielle en présence d'agents dénaturants de scinder la molécule en quatre chaînes, deux chaînes lourdes (H = «heavy») avec un poids moléculaire de 60 000, et deux chaînes légères (L = «light») avec un poids moléculaire de 20 000 (fig. 3, I). En milieu légèrement acide, une scission réductive en demi-molécules est possible (fig. 3, II).

D'autre part, le traitement enzymatique à la pepsine, en présence d'un réducteur [18], produit deux fragments (Fab = «antigen binding») capables de fixer l'antigène correspondant (fig. 3, III). Un traitement des anticorps 7S à la papaïne (fig. 3, IV) produit en plus des deux fragments Fab (I et II selon Porter [19]) un troisième fragment (Fc ou III), qui se fixe non spécifiquement sur les tissus. Lors d'une digestion prolongée à la pepsine, ce dernier fragment est dégradé en peptides qui ne contiennent plus d'activité biologique.

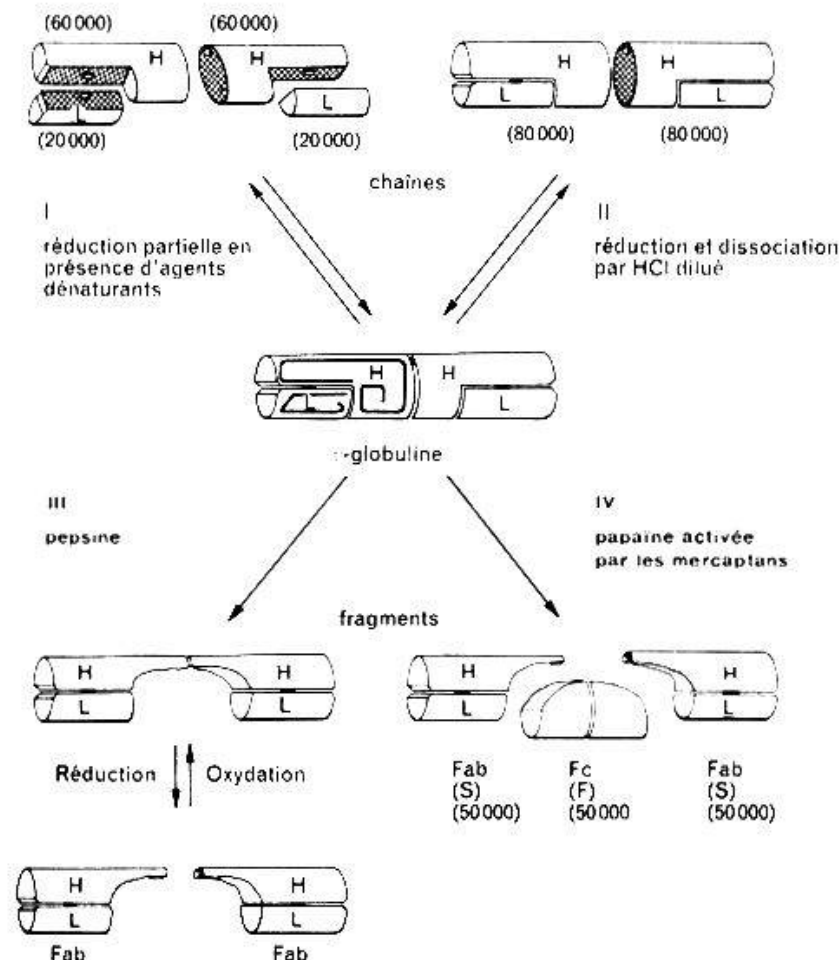


Fig. 3. Schéma illustrant les possibilités de dégradation des γ G-immunoglobulines (Edelman et Gally 1964). Les nombres entre parenthèses indiquent les poids moléculaires approximatifs. Les surfaces hachurées représentent des régions de liaisons non-covalentes. Les ponts disulfures sont indiqués par des rectangles noirs (ponts non scindés) ou des cercles blancs (demi-cystines).

