

50376  
1972  
54

50376  
1972  
54

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

# THESE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour obtenir

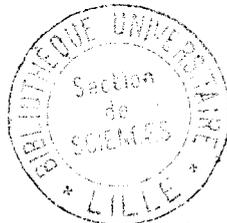
le titre de Docteur de Troisième Cycle

spécialité Biologie Animale

(Microbiologie)

par

Gilbert LAMBERT



ETUDE IMMUNOLOGIQUE DE LA L-ASPARAGINASE,

ANTIGENE ET IMMUNOSUPRESSEUR

Membres du Jury : MM. J. GUILLAUME, Président  
Y. DELMAS-MARSALET, Rapporteur  
A. BART, Examineur  
A. CAPRON, Invité

Soutenue le 27 AVR. 1972

Ce travail a été réalisé dans les laboratoires  
d'immunologie (Professeur Y. DELMAS MARSALET)  
du Centre Régional de Transfusion Sanguine\*  
(Directeur M. GOUEMAND) et de chimie bactérienne  
(Professeur J. GUILLAUME) de l'Institut Pasteur\*\* (Directeur R. BUTTIAUX).

\* 21, rue Camille Guérin 59-LILLE

\*\* 20, boulevard Louis XIV 59-LILLE

Ce travail a été réalisé sous la direction scientifique de Monsieur le Professeur Y. DELMAS MARSALET, que je tiens à remercier tout particulièrement, et avec les conseils constants de Monsieur le Professeur J. GUILLAUME à qui j'exprime toute ma gratitude pour l'intérêt qu'il a toujours porté à mon travail.

Je remercie également Messieurs les Professeurs A. BART et A. CAPRON d'avoir bien voulu accepter de faire partie de mon jury.

Que Monsieur le Professeur M. GOUEMAND veuille trouver dans ce travail l'expression de ma reconnaissance pour la bienveillance avec laquelle il m'a accueilli dans ses laboratoires.

Je tiens à exprimer aussi toute ma reconnaissance à mon collègue et ami J.P. HORNEZ pour sa collaboration efficace.

Enfin, que tous ceux qui par leur aide précieuse ont contribué à la réalisation de ce mémoire soient assurés de mes sincères remerciements.



2) <u>Mode d'action de l'asparaginase sur différents types de cellules animales.....</u>	17
B) <u>Doses léthales et durée de vie de l'asparaginase.....</u>	20
1) <u>Doses léthales.....</u>	20
2) <u>Devenir de l'asparaginase in vivo.....</u>	21
a) <u>Durée de demi-vie chez l'animal.....</u>	21
b) <u>Durée de demi-vie chez l'homme.....</u>	22
c) <u>Durée de vie.....</u>	23
d) <u>Accumulation dans le plasma.....</u>	24
e) <u>Passage de l'asparaginase du sang dans la lymphe.....</u>	24
f) <u>Elimination.....</u>	25
C) <u>Antigénicité de l'asparaginase.....</u>	25
1) <u>Conséquences de l'immunisation sur l'efficacité du traitement...</u>	25
2) <u>Prévention de l'immunisation.....</u>	26
3) <u>Dépistage de l'immunisation.....</u>	27
D) <u>Effet immunosuppresseur de l'asparaginase.....</u>	28
1) <u>Définition.....</u>	28
2) <u>Immunosuppression in vitro parla L-asparaginase.....</u>	28
3) <u>Effet de l'asparaginase sur l'immunité humorale.....</u>	30
4) <u>Effet de l'asparaginase sur l'immunité cellulaire.....</u>	32
 <u>CONCLUSION</u>	
1) <u>Troubles métaboliques.....</u>	34
a) <u>Troubles de la coagulation.....</u>	34
b) <u>Troubles hépatiques.....</u>	36
c) <u>Autres troubles.....</u>	37
2) <u>Inconvénients immunologiques.....</u>	37

TRAVAUX PERSONNELS

---:---:---:---:---:---:---:---:---:---

<u>CHAPITRE I</u> : Mise au point d'une technique automatique de dosage de la L-asparaginase par titrage de l'ion ammonium sur auto-analyseur.....	40
<u>INTRODUCTION</u> .....	41
<u>I - MATERIEL ET METHODES</u> .....	43
A) <u>Principe de la réaction</u> .....	43
B) <u>Rôle du nitroprussiate de sodium</u> .....	43
C) <u>Réactifs</u> .....	45
D) <u>Schémas de montage</u> .....	46
1) <u>Technique semi-automatique</u> .....	46
a) Schéma de montage.....	46
b) Réaction enzymatique manuelle.....	48
2) <u>Technique automatique</u> .....	49
a) Schéma de montage.....	49
b) Gamme étalon.....	51
c) Sérums à étudier.....	51
<u>II - RESULTATS</u> .....	52
A) <u>Technique semi-automatique</u> .....	52
1) <u>Résultats acquis sur une gamme étalon de sulfate d'ammonium en tampon véronal</u> .....	52
2) <u>Résultats obtenus après réaction enzymatique manuelle</u> .....	52
a) Gamme étalon d'asparaginase.....	52
b) Sérums humains.....	55
B) <u>Technique automatique</u> .....	58
1) <u>Automatisation de la technique</u> .....	58
2) <u>Tests effectués</u> .....	58
a) Gamme étalon.....	59
b) Test de reproductibilité.....	59
c) Sérums humains.....	62

d) Fiabilité de la technique.....	64
- Stabilité des solutions d'asparaginase en milieu physiologique.....	64
- Stabilité des solutions d'asparaginase en milieu sérique.....	66
c) <u>Conclusion</u> .....	68
<u>CHAPITRE II</u> : Etude expérimentale de l'immunisation par la L-asparaginase : conséquences et applications.....	69
<u>INTRODUCTION</u> .....	70
I - <u>MATERIEL ET METHODES</u> .....	71
A) <u>Malades étudiés et animaux d'expérience</u> .....	71
1) <u>Malades étudiés</u> .....	71
2) <u>Animaux d'expérience</u> .....	71
B) <u>Techniques de recherche des anticorps anti-asparaginase</u> .....	72
1) <u>Immunodiffusion</u> .....	72
a) Réactifs.....	72
b) Technique.....	73
2) <u>Réactions de fixation du complément</u> .....	74
a) Réactifs.....	75
b) Technique.....	76
3) <u>Hémagglutination passive au chlorure de chrome</u> .....	78
a) Réactifs.....	78
b) Technique.....	79
- Préparation des différentes suspensions globulaires.....	79
- Réaction.....	80
4) <u>Agglutination de particules de latex sensibilisées</u> .....	81
a) Réactifs.....	81
b) Sensibilisation des particules de latex par l'asparaginase.....	81
c) Réaction.....	82

C) <u>Techniques diverses de surveillance hématologique des animaux d'expérience</u> .....	82
1) <u>Numération des globules blancs, des globules rouges, de l'hémoglobine et de l'hématocrite</u> .....	82
2) <u>Formules sanguines</u> .....	82
3) <u>Dosage du fibrinogène</u> .....	83
II - <u>RESULTATS</u> .....	83
A) <u>Mise en évidence et cinétique d'apparition des anticorps anti-asparaginase</u> .....	83
1) <u>Expériences préliminaires chez le lapin</u> .....	83
a) Première série.....	83
b) Deuxième série.....	84
c) Troisième série.....	87
2) <u>Influence d'un traitement au long cours par différentes doses d'asparaginase chez le lapin</u> .....	90
a) Recherche des anticorps anti-asparaginase par différentes techniques.....	92
- Recherche des anticorps anti-asparaginase par immunodiffusion en gélose.....	92
- Recherche des anticorps anti-asparaginase par hémagglutination passive au $\text{CrCl}_3$ .....	95
- Recherche des anticorps anti-asparaginase par agglutination de particules de latex sensibilisées par l'asparaginase.....	97
b) <u>Surveillance biologique des lapins traités par l'asparaginase</u> .....	101
- Comportement, état général et poids des animaux.....	102
- Retentissement hématopoïétique.....	102
- Modifications de la synthèse des protéines.....	102

3) <u>Recherche des anticorps anti-asparaginase chez les malades leucémiques traités par l'asparaginase et étude des conditions d'apparition de ceux-ci.....</u>	108
a) Recherche des anticorps par différentes techniques.....	108
- Immunodiffusion en gélose.....	108
- Réaction de fixation du complément.....	112
- Réaction d'hémagglutination passive au $\text{CrCl}_3$ .....	113
- Réaction d'agglutination passive de particules de latex sensibilisées par l'asparaginase.....	114
b) Commentaires concernant les résultats de la recherche des anticorps anti-asparaginase chez l'homme.....	115
c) Etude des conditions d'apparition des anticorps.....	116
- Fréquence d'apparition des anticorps suivant les modalités du traitement.....	116
- Fréquence d'apparition des anticorps suivant le type cytologique de la leucémie aiguë.....	116
4) <u>Etude préliminaire des caractères quantitatifs et qualitatifs des anticorps mis en évidence.....</u>	119
a) Immunoélectrophorèse en gélose.....	119
b) Etude des anticorps par une méthode de précipitation en milieu liquide.....	121
5) <u>Spécificité de la réaction asparaginase anticorps anti-asparaginase.....</u>	123
a) Les anticorps anti-asparaginase sont dirigés contre l'asparaginase.....	123
b) Les anticorps anti-asparaginase sont essentiellement dirigés contre l'apoenzyme de la molécule enzymatique.....	125
c) Les anticorps fabriqués par le lapin et l'homme sont dirigés contre le même déterminant antigénique.....	128
d) Les anticorps obtenus en réponse à une immunisation par une asparaginase d' <i>Escherichia coli</i> sont également actifs sur une autre asparaginase d'origine différente.....	128

B) <u>Corrélations entre la mesure de l'asparaginasémie et l'apparition</u>	
<u>des anticorps anti-asparaginase.....</u>	132
1) <u>Résultats expérimentaux.....</u>	132
a) Etude de la vitesse d'élimination de l'asparaginase d'Escherichia coli injectée par voie intraveineuse chez le lapin : durée de vie.....	132
b) Conséquence de l'immunisation sur le taux d'activité enzymatique sérique.....	134
c) Etude cinétique de l'évolution de l'asparaginasémie tout au long d'une immunisation.....	137
2) <u>Application au dépistage précoce de l'immunisation chez l'homme : résultats préliminaires.....</u>	146
a) Etude de la durée de vie de l'asparaginase d'Escherichia coli injectée par voie intraveineuse chez l'homme.....	147
b) Etude cinétique de l'asparaginasémie au cours du traitement chez l'homme.....	148
 <u>DISCUSSION.....</u>	 155
 <u>CONCLUSION GENERALE.....</u>	 160
 <u>BIBLIOGRAPHIE.....</u>	 161



C'est l'objectif à long terme que nous nous sommes fixés. Dans ce travail, nous l'avons abordé dans un premier temps par l'étude du pouvoir immunogène de la L-asparaginase.

Dans le premier chapitre, nous rapporterons une technique de mesure de l'asparaginasémie que nous avons mise au point afin de suivre le devenir de l'asparaginase chez les animaux d'expérience.

Dans le deuxième chapitre, nous exposerons l'ensemble de nos résultats expérimentaux. Nous détaillerons d'abord la mise au point des techniques que nous avons adaptées à la recherche des anticorps anti-asparaginase. Nous donnerons les résultats des expériences préliminaires qui nous ont guidé dans le choix de l'établissement définitif des protocoles d'immunisation et des paramètres étudiés.

Nous verrons alors les données que ces expériences permettent de dégager en ce qui concerne les conditions quantitatives de l'immunisation, la spécificité des anticorps ainsi obtenus et les corrélations avec la mesure cinétique de l'asparaginasémie.

Nous verrons enfin comment ces résultats expérimentaux nous ont permis d'envisager leur application à l'étude de l'immunisation chez l'homme et d'aborder surtout l'étude expérimentale des corrélations avec l'activité immunosuppressive.



Découverte de l'intérêt de l'asparaginase : mise en évidence de l'effet anti-lymphome de l'asparaginase chez l'animal.

La découverte de l'effet anti-lymphome de l'asparaginase chez l'animal remonte à 1953 ; déjà à cette date, KIDD (95, 96) remarque que la croissance de certaines leucémies murines transplantées est inhibée par injection intrapéritonéale de sérum de cobaye. Les travaux de BROOME (28, 30) établissent que le facteur actif du sérum de cobaye est l'asparaginase. Dans un premier temps, il montre que les propriétés chimiques du facteur qui inhibe les leucémies ne diffèrent pas de celles de la L-asparaginase de cobaye et qu'au cours du fractionnement, l'activité inhibitrice est toujours associée à celle de l'enzyme. Dans un second temps, il montre que la leucémie 6 C 3 H E D utilisée pour l'étude expérimentale exige de la L-asparagine pour se développer d'une façon optimale en culture, et que les cellules cultivées continuent à conserver en présence de L-asparagine leur sensibilité au sérum de cobaye ; d'autre part, que les souches de 6 C 3 H E D qui sont devenues non exigeantes en asparagine à la suite de cultures in vitro dans un milieu dépourvu d'asparagine, ne sont plus inhibées in vivo par le sérum de cobaye. Enfin, que les souches de 6 C 3 H E D qui ont été rendues résistantes au sérum de cobaye par injections in vivo de doses très faibles ne sont plus exigeantes en asparagine si on les cultive immédiatement in vitro.

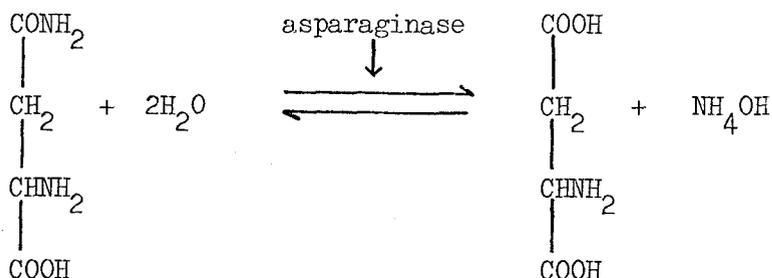
Par la suite, d'autres études ont confirmé que le facteur inhibiteur des leucémies murines contenu dans le sérum de cobaye était l'asparaginase. En effet, les sérums d'animaux proches apparentés au cobaye possèdent à la fois de l'asparaginase et une activité anti-leucémique (80, 134) ; par contre, aucun sérum dépourvu d'asparaginase n'a d'effet sur les leucémies (73, 80, 95, 134).

Enfin, MASHBURN (113) confirme les travaux précédents en montrant que la croissance de la leucémie 6 C 3 H E D de la souris est inhibée par de la L-asparaginase extraite d'Escherichia coli.

## I - PROPRIETES PHYSICOCHEMQUES DES ASPARAGINASES

### A) Définition

La L-asparaginase ou L-asparagine amidohydrolase 3. 5. 1. 1. de la nomenclature internationale, est l'enzyme qui transforme la L-asparagine en acide L-aspartique, selon la réaction suivante :



### B) Répartitions des asparaginases

#### 1) Chez les espèces vivantes

Les asparaginases sont des enzymes largement répandues dans la nature (185) ; on les rencontre dans les trois règnes.

D'après ZITTLE (187) et VARNER (177), l'asparaginase a été mise en évidence dans le règne végétal, en particulier chez les champignons des genres Penicillium et Aspergillus, chez les levures des genres Torula et Saccharomyces, et également chez les végétaux supérieurs en particulier dans les radicules d'orge. Plus récemment de l'asparaginase a été mise en évidence chez les légumineuses (102). Chez les bactéries, l'asparaginase se rencontre dans de nombreux

ses familles, genres et espèces, en particulier chez Escherichia coli (21, 153, 155, 181), Aerobacter aerogenes (179), Erwinia carotovora (125, 178), Erwinia aroideae (142), Brucella abortus (1), Serratia marcescens (22, 23, 94, 156), différentes espèces de Pseudomonas (6) et de Salmonella (67, 89), on rencontre aussi chez Bacillus coagulans et Bacillus stearothermophilus (186), Mycobacterium phlei, M. avium, M. smegmatis (82, 98, 136) et diverses souches de M. tuberculosis (88, 150).

De plus, étant donné le nombre de micro-organismes, et plus spécialement de bactéries susceptibles d'utiliser l'asparagine, il est probable que de nombreuses autres espèces microbiennes sont capables de synthétiser cette enzyme.

En ce qui concerne les animaux, l'activité asparaginasique paraît également fréquente, puisqu'on en a mis en évidence chez les poissons, les oiseaux (46, 131) et chez les mammifères (35).

## 2) Dans l'organisme animal

A l'intérieur de l'organisme animal, l'asparaginase semble très inégalement répartie ; dans les tissus, on en trouve surtout dans le foie, le cerveau, et à un moindre degré dans le rein, la rate et les testicules (15).

L'activité d'asparaginase sérique est très variable selon les espèces, mais elle est généralement faible ou nulle, sauf pour le cobaye (46) et quelques autres rongeurs apparentés (133).

Il faut noter que toutes les asparaginases n'ont pas un effet actif sur les tumeurs expérimentales : c'est le cas par exemple de l'asparaginase de

Bacillus coagulans (113) et de la levure Saccharomyces cerevisiae (31).

### C) Chimie des asparaginases

Nous avons vu précédemment que l'activité anti-lymphome de l'asparaginase avait été mise en évidence dans le sérum de cobaye. Ce sont YELLIN et WRISTON (185), qui les premiers en 1966, ont obtenus une préparation purifiée d'asparaginase extraite de sérum de cobaye ; cette préparation leur a permis d'en étudier les propriétés physicochimiques. L'asparaginase d'Escherichia coli fut obtenue purifiée en 1968 par WHELAN et WRISTON (181) et la même année par ROBERTS et coll. (153). Par la suite devant l'intérêt que prenait l'utilisation de l'asparaginase chez l'homme et compte tenu des quantités importantes d'enzyme nécessaire pour les essais cliniques, de nombreuses industries pharmaceutiques ont développé des procédés de purification simplifiés à partir de cultures en masse d'Escherichia coli (4, 76 ). Des asparaginases d'autres origines ont aussi été purifiées et leurs propriétés physicochimiques étudiées (101,125,156,159,178 ) ; les propriétés physicochimiques principales d'un certain nombre d'asparaginase parmi les mieux étudiées sont rassemblées dans le tableau 1

En ce qui concerne le nombre de sous unités, les auteurs ont pensé au début que la molécule était constituée de 6 sous unités (181) ; il est maintenant bien établi que la molécule est formée de 4 sous unités de poids moléculaire 30 à 35 000 chacune (58,85. ). Récemment, GLOSSMAN et coll. (63) ont décrit l'existence d'un pont disulfure intramoléculaire.

Propriétés	Sérum de cobaye (186)	E. coli B (Squibb) (181)	E. coli B (Lilly) (76)	E. coli ATCC9637 et 11303 (Bayer) (4)	Serratia Marcescens(156)	Erwinia carotovora(178,125)	Bacillus coagulans (101)	Fusarium tricinctum(159)
Poids moléculaire	138 000 <sup>a</sup> 133 000 <sup>b</sup>	139 000 <sup>a</sup> 106 000 <sup>b</sup>	130 000 <sup>a</sup>	127 000 <sup>a</sup> 120 000 <sup>b</sup>	150 000 <sup>c</sup>	128 000 14 500	85 000 <sup>c</sup>	171 000 <sup>c</sup>
Point isoélectrique	3,6à4,5	4,85à4,97	5,5	Bayer A : 5 Bayer B : 4,8	5,1à5,85	8,9		5,18
pH optimum	7,5à8,5	8		7,2	6,9		8,5à9,5	7,5à8,7
Hydrolyse de la glutamine	0	4 %	1 %	3-4 %	4 %	15 %	0	0
Activité antitumorale	+	+	+	+	+	+	-	-

Tableau I : Propriétés physicochimiques de différentes asparaginases selon WRISTON J.C. (184).



a : ultracentrifugation analytique

b : gel filtration

c : gradient de sucrose

D) Mise en évidence de deux activités différentes dans l'asparaginase d'*Escherichia coli*

CAMPBELL et coll. (38) ont montré qu'il existait 2 sortes d'asparaginases différentes, qu'ils ont appelées E C-1 et E C-2 dans la souche d'*Escherichia coli B* ; ces deux asparaginases peuvent être séparées par chromatographie sur D E A E cellulose. Seule l'asparaginase E C-2, relativement stable à la chaleur, a un effet antilymphome. L'asparaginase E C-1 a une activité qui diminue beaucoup en dessous de pH 8.4, alors que l'asparaginase E C-2 a une activité s'exerçant dans une gamme de pH plus étendue avec un maximum à pH 8. Seule cette dernière a été purifiée et étudiée en détail.

Chez la souche d'*Escherichia coli K 12*, on trouve aussi deux asparaginases qui ont été dénommées par SCHWARTZ et coll. (165) asparaginases 1 et 2. L'asparaginase 2 qui possède un effet antilymphome présente une affinité beaucoup plus grande pour l'asparagine que l'asparaginase 1 ; ceci est également vrai pour l'asparaginase E C-2, ce qui permet de penser que l'asparaginase 2 d'*Escherichia coli K 12* correspond à l'asparaginase EC -2 d'*Escherichia coli B*.

Enfin, ARENS et coll. (4) ont mis en évidence eux aussi deux asparaginases chez les souches ATCC 9637 et 11 303 d'*Escherichia coli*. Toutes les deux présentent une activité spécifique identique, le même pH d'activité avec un maximum à 7.2, la même composition apparente en acides aminés, le même poids moléculaire et les mêmes 14 acides aminés N terminaux. Toutefois, ces deux asparaginases possèdent une demi-vie et une mobilité électrophorétique différentes ; les auteurs concluent que les deux préparations enzymatiques contiennent des isoenzymes ayant des points isoélectriques différents, bien qu'une activi-

té enzymatique identique ; l'asparaginase B renfermant proportionnellement plus d'isoenzymes acides que l'asparaginase A.

Bien que ~~non établie~~ la structure des asparaginases soit encore imparfaitement connue, il est vraisemblable que les autres asparaginases d'Escherichia coli sont construites sur le même modèle que celles jusqu'à présent étudiées.

#### E) Préparations pharmaceutiques de l'asparaginase d'Escherichia coli

La connaissance de la pharmacologie de l'asparaginase présente un intérêt important car la thérapeutique par les enzymes est un nouveau moyen de la médecine moderne.

##### 1) Définition de l'unité enzymatique

L'unité enzymatique (UE) est la quantité d'enzyme qui, dans les conditions du dosage, libère, à partir de la L-asparagine, en une minute, une micro mole d'ammoniaque à 37°C.

##### 2) Pureté des préparations

Les différentes préparations d'asparaginase possèdent toutes une faible activité glutaminasique et D-asparaginasique intimement liées à l'activité L-asparaginasique ; de plus, l'asparaginase actuellement utilisée en thérapeutique étant extraite d'Escherichia coli, elle renfermerait aussi en quantité variable des endotoxines bactériennes.

Nous verrons que les différentes impuretés peuvent jouer un rôle important dans l'explication du mode d'action et de la toxicité de l'enzyme.

### 3) Stabilité à la conservation

Il semble que la stabilité de l'asparaginase à la conservation soit très variable selon son origine ; ainsi BROWN et coll. (35) constatent une perte de la moitié de l'activité enzymatique d'asparaginases extraites du foie de différents mammifères, après 4 jours à + 4°C, alors que HO et coll. (77) disent que l'asparaginase d'Escherichia coli est stable dans du plasma à + 4°C pendant 10 jours et à - 10°C pendant plus de quatre mois. Les congélations et décongélations successives n'ayant pas d'effet sur l'activité de l'enzyme.

### 4) Voies d'injections

L'asparaginase est généralement injectée par voie intra-veineuse, soit directement ou au moyen d'une perfusion à des doses qui varient beaucoup chez l'homme suivant les auteurs et qui sont comprises entre 10 et 5000 UE/kg.

La voie intrapéritonéale qui a été utilisée par KIDD pour la mise en évidence de l'effet antilymphome de l'asparaginase est parfois utilisée chez l'animal. Des travaux récents de CHANG (44) mettent en évidence une augmentation accrue de l'asparaginase après injection intrapéritonéale de microcapsules semi-perméables.

Il semble que la voie intramusculaire qui est peu utilisée soit très immunogène ; en effet, KHAN et HILL (91) sur une série de 13 malades ont mis en évidence des anticorps précipitants chez le seul malade ayant été traité par cette voie. De plus, PUTTER (147) fait remarquer que l'injection intramusculaire se traduit pour des doses identiques par un niveau faible d'asparaginase circulante comparativement aux deux voies précédentes.

La voie intrathécale peut être employée (174) lors de localisations méningées de leucémies aiguës, mais les avantages que pourrait présenter cette voie d'introduction sont discutables, car d'une part l'asparaginase repasse très rapidement dans la circulation générale (163) ; d'autre part il semble, comme nous l'avons déjà dit précédemment, que l'asparaginase injectée par voie intraveineuse bien que ne passant pas ou très peu dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) (77) entraîne dans le LCR une chute du taux d'asparagine qui est en équilibre avec celui du sérum.

## II - PROPRIETES PHARMACOLOGIQUES ET UTILISATION CHEZ L'HOMME

Après la découverte de l'effet antilymphome chez la souris de l'asparaginase de cobaye puis d'Escherichia coli, des études expérimentales ont été entreprises par de nombreux auteurs pour tester l'effet de l'asparaginase sur différents types de tumeurs de la souris (24,25,28,113,172 ), du rat (87, 95 ), du chien, du chat et même de la vache (70,133,135) ce qui a permis de mettre en évidence que les néoplasmes animaux les plus sensibles étaient d'origine lymphoïde ou hémato-poïétique.

Les premières utilisations de la L-asparaginase chez l'homme date de 1965 et sont dues à DE BARROST et coll. (51) et à DOLOWY et coll. (54) qui dans une leucémie aiguë lymphoblastique (LAL) chez un enfant, après injection d'asparaginase, ont observé une diminution du nombre des cellules leucémiques dans le sang circulant.

Les premières rémissions de LAL chez l'homme par traitement avec la L-asparaginase sont rapportées en 1967 par HILL et OETTINGEN (75,126).

Un certain optimisme d'ailleurs compréhensible a succédé à ces premiers succès ; l'asparaginase qui mettait à profit la première différence métabolique connue entre les cellules tumorales et les cellules normales a été utilisée dans de nombreuses maladies relevant d'un processus malin.

Les travaux rapportant les résultats des essais thérapeutiques effectués chez l'homme sont innombrables ; nous ne les citerons évidemment pas tous, mais nous allons surtout à partir des articles les plus récents dégager un certain nombre d'idées générales, concernant le cadre de son utilisation chez l'homme.

Il est admis actuellement par tous les auteurs que, quelques soient les doses injectées, la fréquence des injections, la durée du traitement, le traitement associé éventuellement, l'asparaginase n'a pas ou très peu d'effets dans le traitement des tumeurs solides (86,114,173 ) ; il est admis aussi que si des résultats positifs sont parfois obtenus dans le traitement des lymphosarcomes et des leucémies aiguës myéloblastiques, l'intérêt thérapeutique de l'asparaginase se limite essentiellement aujourd'hui aux LAL (10,16,64,114,176).

Les modalités du traitement dans les leucémies aiguës varient sensiblement suivant les auteurs car l'antigénicité et le pouvoir immunosuppresseur de l'asparaginase posent un certain nombre de problèmes qui ont constitué le point de départ de notre travail ; quoiqu'il en soit, nous pouvons dire que les doses généralement utilisées varient entre 200 et 1000 U/kg/j en injection intraveineuse et que la durée du traitement, elle aussi variable en fonction des résultats obtenus, se situe aux environs de quinze jours.

L'asparaginase est parfois utilisée par voie intrathécale (174) lors de localisations méningées de leucémies aiguës.

L'asparaginase seule est capable d'induire des rémissions complètes mais les cliniciens l'utilisent souvent pour renforcer son efficacité en association avec la vincristine, la rubidomycine, la prednisone par exemple.

Compte tenu des différentes modalités de son utilisation, il est très difficile d'évaluer pour l'instant le pourcentage de rémissions induites par la seule asparaginase. Il est cependant indiscutable que des rémissions ont pu être obtenues dans des cas qui s'avéraient résistants aux autres thérapeutiques.

Certes l'asparaginase n'a pas tenue les promesses que son mode d'action original laissait supposer, mais son utilisation surtout dans le cadre des LAL est positif et elle constitue une thérapeutique supplémentaire qui présente un certain nombre d'avantages parmi lesquels nous pouvons citer :

- son action relativement rapide sur la prolifération des cellules leucémiques
- son action modérée sur l'hématopoïèse normale, certains auteurs constatant même une augmentation des cellules hématopoïétiques normales (170)
- son efficacité sur certaines leucémies aiguës résistantes à d'autres thérapeutiques.

A) Propriété enzymatique et activité anti-tumorale

1) Métabolisme de l'asparagine

a) Répartition de l'asparagine dans l'organisme  
.....

LONG (105), MEISTER (117) et MARDASHEV (109) ont étudié la teneur en asparagine des tissus et organes essentiellement chez l'animal.

Les résultats obtenus, variables selon les auteurs, montrent que certains organes paraissent nettement plus riches que d'autres en asparagine : ce sont le rein, le foie, la rate, le cerveau, organes qui sont également les plus riches en asparaginase.

D'après TOWER (175), le sang et le lait paraissent relativement peu riches et leur teneur serait de l'ordre de 10 mg/l. La teneur du LCR serait égale, ou légèrement supérieure à la teneur sanguine.

ANDREWS et coll. (2) ont constaté qu'il semblait y avoir une corrélation entre la teneur endocellulaire en asparagine, et la sensibilité des cellules à la L-asparaginase ; en particulier, les cellules 6 C 3 H E D très sensibles, contiennent 21 mg/l d'asparagine, ce qui paraît être une teneur très élevée, alors que les cellules P 815, insensibles à l'asparaginase, n'en contiennent que 1,2 mg/l.

On ne connaît que très incomplètement les besoins en asparagine des tissus et cellules normales ou tumorales.

b) Cycle métabolique de l'asparagine  
.....

Nous ne considérerons que le problème du métabolisme de l'asparagine dans le monde animal ; l'essentiel de celui-ci est résumé sur la figure 1.

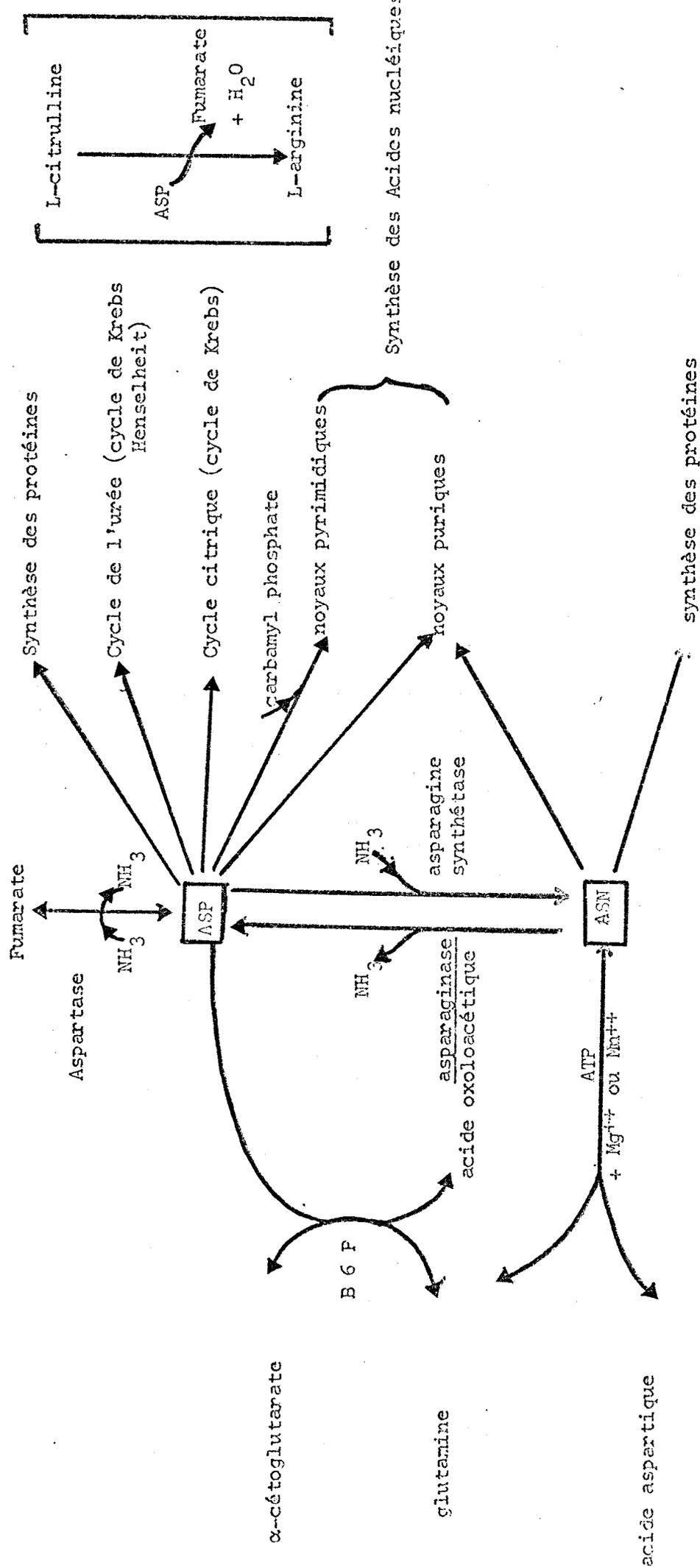


Figure 1

Importance du cycle métabolique de l'asparagine.



Il existe deux types possibles d'utilisation de l'asparagine :

- l'utilisation directe en tant que telle dans les synthèses protéiques
- les utilisations indirectes, pouvant emprunter plusieurs voies, mais dont la plus importante semble être celle de l'acide aspartique, puisqu'elle peut conduire soit au cycle citrique et au cycle de l'urée, soit à la synthèse des noyaux purique et pyrimidique, étapes essentielles dans la synthèse des acides nucléiques.

c) Preuves de l'existence de plusieurs voies métaboliques  
 .....

- L'intégration directe de l'asparagine dans les molécules protéiques, a été mise en évidence par divers auteurs, en particulier par HOROWITZ et coll. (84), et démontrée expérimentalement par BROOME et SCHWARTZ (32, 165) KIDD et SOBIN (97), en utilisant de l'asparagine marquée ; indirectement, MASHBURN et GORDON (110,111) ont apporté une preuve supplémentaire en montrant que le traitement par l'asparaginase diminuait l'incorporation d'asparagine marquée dans les protéines de la tumeur P 1798 chez la souris.

- En ce qui concerne les utilisations indirectes de l'asparagine, notons que l'acide aspartique qui peut résulter de l'action de l'asparaginase sur l'asparagine, peut être utilisé dans la synthèse des noyaux purique et pyrimidique. La confirmation du rôle de l'acide aspartique dans la synthèse des noyaux purique et pyrimidique a été apportée par MEISTER (117) après utilisation d'aspartate marquée. La synthèse du noyau purique pourrait également s'effectuer

directement à partir de l'asparagine, mais la voie empruntant l'acide aspartique semble être la voie la plus importante.

En résumé, il semble que les deux voies d'utilisation les plus importantes de l'asparagine soient : d'abord les synthèses protéiques, puis celle pouvant intéresser le métabolisme des acides nucléiques par l'intermédiaire de la synthèse des noyaux purique et pyrimidique.

d) Propriétés générales des systèmes enzymatiques pouvant synthétiser l'asparagine  
.....

Il existe plusieurs systèmes possibles pour la synthèse de l'asparagine :

- transformation directe de la cyanoalanine en asparagine (117).

Ce système n'a été signalé que chez les végétaux.

- synthèse d'asparagine par transamination à partir de l'acide  $\alpha$ -cetosuccinamique et d'un acide  $\alpha$ -aminé (118) pour donner de l'asparagine et un acide  $\alpha$ -cetonique. Ce système mis en évidence dans le foie de rat a une importance secondaire

- l'asparagine synthétase est certainement le système le plus important, aussi bien pour la synthèse de l'asparagine en général que pour le métabolisme des cellules tumorales en particulier (5,36,104,138,142,149).