Il est possible d'étudier la fixation directe des fragments marqués par ^{131}I , en incubant ces fragments avec un antigène particulière et en déterminant la radioactivité du complexe antigène-anticorps rapporté à la radioactivité totale du fragment ajouté au système. On peut utiliser également une méthode de fixation indirecte, qui consiste à mesurer le déplacement de la radioactivité d'anticorps marqués par des fragments d'anticorps non marqués. Dans un premier temps, on détermine la radioactivité du complexe antigène-anticorps après lavage. Dans un deuxième temps, le complexe est incubé avec des anticorps ou des fragments non marqués. On mesure la quantité d'anticorps radioactifs élués après centrifugation et on contrôle la radioactivité du complexe après élution.

Utilisant la méthode de fixation directe de fragments d'anticorps anti-érythrocytes de mouton sur l'antigène homologue, *Jaton et Isliker* [13] ont montré que le fragment Fc se fixait peu sur l'antigène, lorsqu'on le comparait aux fragments Fab (I et II) (tab. 1).

Tableau 1

Fixation directe de fragments d'anticorps antiérythrocytes de mouton marqués par ^{131}I sur des stromas d'érythrocytes de mouton

Fragment	Quantité de fragment en μg	% de fragment d'anticorps (^{131}I) fixés sur stromas*
Fab (I)	10	19,8
	30	19,8
	50	19,5
Fab (II)	10	22,4
	30	25,8
	50	29,0
Fc (III)	10	11,3
	30	10,9
	50	11,8

* Les fragments marqués par ^{131}I furent incubés 1 h à 37°C et 3 h à $+4^\circ\text{C}$ avec 0,2 ml d'une suspension de stromas à 0,1%. Les % indiquent les c/m fixés sur les stromas, après trois lavages à 4°C par rapport au nombre total de c/m (*Jaton et Isliker* [13]).

La fixation des fragments Fab est spécifique, car ils possèdent un site de combinaison, alors que celle du fragment Fc est non spécifique. On peut le démontrer en étudiant la fixation directe de fragments de γ -globulines humaines sur du tissu hépatique (tab. 2). Dans ce système non spécifique, les fragments Fab ne se fixent pratiquement pas, contrairement au fragment Fc. Si l'on étudie l'effet de ces fragments sur l'élution

Tableau 2
Fixation directe de fragments de γ -globuline humaine marquée au ^{131}I sur tissu hépatique humain

Fragment	Quantité de fragment en μg	% de fragment de γ -globuline fixés*
Fab (I)	10	0
	30	0
	100	0
Fab (II)	10	0,3
	30	0,09
	100	0,07
Fc (III)	10	6,6
	30	6,2
	100	7,8
$\gamma\text{G 7S}$	10	6,6
	30	5,8
	100	9,7

* Les γ -globulines furent marquées par ^{131}I , puis fragmentées selon *Nisonoff* [18], incubées 5 min avec 100 mg de tissu hépatique dans un volume de 2,5 ml (*Isliker, Cerottini, Jaton et Magnenat* [15]). La digestion fut interrompue avant dégradation du fragment Fc, qui dans ces conditions forme un précipité incolore.

Tableau 3
Effet de fragments de γ -globulines humaines sur l'élué de γ -globulines marquées au ^{131}I fixées sur du tissu hépatique*

Eluant	Concentration (%)	% de γ -globulines (^{131}I) élués de foie humain	
Fab (I)**	0,1	5,4	4
Fab (II)	0,1	8,6	6
Fc (III)	0,1	23,5	12,7
γ -globuline	0,1	13,5	15,6
γ -globuline	2	24,4	29,6
Albumine	0,1	2,6	3,8
Tampon (tri-éthanolamine)	0,15 M	4,0	5,8

* 100 mg de tissu hépatique humain normal furent incubés avec 2,5 ml de γ -globulines humaines marquées par ^{131}I (5-20 μg), 5 min à 37°C, puis lavés trois fois (*Jaton et Isliker* [13]).

** Les fragments furent obtenus par une brève digestion des γ -globulines avec de la pepsine, suivie d'une réduction avec 0,01 M de mercaptoéthylamine, traitement à l'iodacétamide et chromatographie sur CM-cellulose [18].

de γ -globulines marquées par ^{131}I fixées sur le tissu hépatique, on constate le même résultat (tab. 3).

Des considérations semblables s'appliquent à la fixation d'anticorps γM possédant un coefficient de sédimentation de 19 S. Lorsque ceux-ci sont réduits en présence de 0,1 M-mercaptoéthylamine, il se forme des sous-unités 6 S, incapables d'agglutiner l'antigène (globules rouges par exemple). Si l'on traite des complexes contenant des anticorps 19 S marqués par ^{131}I par des anticorps réduits et non marqués, on constate que les sous-unités déplacent la même quantité de radioactivité (14–16%) que les anticorps non traités [14]. Dans les mêmes conditions, l'eau physiologique n'élue que 3–4% de la radioactivité (fig. 4). Cette expérience suggère que les sous-unités 6 S des γM -immunoglobulines contiennent chacune au moins un site de combinaison. Une molécule de γM étant composée de 6 sous-unités, on peut conclure que la valence immunologique des γM -immunoglobulines est de l'ordre de 6 ou plus.

Plus récemment, nous avons étudié les possibilités de conjuguer des médicaments à des anticorps. Cette étude a pour but de concentrer des médicaments sur des antigènes microbiens ou tumoraux, afin de diminuer la toxicité des médicaments occasionnée par leur effet sur les tissus normaux [15].

Il s'est avéré que certains médicaments perdent leur activité, lorsqu'ils sont conjugués à une protéine vectrice. Pour cette raison, il a fallu choisir des liaisons chimiques susceptibles d'être scindées sous l'action d'enzymes présents dans les tumeurs ou à proximité des antigènes. Il est évident

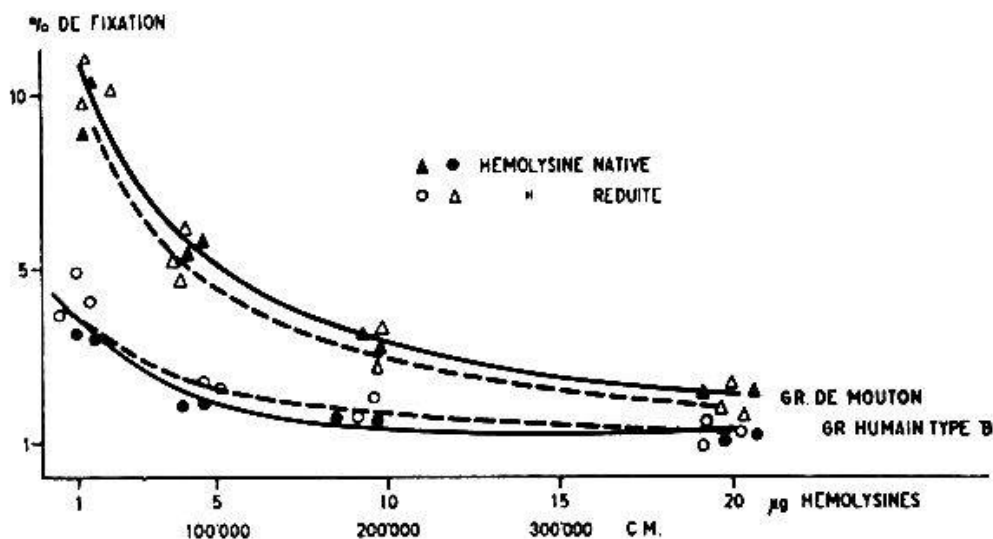


Fig. 4. Fixation de hémolysines 19S natives et 6S réduites sur des globules rouges de mouton (réactions spécifiques représentées par les deux courbes supérieures). La fixation non spécifique de ces mêmes hémolysines sur des érythrocytes humains du type B est représentée par les deux courbes inférieures (Jacot-Guillarmod et Isliker [14]).

que le succès d'une thérapeutique par des médicaments conjugués dépend de deux facteurs opposés: la rapidité de fixation du conjugué sur l'antigène et la vitesse de scission du complexe *in vivo*.