Ce système existe sous deux variantes principales :

- . acide aspartique + glutamine + ATP en présence de  $Mg^{++}$   $\longrightarrow$  asparagine + acide glutamique + AMP + PP
- . acide aspartique + ammoniacque + ATP en présence de  $Mg^{++}$   $\longrightarrow$  asparagine +  $H_2O$  + AMP + PP

La synthèse d'asparagine utilise avec l'acide aspartique soit la glutamine, soit l'ammoniaque, comme donneur de groupements amidés, la glutamine étant cependant généralement plus efficace que l'ammoniaque. Ces réactions nécessitent un apport d'énergie généralement fournie par l'ATP ; elles demandent la présence d'ions métalliques, le plus efficace étant l'ion  $Mg^{++}$ . Les systèmes asparagine synthétase peuvent être soumis à un certain nombre de facteurs et de mécanismes de régulation que nous allons résumer :

- Facteurs de régulation

Ce sont essentiellement les éléments qui interviennent dans la réaction.

Pour que la synthèse soit effectuée, il faut qu'il existe un certain rapport entre les quantités disponibles d'acide aspartique, de glutamine ou d'ammoniaque, d'ions  $Mg^{++}$  et d'ATP ; ces différents facteurs pouvant jouer le rôle de facteurs limitants.

- Mécanismes de régulation

On peut distinguer divers systèmes d'inhibition et de répression.

Les contrôles par inhibition et répression ont été bien étudiés chez certains systèmes asparagine synthétase, en particulier par BURCHALL et coll. (36), chez Streptococcus bovis, et par RAVEL et coll. (149), chez Lactobacillus arabinosus ; dans ce dernier système, en dehors de l'inhibition simple provoquée par le produit de la réaction, c'est-à-dire l'asparagine, il y a répression de la synthèse de l'enzyme, par la même asparagine ; il se peut qu'il en soit de même dans les cellules tumorales.

D'après PRAGER et BACHYNSKY (142), tout au moins pour les cellules de lymphome de la souris, l'asparagine synthétase ne semble pas une enzyme inductible, puisqu'un apport exogène d'acide aspartique et d'ammoniaque n'a pas d'influence sur la synthèse de l'enzyme par ces cellules, mais EAGLE et coll. (57) pensent qu'elle peut l'être.

Si un certain nombre de propriétés des systèmes asparagine synthétase sont peu différentes (sources d'énergie, pH d'activité...), il semble par contre que leurs mécanismes de contrôle et de régulation soient plus spécifiques : ainsi, le système asparagine synthétase de Lactobacillus arabinosus est répressible par l'asparagine, alors que le système correspondant de Streptococcus bovis ne l'est pas.

Le rôle et l'importance exacte de ces mécanismes de régulation dans les cellules tumorales humaines ne pourront être évaluées que lorsqu'on aura déterminé les teneurs cellulaires en métabolites intervenant dans la réaction et lorsqu'on aura isolé les systèmes asparagine synthétase.

## 2) Mode d'action de l'asparaginase sur différents types de cellules animale

Quand une quantité suffisante d'asparaginase est introduite dans la circulation, le taux d'asparaginase circulante, s'abaisse pour atteindre un taux qui ne permet plus d'assurer les besoins nutritifs normaux des cellules en asparagine ; pour ce métabolite, les cellules se trouvent donc en état de carence.

Ce qui est essentiel, ce sont les réactions des différents types de cellules devant cette situation de privation en asparagine extracellulaire.

LABOUREUR (99) distingue quatre types de cellules :

- 1 - Cellules normales (Cn)
- 2 - Cellules tumorales sensibles à l'asparaginase (Cs)
- 3 - Cellules tumorales provenant de tumeurs initialement sensibles à l'asparaginase, mais rendues résistantes par adaptation (Cs-r) (Culture sur un milieu très pauvre en asparagine par exemple)
- 4 - Cellules spontanément résistantes à l'asparaginase (Cr).

Les réactions cellulaires, dans la synthèse de l'asparagine, déterminées par l'introduction d'asparaginase dans la circulation des différents types de cellules, ont été particulièrement étudiées par HOROWITZ et coll. (84) et par PRAGER et BACHYNSKY (142). Ces résultats montrent que des différences importantes, mais également des analogies, existent dans la réponse des différents types de cellules à l'action de l'asparaginase, ils mettent en évidence :

- que d'une façon générale, l'activation des asparagines synthétases intracellulaires paraît être la réaction constante des cellules à une carence en asparagine extracellulaire

- que l'augmentation ou l'apparition dans certains cas de l'activité asparagine synthétase est faible et fugace pour les Cs, et que d'une façon plus générale, il semble exister une corrélation entre les taux initiaux, et les taux finaux en asparagine synthétase sous l'action de l'asparaginase

- que l'augmentation de l'activité asparagine synthétase dans les Cn est moyenne, plus lente à se développer que dans les Cs, mais que cette activité y est beaucoup plus durable

- que l'augmentation de l'activité asparagine-synthétase dans les Cr est importante, se développe progressivement et de façon durable

- que l'activité asparagine-synthétase ne peut être augmentée indéfiniment, puisque, après avoir atteint un maximum en 24 heures, un apport supplémentaire d'asparaginase ne permet pas d'atteindre un niveau plus élevé d'activité asparagine-synthétase

- que les cellules Cs-r ont un comportement analogue à celui des Cr

- qu'il existe une corrélation entre la sensibilité des cellules tumorales au traitement par l'asparaginase, et leur capacité d'activation de leur système asparagine-synthétase.

L'étude du système asparagine-synthétase permet donc d'expliquer d'une façon satisfaisante le mode d'action de l'asparaginase, mais il est probable que d'autres facteurs puissent également intervenir.

RYAN et SORNSON (158) ont montré récemment que l'administration d'asparaginase chez la souris faisait chuter le taux de la glycine et ils pensent que la perte de la glycine cellulaire pourrait être plus importante que la perte d'asparagine, à cause de l'importance de la glycine dans la synthèse des purines.

Un autre facteur possible est la vitesse de disparition de l'enzyme de la circulation ; BROOME (31) fut le premier à mettre en évidence l'importance de la durée de demi-vie comme facteur ayant une importance antitumorale. Par exemple, l'asparaginase du sérum de cobaye a une demi-vie de 11 à 19 heures, tandis que l'asparaginase de levure qui n'a pas d'effet antilymphome est presque

complètement éliminée en 30 min. ; ceci ne peut évidemment pas tout expliquer ; de plus les raisons qui font que la clearance est plus ou moins rapide ne sont pas connues. MASHBURN et LANDIN (112) pensent que la durée de demi-vie serait fonction du point isoélectrique, mais des arguments existent aussi qui permettent de penser qu'elle est peut être fonction de la valeur de leur  $K_m$  (33, 42 ).

Divers travaux de biologie moléculaire ont été effectués pour essayer d'expliquer le mécanisme d'action de l'asparaginase et la régulation de l'asparagine au niveau cellulaire. Le problème n'étant pas résolu, nous n'envisagerons pas ce sujet.

## B) Doses léthales et durée de vie de l'asparaginase

### 1) Doses léthales

LORKE et TETTENVORN (106) ont effectué une étude expérimentale sur cinq animaux. Pour la souris et le rat, la dose léthale 50 (DL50), qui correspond à la dose à partir de laquelle la moitié des animaux meurent, n'a pas pu être déterminée ; les animaux survivants à des doses de 200 000 UE/kg et des doses plus élevées n'ayant pu être injectées à cause de la limite de solubilisation de l'asparaginase. La DL50 du chat et du chien se situe aux environs de 50 000 UE/kg. Le lapin est une exception : certains animaux meurent pour des doses de 500 ou de 1 000 UE/kg, alors que d'autres survivent, sans que l'on puisse l'expliquer, à des doses de 10 000 UE/kg. L'homme supporte assez bien les doses de 5 000 UE/kg. Ces doses qui ont été employées dans le traitement des tumeurs solides sont parfois préconisées en injections espacées pour éviter l'immunisation.

2) Devenir de l'asparaginase in vivo

Cette notion qui va rendre compte de la vitesse de disparition de l'enzyme du sang circulant est très importante, car elle conditionne les modalités du traitement.

Les différentes techniques utilisées pour mesurer l'activité asparaginasique correspondent soit comme la technique de COONEY et coll. (50) à une mesure de l'acide aspartique libérée après action de l'asparaginase sur l'asparagine, soit comme les réactions de NESSLER, de RUSSEL et de SCHWARTZ (147, 157) à une mesure de la quantité d'ammoniaque libérée.

a) Durée de demi-vie chez l'animal.  
.....

Les résultats obtenus par PUTTER et SCHWARTZ (147,163) chez l'animal sont rassemblés dans le tableau II ci-dessous.

	CHIEN		COBAYE	LAPIN	RAT	SOURIS
<u>SCHWARTZ</u> Asp. : Merck, Squibb Bayer Dose : 200 cu 1 000 UE/kg	18 h		4 h 30	NF*	1h 30	6 h
<u>PUTTER</u> Asp. : Bayer A. Dose : 500 UE/kg	gros 23 h	petit 14 h	NF*	4 h	1h 30	4 h

TABLEAU II : Comparaison des durées de

\* NF : non fait                   demi-vie de l'asparaginase mesurées par Pütter et Schwartz chez différents animaux.

Bien que SCHWARTZ ne précise pas l'origine exacte de l'asparaginase utilisée et les doses injectées, il apparaît nettement quelques soient les discordances entre les auteurs que la durée de demi-vie de l'asparaginase varie suivant les animaux auxquels on s'adresse. Il semble même que la clearance est d'autant plus rapide que l'animal est petit ; ainsi BAYER constate même que chez deux races de chiens de tailles différentes, la durée de demi-vie est supérieure chez le plus gros.

Seuls les résultats obtenus chez la souris ne semblent pas correspondre à cette hypothèse.

b) Durée de demi-vie chez l'homme  
 .....

Les résultats obtenus chez l'homme sont rassemblés dans le tableau III ci-dessous.

Auteurs	HASKELL	OHNUMA	PUTTER		SCHWARTZ			
Origine de l'asparaginase	Escherichia coli							
	EC <sub>2</sub>	Merck	BayerA	Bayer X	Lilly	Squibb	Bayer A	Merck
Durée de 1/2 vie	26 à 33 h	14 à 22 h	12 h	24 h	10 à 12 h	14 à 22 h	9 à 14 h	18 à 27 h
Dose	1500 U/kg	400, 1000 et 5000 U/kg	200 U/kg		1000 U/kg			
Technique de	Cooney	Russel	Nessler		Schwartz			

Tableau III

Comparaison des durées de demi-vie de l'asparaginase chez l'homme  
 selon différents auteurs.

Les résultats sont difficilement comparables, les auteurs mesurant l'activité par des techniques différentes ; de plus, les mesures sont effectuées après injection de doses variables d'asparaginase ne provenant pas toujours de la même industrie pharmaceutique . Notons toutefois que PUTTER constate une durée de demi-vie double avec l'asparaginase X par rapport à l'asparaginase A ; or l'asparaginase X est de l'asparaginase A partiellement désaminée. Ceci est la preuve que des variations minimes au niveau d'une faible partie de la molécule entraîne des variations très importantes de la demi-vie. Cette importance de l'origine et de la maison qui prépare l'asparaginase est confirmée par les travaux de SCHWARTZ qui a étudié quatre asparaginases d'Escherichia coli d'origine différente.

c) Durée de vie  
.....

L'asparaginase persiste selon HASKELL (72bis), dans le sérum des malades, après une seule injection de 1 500 UE/kg d'asparaginase MERCK à un taux de 0,01 UE/ml ou plus pendant 17 à 21 jours ; la L-asparagine plasmatique étant déprimée voire nulle pendant trois semaines chez trois des 4 malades étudiés.

Ces résultats coïncident avec ceux de OHNUMA (132) qui trouve qu'après une injection d'asparaginase MERCK de 1 000 UE/kg et de 5 000 UE/kg des traces d'enzyme sont mesurables respectivement jusqu'au 13<sup>o</sup> et 22<sup>o</sup> jours ; le niveau d'asparagine étant pour l'un et l'autre cas déprimé jusqu'aux 21<sup>o</sup> et 29<sup>o</sup> jours.

Par contre, SCHWARTZ bien qu'utilisant une technique sensible capable de mettre en évidence 0,03 UE/ml d'activité asparaginasique signale que

suivant les doses et les origines de l'enzyme aucune activité n'est décelable après 2 à 10 jours.

Après une seule injection d'asparaginase, l'asparagine sérique est déprimée pendant plusieurs semaines ce qui pose le problème de la fréquence des injections.

d) Accumulation dans le plasma  
.....

Si les injections sont répétées journellement, on observe selon les auteurs (77,163,132) une accumulation plasmatique de l'enzyme ; la durée de demi-vie ne changeant pas. SCHWARTZ (163) précise que l'accumulation a lieu jusqu'au 7<sup>o</sup> jour, mais qu'il apparait ensuite un plateau. Enfin PUTTER (147) constate une accumulation avec l'asparaginase X, mais pas avec l'asparaginase A de chez BAYER.

e) Passage de l'asparaginase du sang dans la lymphe  
.....

Le passage de l'asparaginase du sang dans la lymphe a été étudié par HALL (68) chez le mouton : après injection de 12 000 UE par voie intraveineuse il met en évidence des traces d'asparaginase 30 min. plus tard au niveau de la lymphe ; le taux maximum étant atteint après 2 à 3 heures et correspondant à environ 10 % de la teneur sanguine initiale.

f) Elimination  
.....

Le mécanisme de l'élimination n'est pas encore connu. L'asparaginase est éliminée sous forme dégradée, car on ne retrouve pratiquement aucune activité enzymatique dans les urines ( 77,163 ).

En conclusion :

- la durée de vie chez un même animal varie avec l'origine de l'asparaginase, le mode de préparation de l'enzyme et la dose injectée
- l'asparaginase déprime l'asparagine circulante ; elle s'accumule dans le plasma si des injections journalières sont effectuées
- on retrouve une partie de l'asparaginase d'Escherichia coli dans la lymphe après injection intraveineuse mais pas dans les urines.

c) Antigénicité de l'asparaginase

L'antigénicité a été mise en évidence chez l'animal ( 106,154,160,171 ).

Nous allons étudier les conséquences qu'entraîne cette immunisation sur l'efficacité du traitement, ainsi que les essais qui ont été effectués pour essayer d'éviter ou de prévoir l'apparition des anticorps qui peuvent entraîner des chocs anaphylactiques très graves chez l'homme.

1) Conséquences de l'immunisation sur l'efficacité du traitement

L'apparition d'anticorps anti-asparaginase aussi bien chez l'homme (53, 141 ) que chez l'animal (147,171 ) entraîne une diminution de l'efficacité de

l'enzyme. Cette diminution d'efficacité a été mise en évidence par SRIKRISHMA chez la souris ; en effet, la durée de survie de souris leucémiques (L 5178 Y) ayant reçu plusieurs traitements préalables d'asparaginase est moins augmentée que celle des souris dont c'est le premier traitement.

La recherche parallèle d'anticorps et de l'activité enzymatique sérique après l'injection d'asparaginase (53, 141) a permis de mettre en évidence une chute totale d'activité, suivie par l'apparition d'anticorps spécifiques décelables par réaction d'hémagglutination passive. Il est probable que les anticorps forment un complexe avec l'antigène, ce qui se traduit par une élimination accrue de l'enzyme.

In vitro, l'inactivation d'un immun sérum par l'asparaginase ne dépasse jamais 50 % même dans les proportions optimales, ce qui prouverait que les anticorps ne se fixent pas sur le site enzymatique, mais qu'il en limite l'accès (91, 141). En effet, après ultra centrifugation, toute l'activité est retrouvée dans le précipité (141).

## 2) Prévention de l'immunisation

D'une part, KHAN et HILL (92) constatent chez le lapin, que l'immunisation survient après des injections journalières inférieures ou égales à 200 UE/kg, mais pas pour des injections de 500 et 1 000 UE/kg. Ces résultats seraient en faveur de l'effet immunosuppresseur de l'asparaginase.

D'autre part, l'emploi simultané d'immunosuppresseur comme l'actinomycine C (20) et la cyclophosphamide (17) empêche selon BIERLING et SRIKRISHNA

la formation d'anticorps chez la souris. PRATT et coll. (146) pensent que les injections journalières favorisent l'immunisation et préconisent le traitement par des injections plus importantes, espacées, mais PUTTER (147) recommande vivement le contraire.

### 3) Dépistage de l'immunisation

L'intradermoréaction ne permet pas de dépister spécifiquement l'immunisation (16, 141). PETERSON et coll. (141) ont montré qu'il existait une corrélation exacte entre l'apparition des chocs anaphylactiques et la mise en évidence d'anticorps par hémagglutination passive. L'hémagglutination passive précède d'un jour le choc ; ce test aurait d'autant plus de valeur qu'il serait accompagné d'une chute de l'asparaginasémie. Mais DUNNICLIFF et coll. (56) pensent que la chute de l'asparaginasémie ne permet pas de prévoir un choc.

Chez les malades immunisés contre l'asparaginase d'Escherichia coli, BEARD et coll. (12) ont poursuivi le traitement avec de l'asparaginase d'Erwinia carotovora sans inconvénient. Il y aurait lieu de suivre toutefois dans ce cas la durée de vie de cette asparaginase, car PETERSON et coll. (141) font remarquer que si l'on ne met pas en évidence en immunoprécipitation de communautés antigéniques entre les deux asparaginases, on obtient une réaction faiblement positive en hémagglutination passive.

Le problème de la prévention et du dépistage des anticorps anti-asparaginase n'est pas encore résolu ; de nombreuses contradictions existent encore entre les auteurs.

## D) Effet immunosuppresseur de l'asparaginase

### 1) Définition

Les immunosuppresseurs sont définis par leur propriété de supprimer ou de déprimer certaines réponses immunitaires. Il existe actuellement de très nombreuses catégories de produits, d'origines très diverses, d'efficacité et de toxicité très variées. Les principales catégories utilisées en clinique actuellement sont les antimétaboliques, les corticoïdes, les alkylants et les sérums antilymphocytes (11).

### 2) Immunosuppression in vitro par la L-asparaginase

Le tissu lymphoïde de la souris et du rat (84) et probablement de l'homme est déficient en asparagine synthétase et il fallait s'attendre à une activité immunosuppressive de l'asparaginase compte tenu aussi de l'effet de l'asparaginase sur les tumeurs lymphoïdes.

En 1958, SCHREK remarque déjà que le sérum de cobaye tue les cellules lymphoïdes humaines, spécialement celles des malades atteints de leucémie lymphoïde chronique (162). En 1967, il confirme ses expériences avec de l'asparaginase d'Escherichia coli (161).