Nous avons étudié un système modèle, comprenant *Trichomonas foetus* et des γ -globulines de lapin anti-*Trichomonas foetus* couplées au métronidazol par une liaison ester. Pour déterminer l'épuration sanguine et la distribution *in vitro* et *in vivo* de ces conjugués, il est indispensable d'utiliser des traceurs radioactifs, l'anticorps étant marqué par ^{131}I et le médicament par ^{14}C ou ^{35}S .

Les quelques exemples que nous avons choisis correspondent plus particulièrement à l'activité de notre laboratoire. Il va sans dire que les méthodes radiochimiques utilisées en immunologie sont très nombreuses et les exposés suivants démontreront les multiples applications des traceurs radioactifs, qui se sont révélés d'un apport précieux dans la connaissance des phénomènes immunologiques.

Résumé

Quelques méthodes radiochimiques utilisées en immunologie sont décrites.

L'épuration sanguine d'un antigène marqué permet de suivre la formation des anticorps circulants et d'apprécier l'influence des rayons X ou des antimétabolites sur la réponse immunologique. L'adjonction d'acides aminés marqués à un milieu de culture favorise la mise en évidence de la synthèse *in vitro* des anticorps. Le type d'immunoglobuline synthétisée est aisément déterminé par radio-immunoélectrophorèse.

La méthode de protection spécifique du site de combinaison d'un anticorps, combinée à un double marquage radioactif, permet de préciser la structure de ce site. L'étude des propriétés biologiques des anticorps et de leurs produits de dégradation enzymatique a bénéficié de la très grande sensibilité des méthodes radiochimiques, qui permettent également de suivre le sort de médicaments conjugués à des protéines plasmatiques.

Zusammenfassung

Es werden einige in der Immunologie verwendete radiochemische Methoden beschrieben.

Die Blut-«clearance» eines markierten Antigens gestattet, die Bildung zirkulierender Antikörper zu verfolgen und den Einfluß von Röntgenstrahlen oder Antimetaboliten auf die immunologische Reaktion abzuschätzen. Die Beifügung markierter Aminosäuren zu einem Kulturmilieu er-

laubt den Nachweis einer *in vitro*-Synthese der Antikörper zu erbringen. Die Natur des synthetisierten Immunglobulins ist durch Radioimmuno-elektrophorese leicht zu bestimmen.

Die Möglichkeit, den Haftbereich eines Antikörpers in spezifischer Weise mit einem Hapten zu schützen und eine doppelte radioaktive Markierung vor und nach Inkubation mit Hapten vorzunehmen, ist für die Ermittlung der Struktur des Haftbereichs von Bedeutung. Dem Studium der biologischen Eigenschaften der Antikörper und ihrer Abbauprodukte kommt die sehr hohe Empfindlichkeit der radio-chemischen Methoden zugute. Diese haben sich besonders bei der Verfolgung des Schicksals von Medikamenten bewährt, die an Antikörper oder andere Plasmaciweiße gebunden sind.

Riassunto

Nel lavoro vengono descritti alcuni metodi radio-chimici utilizzati nell'immunologia. La purificazione dal sangue di un antigene marcato permette di seguire la formazione degli anticorpi circolanti come pure di apprezzare l'influenza dei raggi X o degli antimetaboliti rispetto alla risposta immunologica. L'aggiunta di aminoacidi marcati ad una cultura, favorizza la messa in evidenza della sintesi *in vitro* degli anticorpi. Il tipo di immunglobulina sintetizzata si può determinare facilmente mediante la radio-immunoelettroforesi. Mediante protezione specifica del luogo d'associazione di un anticorpo, in combinazione con marcamento radioattivo doppio, si può precisare la struttura di questo.

Lo studio delle proprietà biologiche degli anticorpi e dei loro prodotti di degradazione enzimatica ha beneficiato della grande sensibilità dei metodi radiochimici, i quali permettono ugualmente di seguire la via presa dai medicinali legati alle proteine del siero.

Summary

Some radiochemical methods used in immunology are described. The blood clearance of a labelled antigen makes it possible to study the formation of circulating antibodies and to judge the influence of X-rays or of antimetabolites on the immunological response. The addition of labelled amino acids to a culture medium renders possible the demonstration of an *in vitro* synthesis of antibodies. The type of immunoglobulin synthesized may be easily determined by radio-immunoelectrophoresis.