En 1969, ASTALDI et coll. constatent que la transformation blastique à la phytohémagglutinine (PHA) des lymphocytes humains normaux du sang circulant sont inhibés de 88 à 96 % in vitro par addition de 5 UE/ml d'asparaginase (9). D'autres auteurs (37,122,130) rapportent des inhibitions complètes avec des doses

de 1 UE/ml ; la mesure de l'incorporation de thymidine  $^3\text{H}$ , d'uridine  $^3\text{H}$  et de leucine  $^{14}\text{C}$  montre que l'inhibition de la transformation est associée à une inhibition des synthèses d'ADN, d'ARN et de protéines. La L-asparaginase inhibe aussi la transformation blastique induite par d'autres agents (130).

Les lymphocytes du sang de malades ou de sujets normaux ayant reçu de la L-asparaginase répondent mal à la PHA (8,108,130 ).

La nature de cette inhibition a beaucoup été étudiée. Elle n'est pas associée à une cytotoxicité de l'asparaginase sur les cellules lymphoïdes, car il n'y a pas diminution des cellules viables après coloration au bleu-trypan. Après élimination de l'enzyme par lavage de la culture pendant 96 heures, il y a à nouveau transformation blastique au contact de l'agent inducteur (130).

L'inhibition est probablement due à une carence en acide aminé. En effet, dans la plupart des cas il y a reversion de l'inhibition de la blastogénèse par addition d'asparagine (130), pour d'autres auteurs par addition de glutamine ou d'asparagine et même par l'acide aspartique (119). Les différences observées peuvent s'expliquer car les expériences sont effectuées avec des enzymes de sources, d'activité spécifique différentes et contenant des quantités d'activité glutaminasique variables.

La L-asparaginase est un inhibiteur important de la transformation blastique in vitro. Cet effet non cytotoxique est réversible. L'effet inhibiteur est probablement le résultat d'une déplétion en L-asparagine du milieu de culture et peut être annulé par addition soit d'asparagine, soit de précurseur de l'asparagine.

Ces résultats amènent à penser que l'asparaginase doit être immunosuppressive in vivo.

### 3) Effet de l'asparaginase sur l'immunité humorale

En 1969, MULLER BERAT démontre l'effet immunosuppresseur de l'asparaginase in vivo (122). Dans cette étude et dans d'autres qui ont suivies la réponse immunitaire de la souris à des globules rouges de mouton a été le système le plus étudié.

L'immunisation est appréciée par titrage des anticorps sériques ou par la technique des plages de lyse. Les auteurs constatent une diminution de 99 % par rapport aux témoins des plages de lyse le 4<sup>o</sup> jour et un titre hémagglutinant diminué de 50 à 75 % le 6<sup>o</sup> jour de l'immunisation (14,43,143,164).

La suppression de la réponse chez la souris aux globules rouges de mouton par la L-asparaginase dépend de la dose et du schéma d'administration. L'injection d'une dose unique forte (1 000 à 8 000 UE/souris) aux jours -1, 0 et +1 est très immunosuppressive (14,122,164) mais même une injection de 10 U/souris a un effet significatif (43). Les doses faibles de l'ordre de 10 à 250 U/souris sont très immunosuppressives si les injections sont journalières et commencées le jour même de l'injection de l'antigène (43,122,164); l'effet immunosuppresseur est encore meilleur si les injections journalières débutent 3 à 5 jours avant l'injection de l'antigène et si elles sont poursuivies jusqu'au jour du prélèvement de sérum.

L'immunosuppression in vivo semble spécifique. L'enzyme inactivée par la chaleur n'est plus immunosuppressive (43), ce qui élimine l'hypothèse d'une compétition antigénique ou l'installation d'une paralysie immunitaire due à l'introduction d'une grande quantité de protéines étrangères.

L'effet immunosuppresseur de l'asparaginase est annulé in vivo par l'injection journalière d'asparagine (43). L'immunosuppression n'est pas due à une contamination par la L-glutaminase (14). L'effet principal du traitement par l'enzyme sur la réponse immunitaire in vivo semble être l'installation d'un retard de la synthèse des anticorps sériques. Après un certain temps compris entre 10 et 20 jours, le taux d'anticorps sériques revient à la normale. La carence en asparagine pourrait induire l'activation du système asparagine-synthétase des tissus lymphoïdes de la souris. En effet, l'immunosuppression n'est pas plus importante chez les animaux traités par l'asparaginase des jours -3 à +5 que chez ceux traités des jours -3 à +12 si la mesure des anticorps est effectuée le 12<sup>e</sup> jour ; ce qui signifie que la possibilité de formation des anticorps est retrouvée malgré un traitement continu.

Les effets de la L-asparaginase sur le système immunologique du lapin ont été étudiés par ASTALDI et coll. (7). L'examen du tissu lymphoïde après 3 jours à 2 semaines de traitement avec des doses de 200 UE/kg montre une déplétion des follicules lymphoïdes périphériques et une lymphocytopénie. Le nombre des lymphocytes et des plasmocytes des centres germinatifs est augmenté ; ce qui laisse à penser que chez le lapin la L-asparaginase a surtout un effet sur l'immunité cellulaire plutôt que sur l'immunité humorale. Mais pour KHAN et HILL (92) des injections de 500 U/kg/j pendant 21 jours suppriment la formation des anticorps contre l'albumine bovine chez le lapin.

L'effet immunosuppresseur de l'asparaginase chez l'homme a été étudié par OHNO et HERSH (129). Chez les malades traités par des injections journalières de 12 000 à 400 000 U/m<sup>2</sup> pendant 3 à 38 jours, la réponse

immunitaire primaire à des antigènes protéiques est déprimée ou abolie. Les auteurs n'observent aucun effet sur l'hypersensibilité retardée établie, sur le taux des immunoglobulines circulantes et sur le titre des isoanticorps naturels.

L'effet immunosuppresseur in vivo sur l'immunité humorale est certainement due à une déplétion de l'asparagine (144).

#### 4) Effet de l'asparaginase sur l'immunité cellulaire

L'effet de l'asparaginase sur l'immunité cellulaire a aussi été étudiée.

HOBICK rapporte en 1969, que la maladie du rejet du greffon contre l'hôte est annulée par l'asparaginase (78). KHAN montre que l'encéphalomyélite allergique expérimentale est également supprimée chez le rat (93).

L'augmentation de la survie de greffes a été rapportée par de nombreux auteurs (18,59,180).

La L-asparaginase peut prolonger la vie de greffons de peau allogéniques et xénogéniques chez la souris (123). La survie des greffes de peau chez la souris après traitement par l'asparaginase est supérieure à ce que l'on obtient avec l'azathiopine (26) ; elle est associée à une lymphopénie.

Chez le lapin des injections journalières de 200 U/kg/j augmentent également la survie de greffes de peau de 9,5 à 17 jours en moyenne (168) ; cette même suppression est accompagnée d'une perte de poids importante de

l'ordre de 32 % par rapport aux témoins.

En ce qui concerne les greffes d'organes, RAPAPORT et coll. (148) ont obtenu une prolongation de la survie d'un greffon rénal homologue chez le chien après injection d'asparaginase seule à des doses de 150 à 200 U/kg/j pendant 9 à 21 jours. Les auteurs observent une réduction de l'infiltration cellulaire du greffon chez les animaux traités.

LEVIN et MERRIL (103) effectuent des transplantations rénales chez des rats recevant des injections de 1000 mg/kg/j pendant 7, 14 et 21 jours. Les auteurs obtiennent une prolongation de la survie du greffon chez les rats recevant 7 injections, puis un rejet ; par contre, la moitié ou plus des animaux traités pendant 14 ou 21 jours n'effectuent pas de rejet dans les 100 jours qui suivent. Ces observations ajoutées au fait que l'asparaginase est immunosuppressive chez l'homme (129) ont amenés certains auteurs à penser à l'utilisation de l'asparaginase chez l'homme dans le cadre du traitement immunosuppresseur associé à la transplantation d'organes ( 74,103 ).

Le mécanisme par lequel l'enzyme supprime l'immunité cellulaire n'a pas été très étudié et il n'y a aucune raison pour affirmer qu'il est le même que pour l'immunité humorale.

BRAMBILLA (26 ) et FREIDMAN (60 ) pensent qu'un mécanisme cytotoxique peut être avancé, car l'inhibition ne reverse pas après injection d'asparagine et l'on observe une diminution du poids de la rate qui pourrait être due à l'effet des endotoxines bactériennes.

Qu'une immunité humorale et cellulaire puisse s'établir contre l'asparaginase qui est elle même un immunosuppresseur, est d'un grand intérêt fondamental. Actuellement, aucune étude n'a suivi l'évolution de la cinétique de l'immunisation comparativement au niveau de l'activité sérique de l'enzyme. Il est possible que l'enzyme devienne immunogène alors que le niveau nécessaire à l'effet immunosuppresseur n'est plus atteint.

## CONCLUSION

Difficultés rencontrées au cours du traitement par l'asparaginase.

### 1) Troubles métaboliques

L'utilisation de l'asparaginase entraîne l'apparition d'un certain nombre de troubles métaboliques qui ont été signalés par de nombreux auteurs (40,127,160,188 ). On observe assez souvent dès le début du traitement l'apparition de nausées, de vomissements et par la suite dans 50 % des cas une perte de poids d'environ 5 %. Parmi les troubles les plus importants et les plus constants, on note des troubles de la coagulation et des troubles hépatiques.

#### a) Troubles de la coagulation .....

La diminution du fibrinogène, de même que celle du plasminogène et des facteurs du complexe prothrombinique, a été signalée par de nombreux auteurs, tels que HASKELL et coll. (72), GRALNICK et HENRY (66) et ZUBROD (188).

L'abaissement du fibrinogène, qui a été la première anomalie signalée est constante de même que celle du plasminogène, alors que la diminution

du taux des facteurs du complexe prothrombinique est inconstante.

De plus, récemment différents auteurs ont signalé un abaissement important et constant de l'antithrombine III ( 48,49,52 ).

Si tous les auteurs admettent que l'asparaginase provoque des troubles de la coagulation, les mécanismes qu'ils invoquent pour expliquer ceux-ci diffèrent. En particulier, pour le fibrinogène certains auteurs mettent en évidence dans le sérum des malades traités, des produits de dégradation du fibrinogène, ce qui les amène à dire que l'hypofibrinogénémie est due à un syndrome de défibrination ou à une fibrinolyse, alors que d'autres (16) ne constatent pas la présence de ces produits de dégradation.

Il est possible que l'existence de produits de dégradation du fibrinogène mis en évidence dans certains cas soit due à l'action directe d'endotoxines bactériennes qui doivent exister dans les préparations d'asparaginase utilisées (72).

Les essais de marquage, qui ont été jusqu'à présent effectués, ne permettent pas de résoudre le problème, BETTIGNOLE et coll. (19) après injection de fibrinogène autologue marqué à  $^{131}\text{I}$  ne constatent pas de diminution de la durée de vie de celui-ci, ce qui semble indiquer que l'hypofibrinogénémie serait la conséquence d'une diminution de la synthèse. BRODSKY et coll. (27)

constatent une diminution de la durée de vie du fibrinogène par injection de sélénométhionine marquée chez des malades en cours de traitement, mais pas chez les malades qui ont reçu l'injection avant le début du traitement.

L'hypofibrinogénémie est donc due, soit à une diminution de la synthèse du fibrinogène, soit à la synthèse de molécules anormales à durée de vie plus brève, soit aux deux hypothèses réunies.

Le retentissement clinique des anomalies de la coagulation est modéré, des syndromes hémorragiques et thrombotiques sont parfois observés (65) mais la mise en évidence de la diminution constante de l'antithrombine III mérite de retenir l'attention si l'on veut éviter des accidents thrombotiques.

#### b) Troubles hépatiques .....

L'altération des fonctions hépatiques pendant le traitement par l'asparaginase se manifeste par une augmentation du taux de la bilirubine, des transaminases et des phosphatases alcalines sériques ainsi que par une diminution du taux du cholestérol et de l'albumine sérique. Cette toxicité hépatique réversible à l'arrêt du traitement s'avère plus fréquente encore lorsque l'asparaginase est associée à d'autres drogues hépatotoxiques comme la daunorubicine et le methotrexate.

PRATT et coll. (145) ont effectué une étude histologique du foie de 31 patients, qui avaient été traités par l'asparaginase : chez 27 d'entre eux, ils ont mis en évidence une stéatose hépatique d'un degré variable jusqu'à 261 jours après l'arrêt du traitement. Cette atteinte hépatique est sans doute responsable pour une part de l'amaigrissement important constaté chez certains malades et de l'hyperlipidémie sérique fréquente (100).

c) Autres troubles  
 .....

Certains auteurs ( 132,182,183 ) constatent une atteinte pancréatique avec amylasémie modifiée et hyperglycémie consécutive à une diminution du taux de l'insuline ; quelques cas de pancréatite aiguë ont été rapportés (169). On peut voir apparaître aussi une augmentation de l'urée sanguine. L'augmentation de l'ammoniémie est constante et pourrait expliquer la somnolence, les hallucinations et les légères modifications fréquentes de l'électroencéphalogramme (121). Il est probable que la plupart de ces anomalies soient le résultat d'une dépression de la synthèse protéique, mais comme le font remarquer HASKELL et coll. ( 71 ), il est possible aussi que certaines d'entre elles qui ne sont pas rapportées par tous les auteurs soient le résultat d'une contamination des préparations par la glutaminase ou par des endotoxines bactériennes.

2) Inconvénients immunologiques

L'asparaginase utilisée actuellement chez l'homme est extraite d'Escherichia coli ; cette enzyme protéique de poids moléculaire élevé possède toutes les propriétés d'un antigène. Effectivement HILL et coll. ( 75 ) notaient déjà l'apparition d'un urticaire, de démangeaisons et la sensation d'une striction laryngée au cours de la première rémission d'une leucémie aiguë par l'asparaginase obtenue chez l'homme.

Depuis, de nombreux auteurs (16,39,41,72,115 ) ont constaté l'apparition de phénomènes anaphylactiques au cours du traitement par cette enzyme.

Il y a lieu de distinguer deux symptomatologies différentes : d'une part, des réactions d'apparition rapide qui peuvent même survenir dès la première injection et qui se manifestent par une intolérance digestive avec anorexie, vomissement, voire diarrhée dans les heures qui suivent la perfusion ; d'autre part des symptômes qui peuvent apparaître au bout de plusieurs jours de traitement ou lors de la reprise d'une cure et qui se manifestent par l'apparition en cours de perfusion d'un état de choc avec frissons, sueurs, hypotension importante voire collapsus. Les phénomènes d'apparition rapide sont vraisemblablement dus à la présence d'endotoxines bactériennes alors que les réactions plus tardives correspondent à l'apparition d'une immunisation.

(125)  
OETTGEN et SCHULTEN furent les premiers à mettre en évidence la présence d'anticorps précipitants et d'anticorps pouvant fixer le complément dans le sérum des malades ayant présentés des réactions allergiques. REIS et coll. (151) peu de temps après apportèrent la preuve que les anticorps précipitants responsables des chocs immunologiques étaient dirigés contre la L-asparaginase et non contre des impuretés de la préparation. Les anticorps anti-asparaginase en plus des chocs anaphylactiques qu'ils peuvent provoquer neutralisent partiellement ou totalement (141, 171) l'enzyme in vivo et in vitro donc diminuent son efficacité.



## C H A P I T R E I

-:-:-:-:-:-:-:-:-:-

Mise au point d'une technique automatique de dosage de la  
L-asparaginase par titrage de l'ion ammonium sur autoanalyseur.

## I N T R O D U C T I O N

---

La L-asparaginase catalyse la désamidation de la L-asparagine en acide L-aspartique avec libération d'ion ammonium.

Deux types de méthodes de dosage de l'enzyme sont possibles :

- soit le dosage de l'acide L-aspartique libéré dans le milieu ; ce dosage peut se faire par des réactions colorimétriques courantes (62), mais la technique suppose dans un premier temps une séparation sélective et totale de cet acide aminé. Cette technique est valable d'un point de vue quantitatif, mais elle est longue et nous n'avons pas pu envisager son application compte tenu du nombre important d'échantillons que nous avons à étudier

- soit le dosage de l'ion ammonium libéré lors de la réaction enzymatique ; ce dosage peut être réalisé par de très nombreuses techniques. Parmi celles-ci, nous pouvons distinguer des méthodes électrochimiques : conductimétrie (69), ionométrie (90, 120), coulométrie (3, 45) ou potentiométrie à courant nul : pH stat (184bis) et des réactions colorimétriques qui sont plus spécifiques et plus sensibles. Parmi ces dernières, la plus employée reste la réaction de Nessler (124) qui utilise un iodure double de mercure et de potassium. Cette technique ne nous a pas donné entière satisfaction, essentiellement pour son manque de reproductibilité.

Nous avons alors essayé la méthode au phénol-hypochlorite décrite initialement par BERTHELOT (17) ; l'emploi de nitroprussiate de sodium en tant

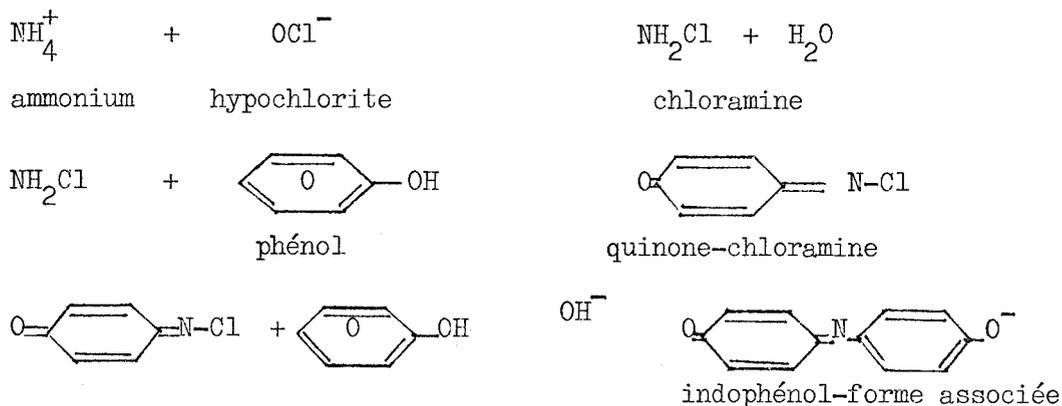
que stabilisateur de la réaction s'est avéré nécessaire pour l'obtention de résultats reproductibles (107).

Nous avons pu alors adapter la méthode de dosage sur auto-analyseur (83).

Dans un premier temps, nous avons mis au point une technique semi-automatique : la réaction enzymatique étant effectuée manuellement et le dosage de l'ion ammonium réalisé à l'autoanalyseur. Les résultats obtenus nous ayant donné satisfaction, nous avons dans un second temps automatisé complètement l'ensemble des réactions.

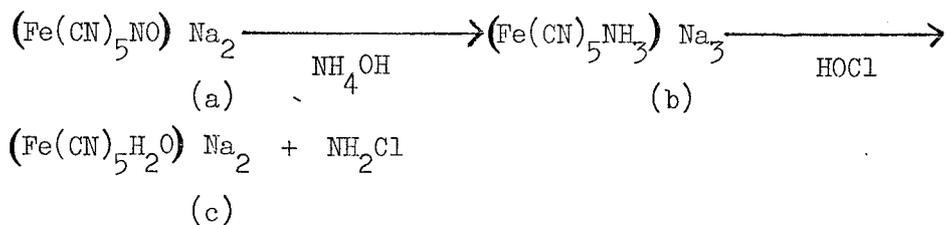
I - MATERIEL ET METHODESA) Principe de la réaction

Le réactif au phénol-hypochlorite de sodium donne, en présence d'ion ammonium, une coloration résultant de la formation d'un complexe indo-phénolique qui, jaune en milieu faiblement alcalin, passe au bleu intense dans des conditions de pH supérieur à 10.

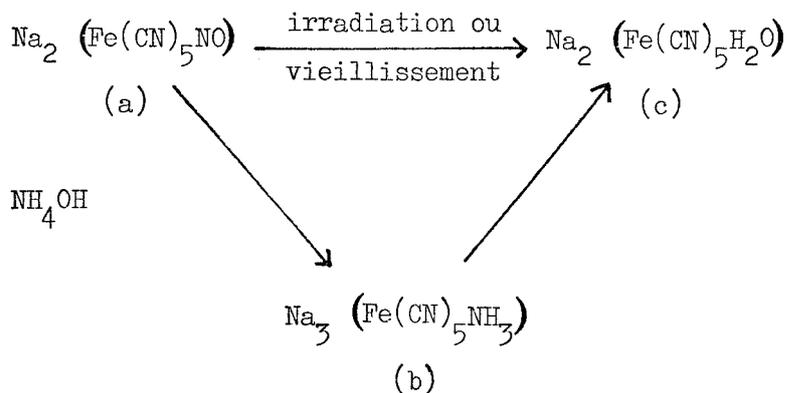
B) Rôle du nitroprussiate de sodium

Le rôle du nitroprussiate de sodium en tant que catalyseur de la réaction de BERTHELOT, qui a été proposé par LUBOCHINSKY et ZALTA (105), n'a pas encore été éclairci. Cependant, les différentes formes que ce composé peut prendre et qui ont été signalées par PESEZ(139) permettent de formuler une hypothèse sur le fonctionnement catalytique du nitroprussiate de sodium encore appelé pentacyanonitrosyloferrate disodique (a). Le complexe (a) est capable de fixer transitoirement l'ammoniaque pour donner le pentacyanoaminoferrate trisodique (b) avant d'être dégradé par les oxydants (hypochlorite de sodium dans notre

cas) pour libérer la monochloramine et devenir le pentacyanoaquoferrate disodique (c)



PESEZ signale la possibilité du passage direct de l'état (a) à l'état (c) par simple irradiation de la solution aqueuse de nitroprussiate de sodium. Or nous avons constaté que le réactif se conserve mal, même en flacon coloré. Cette dégradation du réactif pourrait correspondre à la transformation directe du produit de départ en pentacyanoaquoferrate disodique par simple vieillissement. Les différentes possibilités peuvent se résumer dans le schéma suivant :



C) Réactifs

Tous les réactifs et solutions tamponnées sont préparés à partir d'eau distillée.

## - Tampon véronal pH 8

Les tampons phosphate et tris maléate ont été essayés mais ils donnent des réactions parasites contrairement au tampon véronal.

. Véronal sodé (diéthylmalonylurée sodée)	1,03	g
. Acide chlorydrique fumant	0,13	m
. Eau distillée	q.s.p.	1000 m

## - Solution de phénate de sodium

. Phénol pur cristallisé	40	g
. Soude caustique en pastilles	40	g
. Eau distillée	q.s.p.	500 m

## - Solution de nitroprussiate de sodium

. Nitroprussiate de sodium R.P.	0,162g	
. Acide acétique pur cristallisable	0,3	ml
. Eau distillée	q.s.p.	1000 ml

Conserver en flacon coloré au maximum une semaine.

## - Solution d'hypochlorite de sodium

. Hypochlorite de sodium pur en solution, titrant 10° chlorométrique français	100	m
. Eau distillée	q.s.p.	1000 m

- Solution étalon d'ion ammonium

La technique semi-automatique a été mise au point avec différentes solutions d'ion ammonium. Les concentrations de nos solutions sont exprimées en milliéquivalent (meq) de l'ion considéré par litre. Rappelons qu'une solution à 1 meq d' $\text{NH}_4^+$  par litre correspond à une solution renfermant 18 mg de l'ion ammonium :

. Solution à 3 meq  $\text{NH}_4^+$ /litre

\* Sulfate d'ammonium pur et sec pour analyses 0,202 g

\* Tampon véronal q.s.p. 1000 ml

. Solutions filles

Elles sont préparées par dilutions successives de la solution mère par le tampon véronal. Elles renferment respectivement : 1.5, 1, 0.75, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2, 0.1 meq ion  $\text{NH}_4^+$ /l.

D) Schémas de montage

1) Technique semi-automatique

a) Schéma de montage  
.....

Le schéma de montage est classique (fig.2) : échantillons et réactifs sont prélevés par une pompe proportionnante et segmentés par des bulles d'air préalablement débarassées de toute trace d'ammoniaque par passage dans un piège à acide sulfurique. Le dialyseur sépare l'ammoniaque des matériaux gênants que peut contenir le mélange réactionnel (son rôle est surtout important pour les

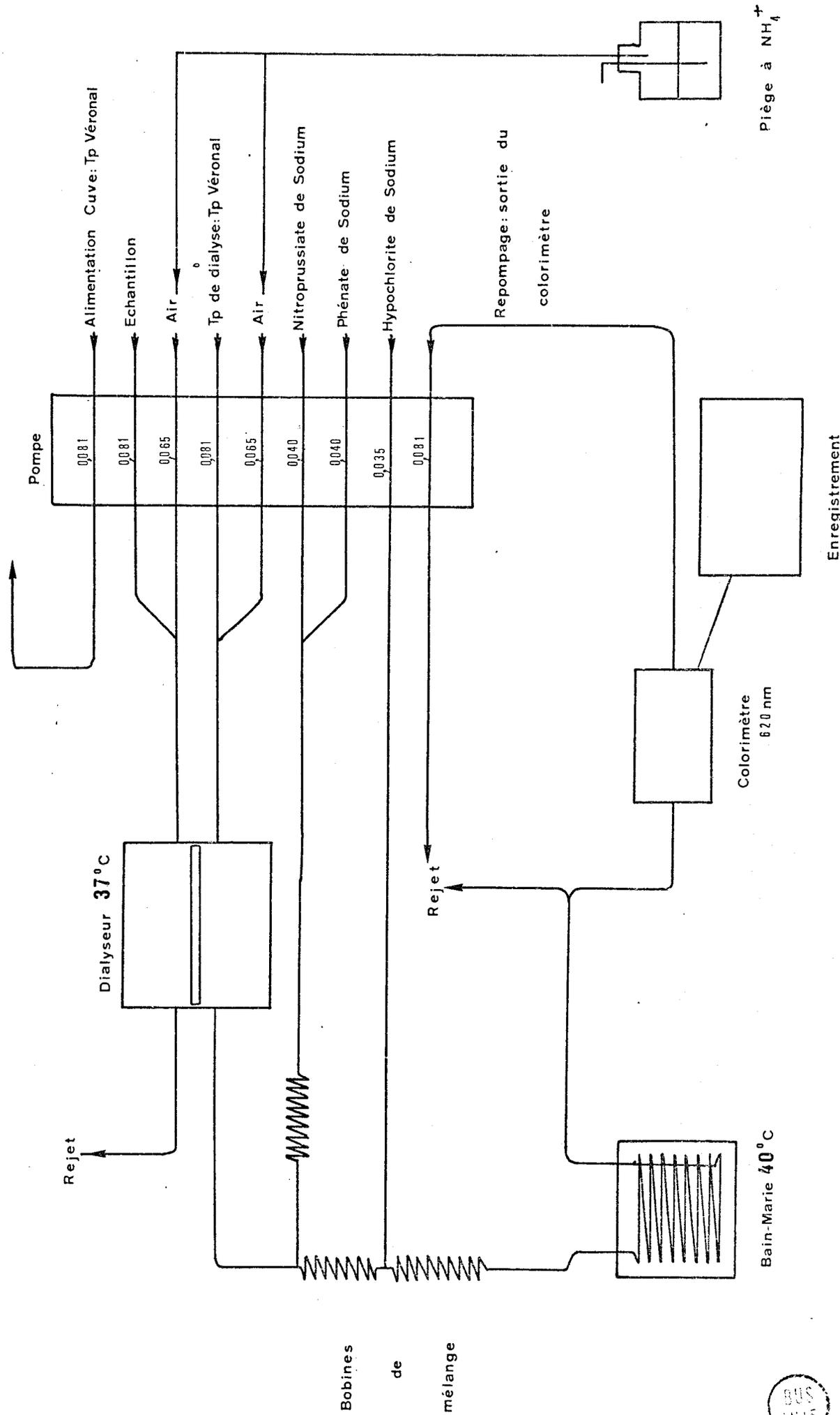


Fig.2 : Schéma de montage (dosage de l'ion  $\text{NH}_4^+$ ) sur Autoanalyseur TECHNICON



mesures effectuées sur des sérums). Le dialysat et les différents réactifs sont homogénéisés par plusieurs bobines de mélange deux à deux. Le développement de la coloration est accéléré par passage dans un bain-marie à 40°C. Les mesures optiques sont effectuées par un colorimètre à flux continu et les résultats sont transcrits en permanence sur un enregistreur graphique.

Nous utilisons des tubes en chlorure de polyvinyl dont les diamètres sont choisis en fonction des proportions requises entre les réactifs pour assurer le meilleur développement de la coloration. Le diamètre intérieur en pouce des tubes de pompe est indiqué sur la figure 2.

	Diamètre intérieur en pouce	Débit en cm <sup>3</sup> /min.
Alimentation de la cuve	0.081	2.50
Echantillon	0.081	2.50
Air	0.065	1.60
Tampon de dialyse	0.081	2.50
Nitroprussiate de sodium	0.040	0.60
Phénate de sodium	0.040	0.60
Hypochlorite de sodium	0.035	0.42
Repompage	0.081	2.50

b) Réaction enzymatique manuelle  
.....

Le sérum ou les différents volumes de la solution mère d'asparaginase sont dilués en tampon véronal ; de l'asparagine est ajoutée en excès et l'ensemble est placé au bain-marie à 37°C. La réaction est arrêtée

après 10 min. par addition d'acide trichloracétique.

- Gamme étalon :

- . 1,7 ml de tampon véronal
- . 0,2 ml d'une solution d'asparagine 0,04 M
- . 10, 8, 6, 4, 2  $\mu$ l d'une solution d'asparaginase à 50 UE/ml
- . 10 min. au bain-marie à 37°C
- . 2 gouttes d'acide trichloracétique à 20%

- Gamme de mesure :

- . 1,7 ml de tampon véronal
- . 0,2 ml d'une solution d'asparagine à 0,04 M
- . 40  $\mu$ l de sérum
- . 10 min. au bain-marié à 37°C
- . 2 gouttes d'acide trichloracétique à 20%

## 2) Technique automatique

### a) Schéma de montage

.....

L'échantillon d'abord dilué reçoit ensuite une solution d'asparagine 0,04 M. Les réactifs sont comme précédemment mélangés deux à deux et bullés. La réaction enzymatique de l'asparaginase sur l'asparagine s'effectue pendant 10 à 12 min. dans une bobine de délai placée dans un bain-marie réglé à 37°C (fig.3). Le reste du montage est ensuite identique à celui de la technique semi-automatique.

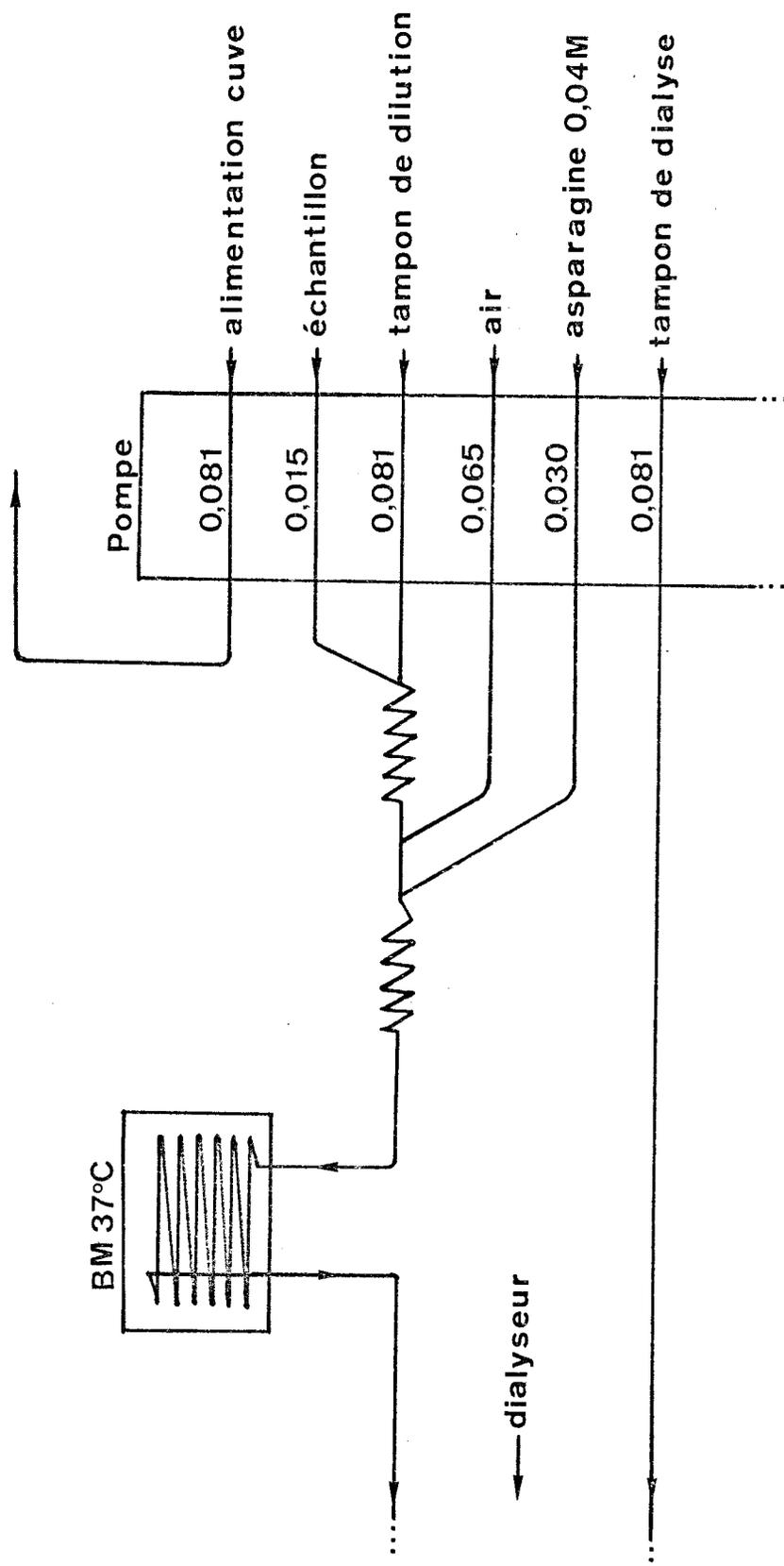


Fig. 3

Technique automatique : modification du schéma de montage



	Diamètre intérieur en pouce	Débit en cm <sup>3</sup> /min.
Echantillon	0,015	0.10
Tampon de dilution	0.081	2.50
Air	0.065	1.60
Asparagine	0.030	0.32

Il n'est pas nécessaire ici d'arrêter la réaction enzymatique par l'acide trichloracétique car tous les échantillons sont traités pendant un temps identique dans les mêmes conditions.

b) Gamme étalon  
.....

Solutions contenant : 5, 10, 15, 25, 40, 50, 75  $\mu$ l d'asparaginase à 400 UE/ml dilués dans 2 ml de tampon véronal.

Ces solutions contiennent respectivement : 1, 2, 3, 5, 8, 10, 15 UE/ml.

c) Sérums à étudier  
.....

Les sérums humains et de lapins sont décantés après coagulation et mis en réserve au congélateur à - 80°C.

## II - RESULTATS

### A) Technique semi-automatique

#### 1) Résultats acquis sur une gamme étalon de sulfate d'ammonium en tampon véronal

Quelque soit la technique semi-automatique ou automatique, nous passons avant chaque série de mesures, une gamme étalon fraîchement préparée. La référence à une gamme étalon pour chaque série permet d'éviter les causes d'erreur pouvant provenir du réglage de l'appareil et surtout de la qualité des réactifs.

La figure 4 correspond au passage d'une gamme étalon réalisée avec des solutions d'ion ammonium comprises entre 0,1 et 1,5 meq/l et a un test de reproductibilité réalisé par passage de chaque échantillon trois fois.

Nous voyons que notre montage permet d'effectuer des mesures reproductibles pour les solutions contenant entre 0,2 et 1,5 meq/l. Les écarts observés entre les différentes mesures sont de l'ordre de 1 % de transmission. Ces écarts sont dus en grande partie à l'inertie de l'appareil enregistreur et équivalent suivant l'importance des pics à une erreur absolue comprise entre 0,01 et 0,1 meq/l, soit environ 5 % d'erreur relative.