The method of specifically protecting the combining site of an antibody, with a double radio-active labelling, makes it possible to describe more precisely the structure of the combining site. The study of the bio-

logical properties of antibodies and their products of enzymatic degradation has taken profit of the great sensitivity of radiochemical methods. In our experience, tracer methods have been of invaluable help to follow the fate of drugs bound to antibodies and other plasma proteins.

1. Dixon F. J. et Talmage D. W.: Catabolism of ^{131}I labelled bovine gamma globulin in immune and non-immune rabbits. Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 78, 123 (1951).
2. Amiel J. L., Mathé G., Matsukura M., Méry A. M., Daguet G., Tenenbaum R., Garattini S., Brézin C. et Palma V.: Tests for the determination of the effect of antimetabolic products on immune reactions. Immunology 7, 511 (1964).
3. Gros P., Coursaget J. et Machebauf M.: Recherches sur l'existence de précurseurs protéiques dans la formation des anticorps. Travail effectué avec de la valine marquée par le carbone 14. Bull. Soc. Chim. biol. 34, 1070 (1952).
4. Hochwald G. M., Thorbecke G. J. et Asofsky R.: Sites of formation of immune globulins and of a component of C_3 . I. A new technique for the demonstration of the synthesis of individual serum proteins by tissues *in vitro*. J. exp. Med. 114, 459 (1961).
5. Bach F. et Hirschhorn K.: γ -globulin production by human lymphocytes *in vitro*. Exp. Cell Res. 32, 592 (1963).
6. van Furth R., Schuit H. R. E. et Hijmans W.: Immunoglobulin synthesis *in vitro* by peripheral blood lymphocytes. Abstr. Xth Congr. int. Soc. Haemat., Stockholm 1964.
7. Nomenclature for human immunoglobulins. Bull. Wld. Hlth. Org. 30, 447 (1964).
8. Yagi Y., Maier P., Pressman D., Arbesman C. E. et Reisman R. E.: The presence of the ragweed-binding antibodies in the $\beta_2\text{A}$, $\beta_2\text{M}$ and γ -globulins of the sensitive individuals. J. Immunol. 91, 83 (1963).
9. Micheli A. et Goodman H. C.: Communication personnelle.
10. Pressman D. et Sternberger L. A.: The nature of the combining site of antibodies: the specific protection of the combining site during iodination. J. Immunol. 66, 609 (1951).
11. Pressman D. et Roholt O.: Isolation of peptides from an antibody site. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 47, 1606 (1961).
12. Grossberg A. L., Varandani P. T. et Pressman D.: Differences in the amino acid composition of the active site of anti-p-azobenzene-arsenate antibodies as revealed by a paired-label technique. Abstr. VIth int. Congr. Biochem., New York 1964, Section II, 154.
13. Jaton J. C. et Isliker H.: Etude de la fixation de fragments d'anticorps sur différents tissus. Helv. physiol. pharmacol. Acta 20, C 62 (1962) - Jaton J. C.: résultat non publié.
14. Jacot-Guillarmod H. et Isliker H.: Scission réversible des isoagglutinines 19S. Etude de fixation des subunités. Vox Sang. (Basel) 9, 31 (1964).
15. Isliker H., Cerottini J. C., Jaton J. C. et Magnenat G.: Fixation of specific and non-specific plasma proteins in tumors. Int. Sympos. Tumor Chemother., Lugano 1964 (éd.: P. A. Plattner). Elsevier Publishing Company, Amsterdam 1964.
16. Edelman G. M. et Gally J. A.: A model for the 7S antibody molecule. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 51, 846 (1964).
17. Dixon F. J., Talmage D. W. et Maurer P. H.: Radiosensitive and radioresistant phases in the antibody response. J. Immunol. 68, 693 (1952).
18. Nisonoff A.: Separation of univalent fragments of rabbit antibody by reduction of a single labile disulfide bond. Nature (Lond.) 189, 293 (1961).
19. Porter R. R.: The hydrolysis of rabbit γ -globulin and antibodies with crystalline papain. Biochem. J. 73, 119 (1959).