#### 2) Résultats obtenus après réaction enzymatique manuelle

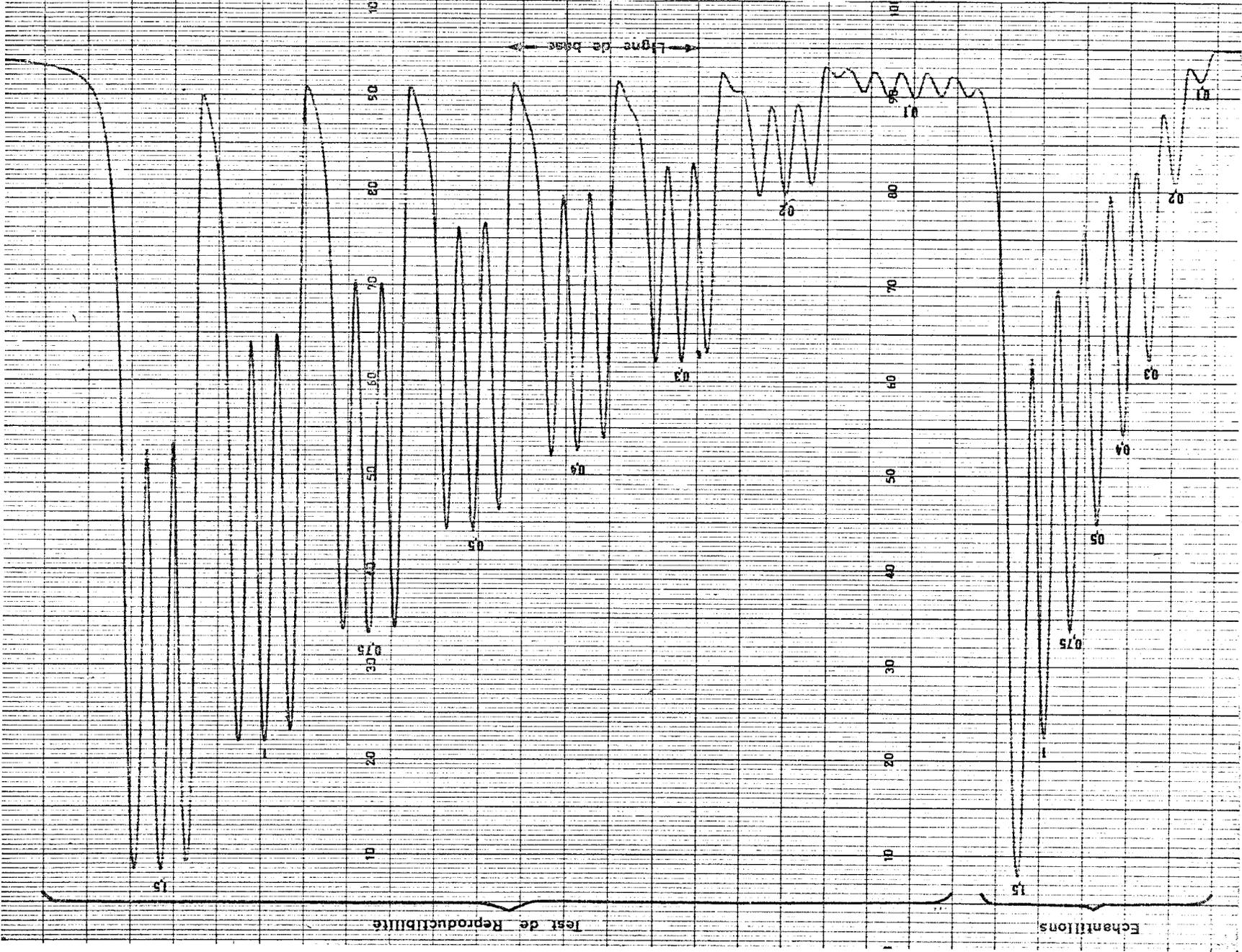
##### a) Gamme étalon d'asparaginase .....

La figure 5 correspond au passage d'une gamme étalon préparée comme nous l'avons vu précédemment et qui est constituée en fait de solutions tamponnées contenant entre 0,05 et 2,5 UE/ml.



Gamme étalon réalisée à partir de solutions aqueuses tamponnées par le véronal et test de reproductibilité des résultats

Fig.4



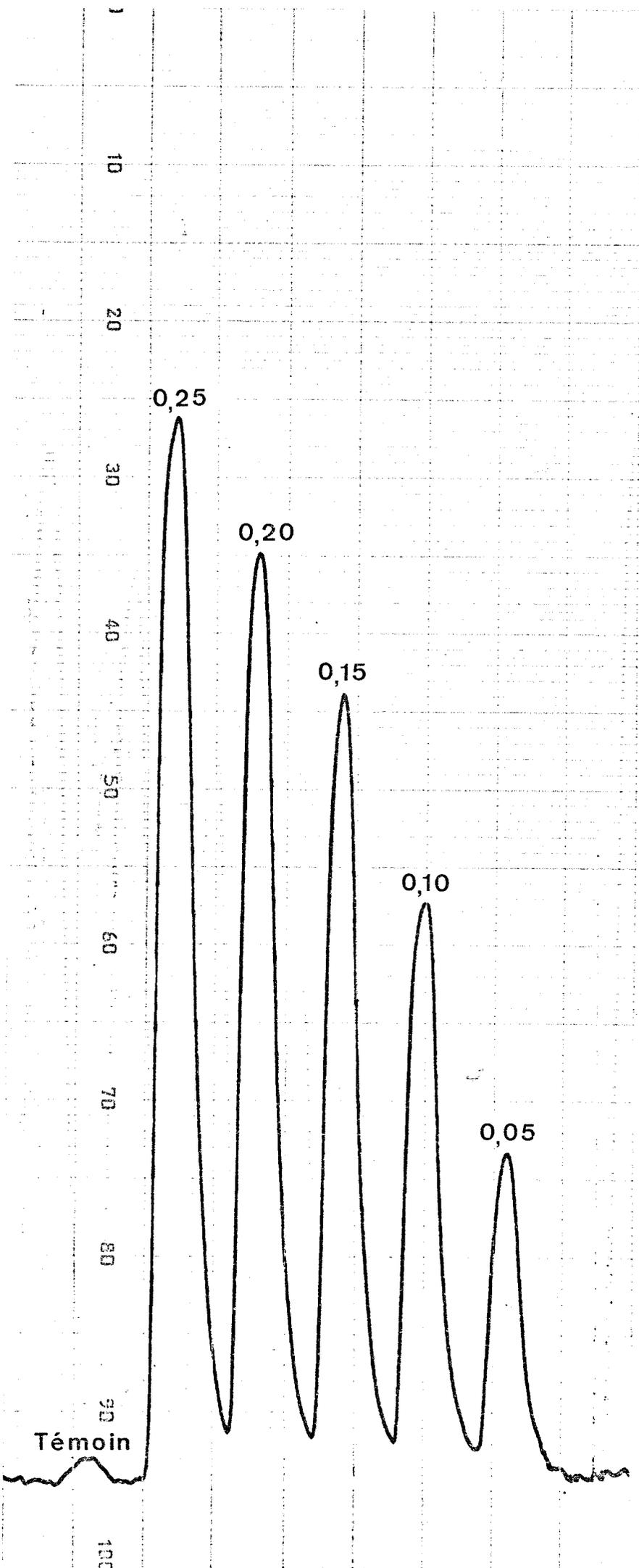


Fig. 5 : Méthode semi-automatique :  
gamme étalon réalisée à partir de  
différentes dilutions d'asparagi-  
nase (concentrations exprimées en  
UE/ml).

Pour obtenir une meilleure dissociation des pics nous avons passé un tampon véronal entre chaque échantillon.

Le premier pic très petit est un témoin asparagine réalisé exactement dans les mêmes conditions que chacun des échantillons mais ne contenant pas d'asparaginase. La hauteur de ce pic correspondrait à une teneur de 0,003 UE/ml d'asparaginase ; il est vraisemblablement dû à une autohydrolyse de l'asparagine.

Si nous reportons les valeurs des transmissions de chaque échantillon sur du papier semi-logarithmique, nous voyons qu'il existe une relation linéaire avec la densité optique (fig. 6). La coloration mesurée après réaction est donc bien proportionnelle à la quantité d'asparaginase.

b) Sérums humains  
.....

Nous avons voulu voir ensuite si les sérums ne provoquaient pas d'interférences sur la réaction. Pour cela, nous avons passé plusieurs sérums prélevés à différents temps après injection d'asparaginase (1000 UE/kg par voie intraveineuse) chez un malade atteint d'une leucémie aiguë lymphoblastique (fig. 7).

Le premier pic correspond à un prélèvement témoin prélevé chez le même malade avant toute injection d'enzyme.

Nous constatons d'une part que le sérum n'interfère pas sur la réaction et que d'autre part, l'activité asparaginasique du sérum avant injection est très faible et du même ordre de grandeur que le témoin asparagine de la figure 5.

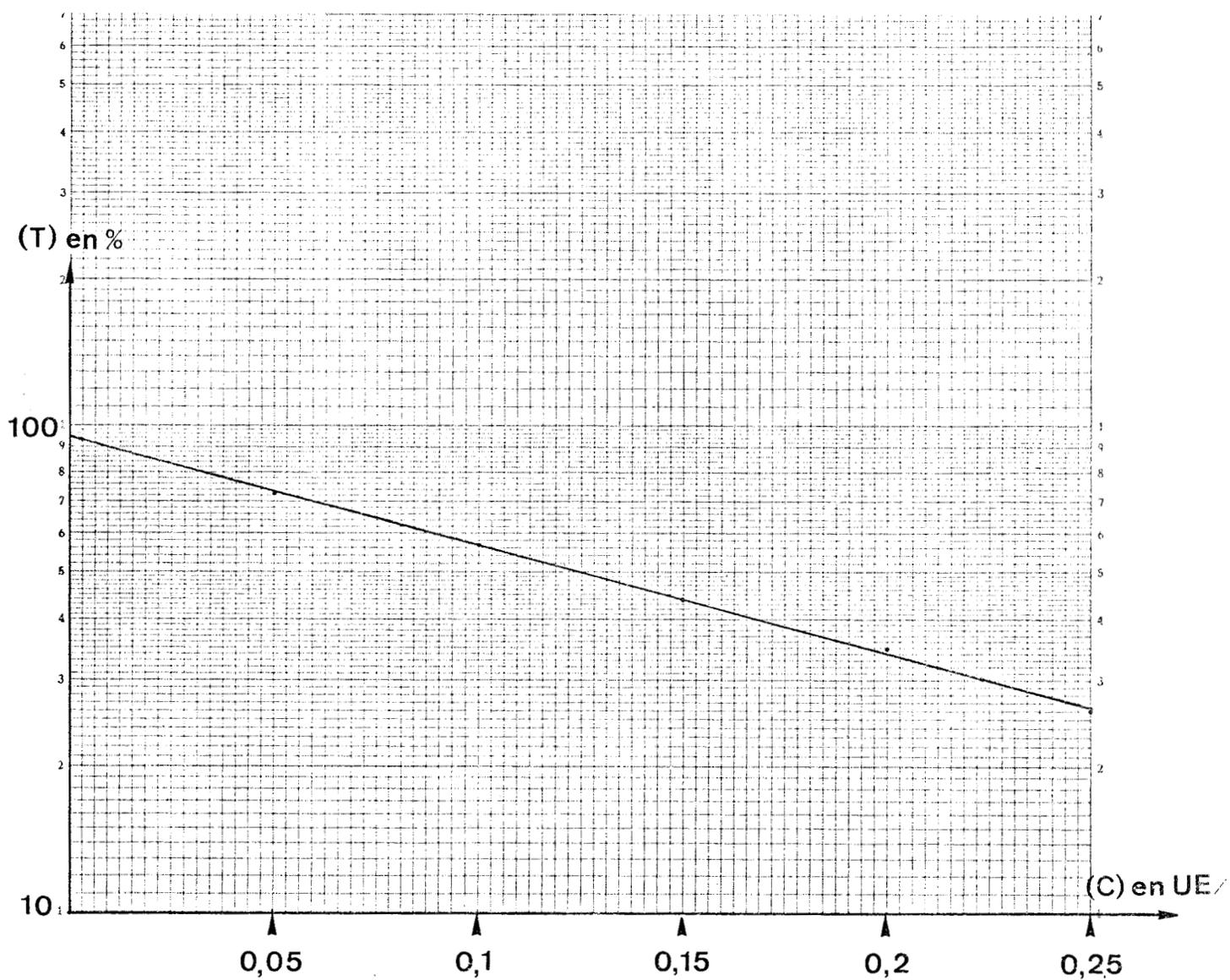


Fig. 6 : Technique semi-automatique : mise en évidence de la relation linéaire entre densité optique et concentration en asparaginase dans la zone étudiée (cf. Fig. 5).



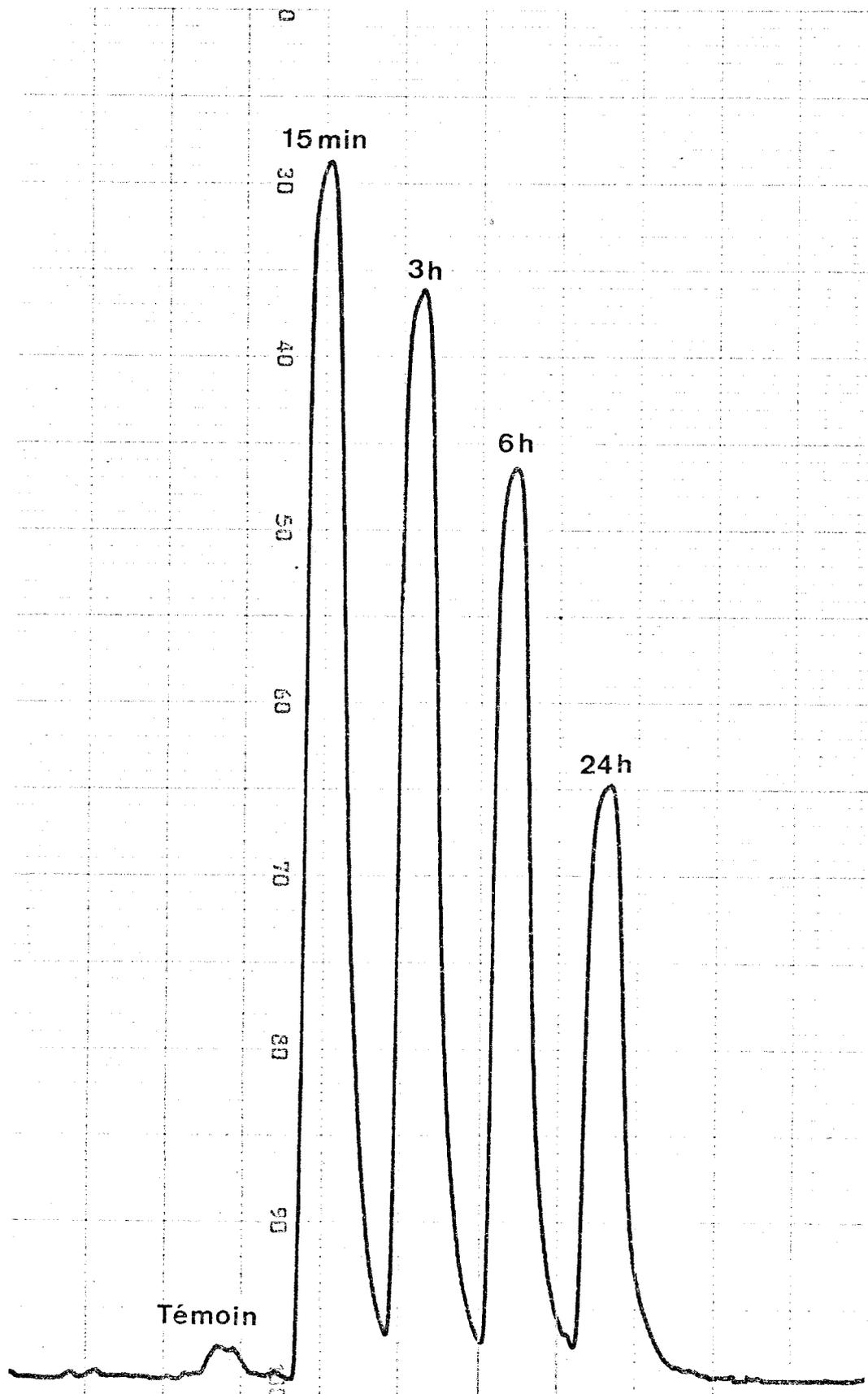


Fig. 7 : Technique semi-automatique : variations en fonction du temps, du taux d'asparaginase circulant chez un sujet leucémique.

Nous comparerons par la suite les résultats obtenus par les techniques semi-automatique et automatique sur cette série de sérums.

## B) Technique automatique

### 1) Automatisation de la technique

L'automatisation complète de la technique a été relativement rapide compte tenu des résultats acquis avec la technique semi-automatique.

Le débit des tuyaux de prélèvement et de dilution a été choisi après un calcul préalable en fonction des quantités d'enzymes que contiennent habituellement les sérums humains et les sérums de lapin que nous avons à étudier.

Il est néanmoins toujours possible de diminuer ou d'augmenter la sensibilité du montage en faisant varier :

- le tuyau de prélèvement de l'échantillon
- le temps de la réaction enzymatique à 37°C
- le tuyau de dilution de l'échantillon et le tuyau du tampon de dialyse.

### 2) Tests effectués

Nous avons passé une gamme étalon comprise entre 1 et 15 UE/ml pour vérifier que la relation entre les transmissions mesurées et la densité optique était toujours linéaire après report sur papier semi-logarithmique.

Nous avons ensuite fait à nouveau un test de reproductibilité de la technique à partir de la gamme étalon.

Puis nous avons repassé la série de sérums humains déjà passée en technique semi-automatique afin de comparer les valeurs absolues trouvées avec les deux techniques pour pouvoir apprécier la validité de la réaction enzymatique automatique.

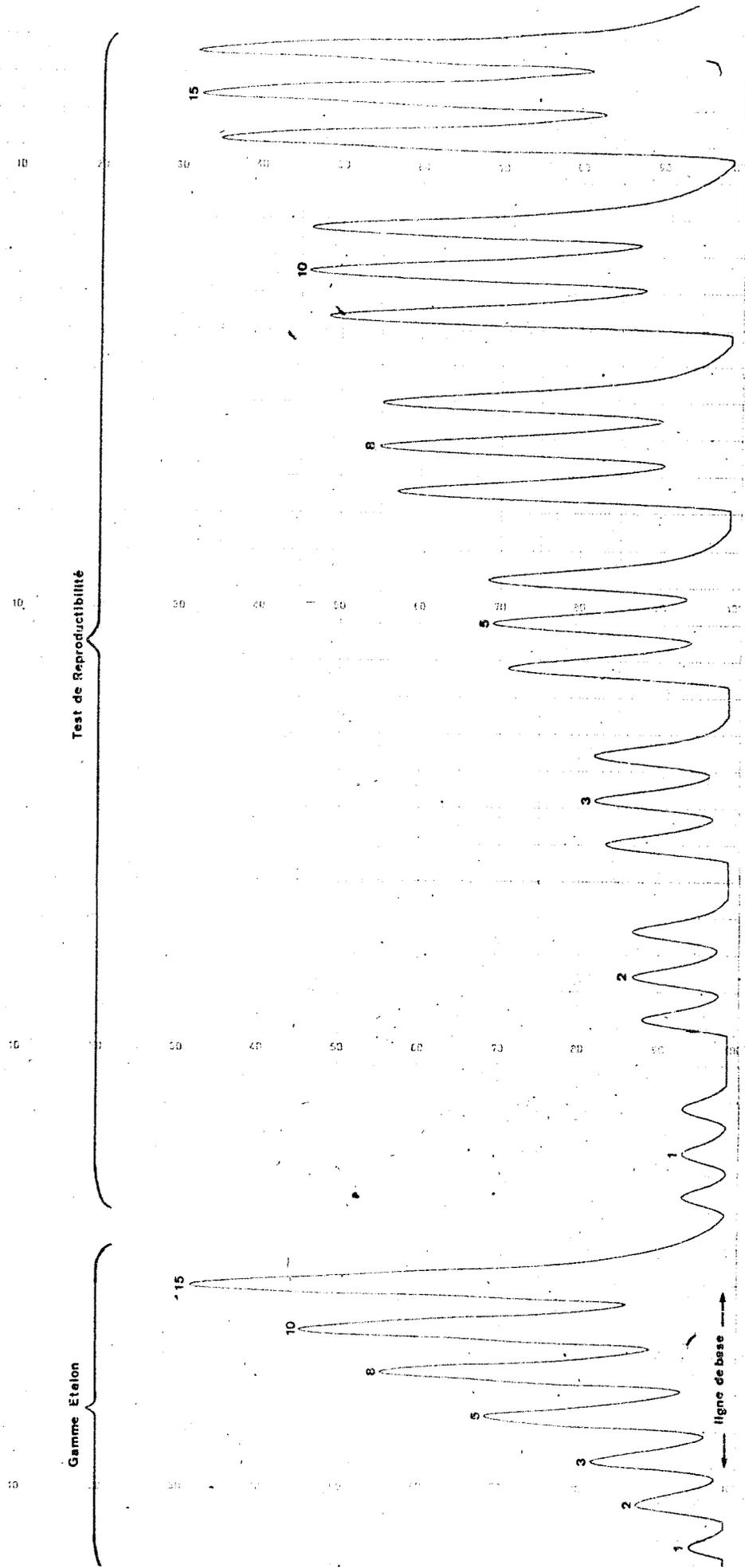
Enfin nous avons étudié la fiabilité de la technique.

a) Gamme étalon  
.....

La relation entre les valeurs des transmissions obtenues avec la gamme étalon (fig. 8) et la densité optique est linéaire après report sur papier semi-logarithmique (fig. 9) ; il va donc être possible d'évaluer d'une façon précise le nombre d'unités enzymatiques contenues dans un échantillon quelconque en se reportant directement à cette courbe.

b) Test de reproductibilité  
.....

La technique est reproductible pour tous les échantillons de la gamme (fig. 8) ; il faut remarquer que le premier pic de chaque série est légèrement inférieur aux deux autres sauf pour la première série. En fait, pour cette première série le stylet enregistreur revient complètement à la ligne de base entre chaque pic et les trois pics sont parfaitement égaux, ce qui prouve que la différence entre le premier pic et les deux suivants de chaque série est due essentiellement à l'inertie de l'appareil enregistreur. Nous avons déjà dit que nous intercalons un tampon véronal entre chaque échantillon ; si l'on désire avoir une reproductibilité parfaite, il suffit d'en intercaler plusieurs afin de retrouver la ligne de base chaque fois. Toutefois, l'erreur qui en résulte est relativement faible et la conduite à tenir est fonction de la précision requise dans les mesures.



Test de Reproductibilité

Gamme Etalon

Fig. 2 : Technique automatique : gamme étalon réalisée à partir de différentes dilutions d'aspergillase et test de reproductibilité des résultats.



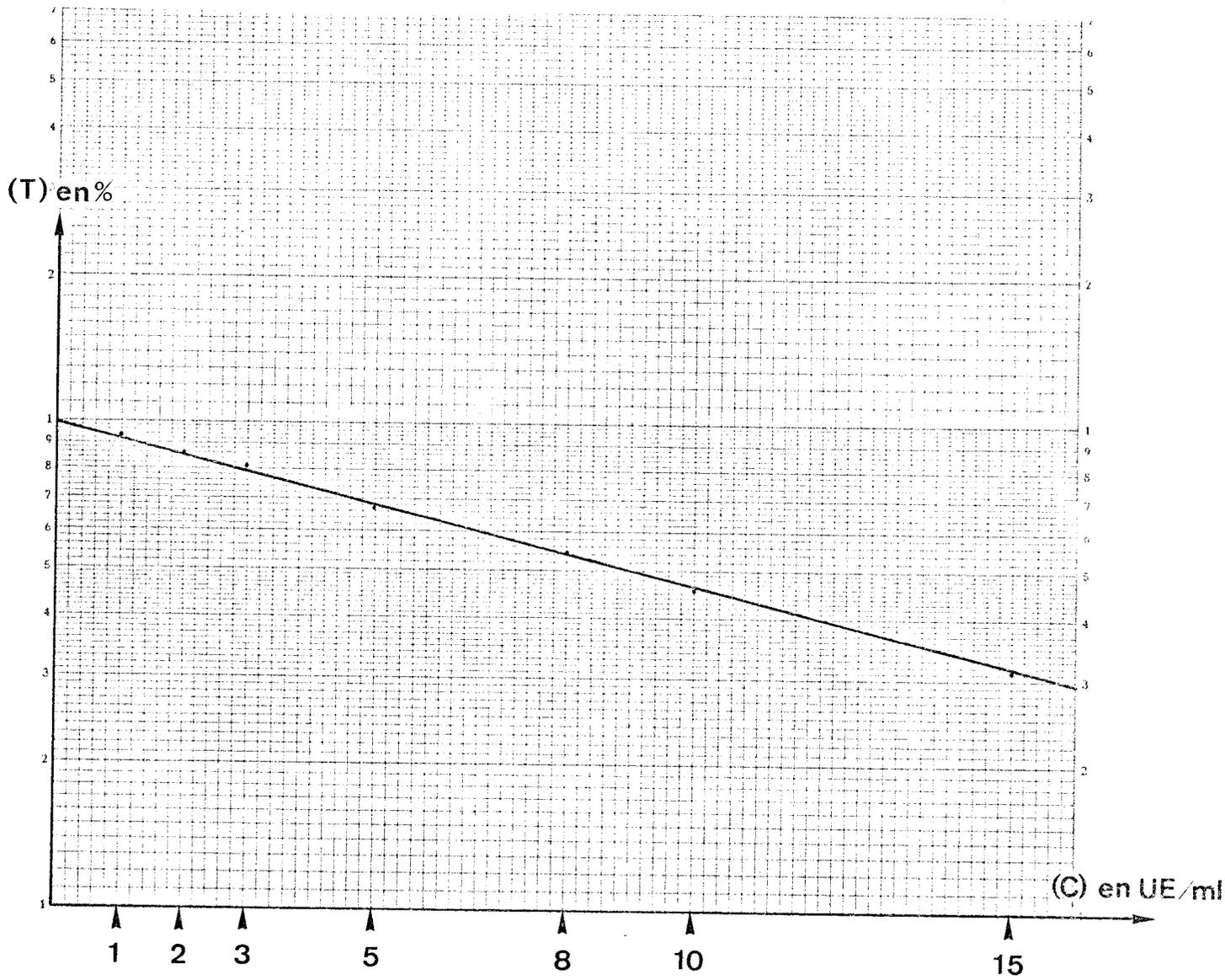


Fig. 9 : Technique automatique : mise en évidence de la relation linéaire entre transmission et concentration en asparaginase dans la zone étudiée (cf. Fig. 8).

c) Sérums humains  
 .....

Nous avons repassé en technique automatique la série de sérums humains que nous avons passés précédemment en technique semi-automatique. <sup>(fig. 1</sup> Si nous comparons les résultats obtenus par les deux techniques (tableau IV), nous constatons que l'ensemble des résultats coïncident ; nous pouvons cependant noter des différences assez sensibles entre les résultats des prélèvements effectués 3 heures et 24 heures après l'injection.

Ces différences peuvent s'expliquer assez facilement si l'on considère que les résultats obtenus avec la technique semi-automatique à partir de la courbe étalon doivent être multipliés par 50. En effet, avec cette technique les transmissions de chaque pic nous donnent par rapport à la gamme étalon, le nombre d'unités enzymatiques contenues dans 40 µl de sérum dilué dans 2 ml, tandis qu'avec la technique automatique la comparaison à la gamme étalon nous donne directement le nombre d'unités enzymatiques contenues dans 1 ml de sérum.

Temps Technique	15 min.	3 h	6 h	24 h
Semi-automatique	18,50	15,00	11,40	6,40
Automatique	18,50	13,60	11,20	5,00

Tableau IV : Comparaison du nombre d'unités enzymatiques par ml d'une série de sérums après mesure par les techniques semi-automatique et automatique.

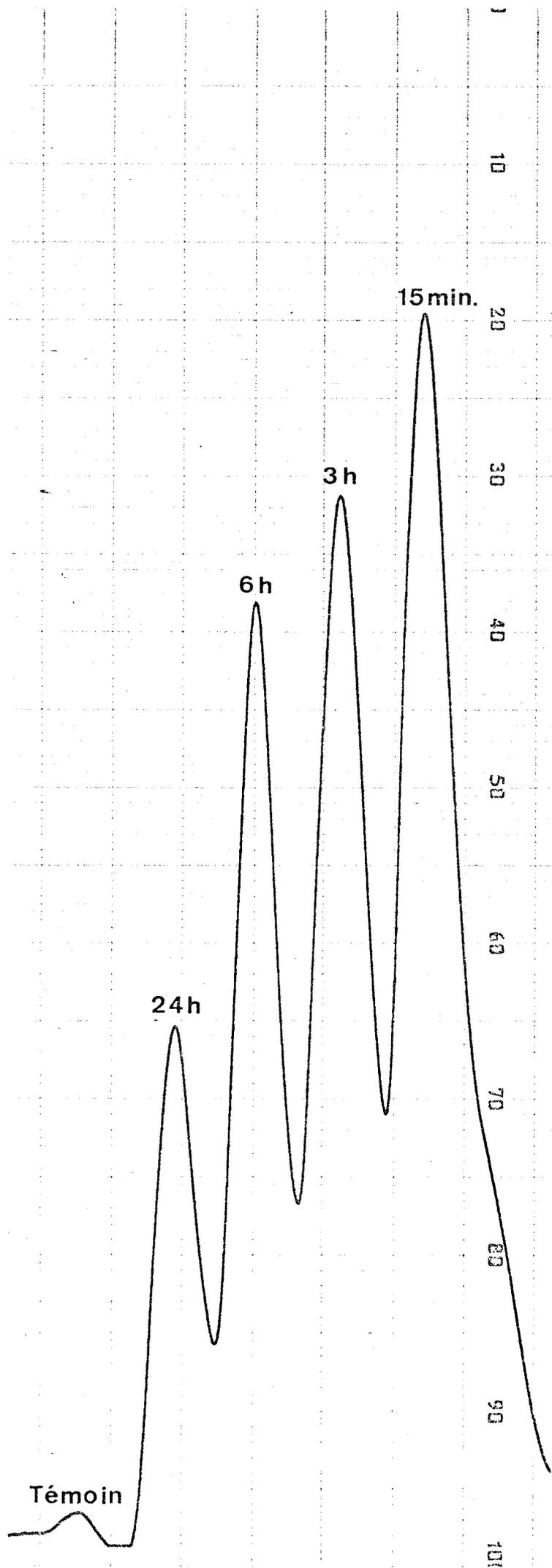


Fig. 10 : Technique automatique :  
variations en fonction du temps,  
du taux d'asparaginase circulant  
chez un sujet leucémique.



La technique automatique, qui évite toutes les manipulations pouvant être la cause d'erreurs, est donc plus précise ; si une erreur se produit lors de la réalisation de la gamme étalon, le report sur papier semi-logarithmique la fait apparaître immédiatement.

d) Fiabilité de la technique  
.....

Pour que la technique que nous venons de décrire soit utilisable, il a fallu envisager le problème de la stabilité des solutions d'asparaginase en eau physiologique et en milieu sérique.

(-) Stabilité des solutions d'asparaginases en milieu physiologique  
.....

- Solutions concentrées

. Nous avons effectué une gamme étalon à partir d'une solution d'asparaginase diluée en eau physiologique à 50 UE/ml conservée pendant 2 mois à - 80°C, puis une nouvelle gamme à partir d'une solution de même concentration fraîchement préparée. Les résultats obtenus après passage de ces deux gammes sont rassemblés dans le tableau V.

Solution d'asparaginase congelée 2 mois à -80°C	11,20	9,35	7,55	4,00	2,40
Solution d'asparaginase préparée extemporanément	10,95	9,20	7,55	4,05	2,35

Tableau V : Comparaison de deux gammes étalons réalisées à partir de deux solutions d'asparaginase à 50 UE/ml.

Il ressort de ce tableau que l'asparaginase peut se conserver assez longtemps sans dégradation de l'activité enzymatique à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Cette solution à 50 UE/ml est utilisée pour réaliser les gammes étalons.

. Pour étudier la conservation des solutions concentrées à la température du laboratoire, nous avons réalisé trois dilutions différentes d'asparaginase. La mesure de l'activité enzymatique réalisée immédiatement, puis au bout de 1 et 2 heures à la température ambiante, a donné des résultats identiques (tableau VI) qui permettent d'affirmer que l'asparaginase est stable dans ces conditions.

Activité enzymatique au bout de Solutions	0 h	1 h	2 h
1	22,0	21,0	21,5
2	52,0	51,5	52,0
3	63,5	64,5	64,0

Tableau VI : Conservation de l'activité enzymatique de solutions concentrées à la température du laboratoire.

## - Solutions diluées

Nous avons préparé trois dilutions différentes d'asparaginase à des concentrations d'environ 2,5 et 10 UE/ml que nous avons mesurées immédiatement, puis au bout de 1 et 2 heures à la température ambiante (tableau VII).

Activité enzymatique au bout de Concentrations des solutions en UE/ml	0 h	1 h	2 h
2	2,9	3,0	3,1
5	4,6	4,7	4,9
10	9,2	9,2	9,3

Tableau VII: Conservation de solutions contenant environ 2, 5 et 10 UE/ml en eau physiologique à la température du laboratoire.

(-) Stabilité des solutions d'asparaginase en milieu sérique  
.....

Nous avons vérifié que l'asparaginase contenue en quantité faible dans les sérums étudiés n'était pas dégradée pendant les heures qui suivent le prélèvement et au cours du stockage à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Des solutions contenant environ 2, 4 et 10 UE/ml ont été mesurées immédiatement, puis au bout de 1 heure 30, 2 heures 30 et 4 heures à la température du laboratoire. Les tubes de cette série ont ensuite été conservés une semaine à  $-80^{\circ}\text{C}$  (tableau VIII).

Activité enzymatique au bout de Concentrations des solutions en UE/ml	0 h	1 h 30	2 h 30	4 h	puis 1 sem. à -80°C
2	2,00	2,25	2,25	2,30	3,00
4	4,90	5,00	5,05	5,20	5,20
10	12,20	12,80	12,90	12,90	13,20

Tableau VIII : Conservation de solutions contenant environ 2, 4 et 10 UE/ml  
en milieu sérique à la température du laboratoire et à - 80°C

L'activité enzymatique de l'asparaginase en milieu sérique augmente légèrement après un séjour à la température du laboratoire. Le fait a déjà été rapporté par MAUREEN et coll. (116). Le phénomène reste pour l'instant inexpliqué.

Nous avons pu constater également que les congélations et décongélations successives entraînaient une détérioration progressive de l'activité enzymatique. Ainsi, cinq sérums ayant des activités enzymatiques de 14.0, 11.8, 10.1, 8.9 et 7.6 UE/ml ont donnés au bout de 3 mois et après plusieurs congélations et décongélations les résultats respectifs suivants : 11.7, 10.9, 10.0, 8.2 et 6.4

En conclusion, les solutions d'asparaginase concentrées qui sont utilisées pour établir les gammes étalons se conservent bien en eau physiologique à  $- 80^{\circ}\text{C}$ .

Les solutions plus faibles de taux comparables à ceux de la gamme étalon sont stables plusieurs heures à la température du laboratoire.

L'activité enzymatique des solutions peu concentrées préparées en milieu sérique augmente légèrement à la température ambiante et un peu après conservation à  $- 80^{\circ}\text{C}$ .

Les sérums étudiés peuvent être stockés à  $- 80^{\circ}\text{C}$ , il est toutefois souhaitable d'éviter les congélations et décongélations trop nombreuses.

### C) Conclusion

La technique automatique de dosage de l'asparaginase que nous avons mise au point est simple, d'utilisation facile, sensible, reproductible et fiable.

Elle permet de travailler sur des quantités de substrat très faibles de l'ordre de 0,07 ml pour notre montage, ce qui est loin d'être négligeable.

Les résultats que nous avons obtenus à partir de sérums humains et de sérums de lapins seront rapportés ultérieurement.

## C H A P I T R E I I

-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-

Etude expérimentale de l'immunisation par la L-asparaginase :  
conséquences et applications.

## I N T R O D U C T I O N

---

Dans ce chapitre, nous envisagerons successivement :

- la mise au point de techniques de mise en évidence des anticorps anti-asparaginase
- l'étude des conditions expérimentales de l'immunisation
- l'étude des anticorps anti-asparaginase.

Enfin, nous confronterons l'étude des anticorps à la cinétique d'évolution de l'asparaginasémie.

## I - MATERIEL ET METHODES

### A) Malades étudiés et animaux d'expériences

#### 1) Malades étudiés

Notre étude porte sur 49 malades atteints de leucémie aigüe (34 de type lymphoblastique (LAL) et 15 de type myéloblastique (LAM) dont le diagnostic a été basé sur les critères cytologiques et cytochimiques habituels.

La plupart ont bénéficié d'un traitement polychimiothérapique associé à de l'asparaginase S\* par voie intraveineuse en perfusions quotidiennes de 1000 UE/kg/j par cure d'une durée allant de 3 à 21 jours, selon les cas ; quelques malades ont été traités par une asparaginase CB\*\* également par voie intraveineuse selon des schémas de traitement identiques aux précédents, mais avec des doses d'enzyme de 200 UE/kg/j ; enfin, certains de ces malades ont reçu des injections d'asparaginase intrarachidienne en raison d'une localisation ménagée de la maladie.

#### 2) Animaux d'expériences

Notre expérimentation a été effectuée sur des lapins de race "fauve de Bourgogne" d'un poids moyen de 2 kg.

L'asparaginase est diluée en eau physiologique stérile à 9<sup>0</sup>/oo et injectée quelques soient les doses du traitement sous un volume de 10 ml dans la veine marginale de l'oreille.

\* Kidrolase des laboratoires Specia

\*\* Asparaginase aimablement fournie par les laboratoires Clin Byla

B) Techniques de recherche des anticorps anti-asparaginase

Les deux préparations d'asparaginase utilisées pour le traitement des malades, ainsi que pour les études immunologiques, sont des extraits purifiés à partir de cultures d'Escherichia coli ; une asparaginase extraite de Mycobacterium phlei (82) a été utilisée pour certaines études immunologiques.

La recherche des anticorps anti-asparaginase a été effectuée par quatre techniques différentes dont la mise au point a utilisé un sérum positif de référence obtenu chez le lapin (immunisation par voie sus claviculaire avec de l'asparaginase S à raison de 0,5 ml à 2000 UE/ml pour 0,5 ml d'adjuvant de Freund complet).

1) Immunodiffusion

a) Réactifs

.....

- Tampon véronal pH 8,6

. Véronal sodé		10,30 g
. Véronal		1,85 g
. Acétate de sodium		4,10 g
. Eau distillée	q.s.p.	1000 ml

Le tampon véronal est conservé à 4°C après addition de 6 ml d'azide de sodium à 10 %.

- Gélose

. Agar noble		1 g
. Solution tampon véronal		25 ml
. Eau distillée	q.s.p.	100 ml

Après dissolution au bain-marie, la gélose est répartie en tubes sous un volume de 10 ml et conservée elle aussi à 4°C.

- Solution colorante : vert de lissamine

. Vert de lissamine		3	g
. Acide acétique		150	ml
. Eau distillée	q.s.p.	1000	ml

- Solution décolorante : acide acétique à 20 % en eau distillée

b) Technique  
.....

La mise en évidence des anticorps précipitants est effectuée par une technique d'immunodiffusion selon OUCHTERLONY (137).

De la gélose tamponnée par du tampon véronal pH 8,6 est coulée sur des lames de verre dégraissées sur une épaisseur d'environ 2 mm. Les réservoirs sont réalisés à l'emporte pièce selon le schéma de la figure 11.

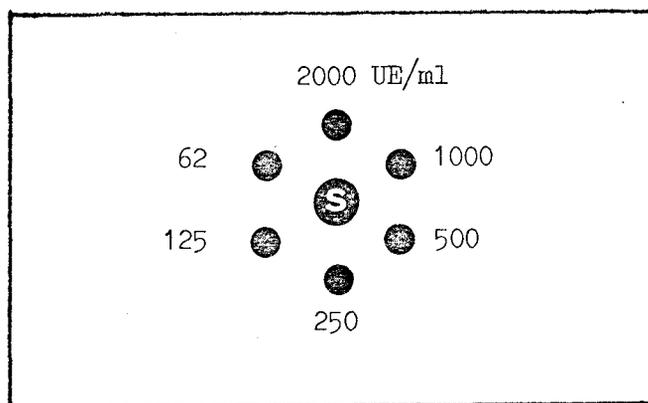


Figure 11

Disposition des réservoirs pour la réaction d'immuno-  
diffusion en gélose.

Nous avons recherché les concentrations en antigène et en anticorps qui permettent de dépister le plus sûrement possible les anticorps précipitants en utilisant un sérum de lapin positif.

Chaque sérum à étudier est testé vis-à-vis de solutions d'asparaginase comprises entre 62 et 2000 UE/ml.

Après diffusion pendant 24 heures à 4°C et 24 heures supplémentaires à la température du laboratoire si aucun arc n'est apparu, les lames sont lavées dans plusieurs bains d'eau physiologique à 9<sup>0</sup>/oo, séchées à 37°C après avoir été recouvertes de papier Joseph, puis colorées par le vert de lissamine. La décoloration s'effectue par passage dans plusieurs bains d'acide acétique.

## 2) Réaction de fixation du complément

Nous avons mis au point une microtechnique inspirée de la technique utilisée pour la mise en évidence des antigènes HL-A plaquettaires (47).

La mise au point de cette technique a posé quelques problèmes car le sérum de référence (lapin immunisé) était anticomplémentaire. Il est à noter que tous les sérums de lapin que nous avons testés par la suite étaient toujours anticomplémentaires.

Nous n'entrerons pas dans le détail des nombreux essais qu'il a fallu réaliser pour mettre au point cette technique ; nous nous contenterons de la décrire telle qu'elle est utilisée actuellement.

a) Réactifs  
.....

- Tampon de Lévine Mayer pH 7,3

## . Solution I

Chlorure de sodium		85	g
Véronal sodé		3,75	g
Eau distillée	q.s.p.	1400	ml

## . Solution II

Véronal		5,75	g
Eau distillée chaude	q.s.p.	500	ml

## . Solution III

Chlorure de magnésium ( $6H_2O$ )		2,03	g
Chlorure de calcium sec		0,33	g
Eau distillée	q.s.p.	10	ml

Mélanger les solutions I et II, laisser refroidir, puis ajouter 5 ml de la solution III.

## - Complément humain

Nous utilisons du complément humain préparé en mélangeant plusieurs sérums frais. Un titrage préalable de chaque sérum et des différentes combinaisons

possibles entre les sérums nous permet de choisir la combinaison la plus active.  
Le lot du complément est réparti en petites quantités et conservé congelé à  $-80^{\circ}$

- Globules rouges de mouton (B.D. MERIEUX)

- Sérum hémolytique antiglobule rouge de mouton (Institut Pasteur de Paris)

- Les sérums humains sont décomplémentés extemporanément par chauffage à  $56^{\circ}\text{C}$  pendant 30min.

b) Technique  
.....

Les réactifs sont distribués, au moyen d'une seringue Hamilton de 50  $\mu\text{l}$  (N° 705 pB 6001 Touzart et Matignon) délivrant 1  $\mu\text{l}$  à la fois, dans les godets d'une plaque de Terasaki (microplaques Falcon N° 3034 Block) contenant de l'huile de paraffine visqueuse (Viscosité Saybolt 335/350 Merck ou Fischer).

- Titration du complément

. 6  $\mu\text{l}$  de complément à différentes dilutions en Lévine Mayer suivant le lot

. 4  $\mu\text{l}$  de Lévine Mayer

. 1 heure d'incubation à  $37^{\circ}\text{C}$

. addition de 2  $\mu\text{l}$  de globules rouges de mouton optimalement sensibilisés de la façon suivante :

globules rouges de mouton à 2 % en Lévine Mayer + sérum hémolytique anti-globules rouges de mouton dilué au 1/1000 en Lévine Mayer volume à volume ; 1/2 d'incubation à  $37^{\circ}\text{C}$ .

- . agitation et nouvelle incubation d'une heure à 37°C
- . lecture après centrifugation des plaques

- Réaction

Les premiers résultats obtenus nous ont amené à travailler selon une table des carrés (fig.12 ). Nous avons recherché préalablement sur un témoin positif les concentrations d'antigène à utiliser.

		Dilution d'asparaginase en UE/ml							
		8000	4000	2000	1000	500	250	125	Témoin sérum
Dilution du sérum	Pur								
	1/2								
	1/4								
	1/8								
	1/16								
	Témoin antigène								

Figure12 : Concentrations d'asparaginase en UE/ml et dilutions des sérums utilisés pour la recherche des anticorps anti-asparaginase selon une table des carrés par la technique de fixation du complément.

- . 6 µl de complément humain (2 unités C' H 100)
- . 2 µl d'asparaginase (à différentes dilutions)

- . 2  $\mu$ l de sérum à étudier (  différentes dilutions)
- . 1 heure d'incubation à 37 C après agitation
- . 2  $\mu$ l de globules rouges de mouton sensibilisés (les mêmes que pour le titrage du complément)

- . 1 heure d'incubation à 37 C après agitation

Lecture après centrifugation.

Pour chaque sérum à étudier nous effectuons un témoin s m qui contient tous les réactifs, sauf l'antigène et un témoin antigène qui contient tous les réactifs, sauf le sérum. De plus nous incluons dans chaque série de sérums étudiés un témoin négatif et un témoin positif.

### 3) Hémagglutination passive au chlorure de chrome

Nous avons adapté à la recherche des anticorps anti-asparaginase la technique décrite par BEAUMONT(13).

Après avoir effectué les premiers essais en tubes, nous avons miniaturisé la technique.

#### a) Réactifs .....

- Globules rouges humains de groupe 0 prélevés sur solution anticoagulante ACD (acide citrique-citrate-dextrose) 1 volume pour 9.

- Chlorure de chrome dilué au 1/400  en eau physiologique à 9 / o

- Asparaginase S 10 mg dilués dans 1 ml d'eau physiologique à 9 / o

(1000 UE/ml environ)

- Tampon phosphate pH 7,3

. Phosphate disodique sec		10,55 g
. Phosphate monopotassique		1,10 g
. Eau distillée	q.s.p.	250 ml

- Sérums décomplémentés par chauffage 30 min. à 56°C

- Témoin positif : sérum de lapin immunisé. Les hétéroanticorps sont absorbés par un mélange volume à volume de globules rouges humains A et B lavés 3 fois.

1 ml sérum + 1 ml du mélange

24 heures à 4°C.

b) Technique  
.....

Les réactifs sont distribués à la pipette Duclos pour les volumes de 0,1 ml et à la seringue Hamilton pour les volumes plus petits. La réaction est effectuée dans des plaques à microtitration à fond en U (Eurobio).

- Préparation des différentes suspensions globulaires

\* Globules rouges chromés sensibilisés par l'asparaginase

. 0,1 ml d'asparaginase

. 0,4 ml d'eau physiologique à 9°/00

. 0,3 ml de chlorure de chrome au 1/400°

. 4 min. à 4°C

. 0,1 ml de culot de globules rouges lavés 3 fois en eau

physiologique

- . 10 min. à 4°C en agitant toutes les 2 min.
- . laver 4 fois en eau physiologique à 4°C
- . remise en suspension dans 0,8 ml d'eau physiologique

à 4°C

\* Globules rouges chromés non sensibilisés par l'asparaginase  
Ce témoin est très important.

Mêmes opérations que précédemment en remplaçant les 0,1 ml d'asparaginase par 0,1 ml d'eau physiologique.

\* Globules rouges non chromés non sensibilisés

- . 0,1 ml de globules rouges lavés
- . 0,7 ml d'eau physiologique

#### - Réaction

Les sérums sont dilués de 1/2 en 1/2 en tampon phosphate jusqu'à 1/128  
Les sérums purs et dilués au 1/2 ne sont plus utilisés car nous obtenons fréquemment de fausses réactions positives.

. 0,1 ml de chaque dilution du sérum sont répartis dans  
trois rangées

. à chaque rangée sont ajoutés respectivement 10 µl de globules rouges chromés sensibilisés, 10 µl de globules rouges chromés non sensibilisés et 10 µl de globules rouges non chromés, non sensibilisés.

Nous incorporons également à chaque série de sérum un témoin négatif et un témoin positif.

La lecture est effectuée après 1 à 2 heures, à la température du laboratoire ; les plaques sont lues à nouveau le lendemain matin, après une nuit à 4°C.

#### 4) Agglutination de particules de latex sensibilisées

Nous avons adapté la technique de SEVER et coll. (166).

##### a) Réactifs .....

- Particules de latex Difco de 0,81  $\mu$  de diamètre

- Tampon Sorensen pH 7,3

. Glycocolle 7,5 g

. Chlorure de sodium 5,8 g

. Eau distillée q.s.p. 1000 ml

- Asparaginase à 5000 UE/ml en tampon Sorensen (c'est avec cette dilution d'asparaginase que nous avons obtenu la meilleure sensibilité sur des témoins positifs).

##### b) Sensibilisation des particules de latex par l'asparaginase .....

- Laver 1 ml de suspension de latex deux fois en tampon Sorensen et reconstituer avec 1 ml de tampon

- Ajouter 1 ml de suspension d'asparaginase à 5000 UE/ml
- Incuber 45 min. à 50°C
- Laver trois fois en tampon Sorensen et reprendre par 2 ml de tampon.

Le latex sensibilisé se conserve plusieurs semaines à + 4°C.

c) Réaction  
.....

Elle est réalisée en mélangeant sur une plaque de verre, une goutte de sérum à étudier avec une goutte de suspension de latex sensibilisé.

Il est possible d'effectuer un titrage des anticorps en travaillant sur des dilutions de sérum.

C) Techniques diverses de surveillance hématologique des animaux d'expérience

1) Nuération des globules blancs, des globules rouges, de l'hémoglobine et de l'hématocrite

Le prélèvement est effectué directement à l'oreille avec une pipette à un trait de 44,7 µl. Le sang est dilué immédiatement dans 10 ml de liquide isotonique (Isoton de chez Coultronics).

Les mesures sont réalisées sur un Counter Coulter modèle S.

2) Formules sanguines

Le frottis est réalisé à partir d'une goutte de sang prélevé à l'oreille puis coloré après séchage, selon la coloration panoptique classique de May Gründ-

wald Giemsa. L'établissement de la formule est fait selon la classification habituelle des globules blancs du lapin (55, 79 ).

### 3) Dosage du fibrinogène

Le sang est recueilli sur citrate de sodium à 3,8 % à raison de 1,7 ml pour 0,3 ml d'anticoagulant.

Le dosage du fibrinogène a été effectué par une microtechnique basée sur la mesure du temps de thrombine concentrée (Fibriprest des laboratoires Stago).

## II - RESULTATS

### A) Mise en évidence et cinétique d'apparition des anticorps anti-asparaginase

#### 1) Expériences préliminaires chez le lapin

##### a) Première série .....

Nous avons injecté à trois lapins n'ayant jamais subi aucun traitement de l'asparaginase S par voie intraveineuse à raison de 500 UE/kg sous un volume de 10 ml pendant trois jours consécutifs.

Un de nos lapins (N° 1-3 ) a présenté dès les premières injections un "choc d'intolérance" se manifestant par une hypersialorrhée et par une dyspnée avec polypnée ; ce lapin est mort dans le courant de la nuit suivante.

Chez les deux lapins survivants, des prélèvements de sang total ont été effectués toutes les semaines en vue de la recherche des anticorps précipi-

tants anti-asparaginase par une technique d'immunodiffusion décrite précédemment.

Les anticorps sont apparus chez les deux lapins entre les 16ème et 25ème jours qui ont suivi le début des injections. Ces anticorps de faible titre donnant un arc de précipitation peu intense ont disparu par la suite rapidement.

Les modalités du traitement et les résultats obtenus au cours de cette expérience sont rassemblés dans le tableau IX.

Il apparaît que l'asparaginase utilisée chez le lapin aux doses de 500 UE/kg semble donc présenter une certaine toxicité. En effet, un lapin sur trois a présenté quelques heures après la première injection des troubles entraînant la mort dans les 24 heures qui ont suivie.

Une cure de trois injections de 500 UE/kg entraîne la formation d'anticorps précipitants fugaces de faible titre.

La répétition des cures favorise-t-elle l'immunisation ?

b) Deuxième série  
.....

Dans cette série de quatre lapins, nous avons repris le schéma de traitement de la série précédente auquel nous avons ajouté une nouvelle cure de trois injections, quinze jours après le début de la première cure (tableau X).

Deux lapins sur quatre, soit la moitié, sont morts le deuxième et troisième jour de la première cure ce qui confirme à ces doses la toxicité de l'asparaginase chez le lapin ; notons que cette mortalité semble répondre à une loi du tout ou rien, les lapins survivants ne manifestant plus de chocs par la suite.

Jours	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40			
Injections 500 UE/kg		+	+	+																																								
Prélèvements		+																																										
Lapin 1-1		-																																										
Lapin 1-2		-																																										
Lapin 1-3		-																																										

M\*: mort      Tableau IX : Recherche des anticorps anti-asparaginase par immunodiffusion chez le lapin après une

/// : recherche positive      cure de trois injections à 500 UE/kg/j par voie intraveineuse. (1ère série)



Jours	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40				
Injections 500 UE/kg		+	+	+													+	+	+																										
Prélèvements		+								+																																			
Lapin 2-1		-																																											
Lapin 2-2		-																																											
Lapin 2-3																																													
Lapin 2-4																																													

Tableau X : Recherche des anticorps anti-asparaginase par immunodiffusion chez

le lapin après deux cures de 3 injections à 500 UE/kg/j par voie intraveineuse espacées de quinze jours. (2ème série)

M\* : mort

//// : recherche positive



La recherche des anticorps précipitants chez les deux lapins survivant fait apparaître que les arcs de précipitation obtenus sont plus intenses que dans la première série. Les anticorps persistent et leur intensité augmente même dans les jours qui suivent leur mise en évidence (fig. 13, 14, 15).

Il faut remarquer aussi que les anticorps n'ont pas été recherchés entre le 19ème et le 25ème jour ; il est probable que des recherches plus fréquentes auraient mis en évidence une apparition plus rapide des anticorps. En effet, le 26ème jour nous avons dépisté des anticorps précipitants déjà très puissants.

La répétition des cures semble donc favoriser l'immunisation à moins qu'il ne s'agisse que d'un problème de nombre d'injections.

#### c) Troisième série .....

Nous pouvons diviser cette troisième série en deux groupes ; d'une part nous avons pris à nouveau les deux lapins de la première série et d'autre part trois nouveaux lapins. Tous ont reçu 6 injections de 500 UE/kg espacées sur 10 jours (tableau XI).

Nous avons voulu savoir comment réagissaient les lapins à 6 injections rapprochées et comparer en même temps le comportement de lapins ayant déjà fabriqué des anticorps 1 mois au préalable, mais n'en possédant plus, par rapport à des lapins neufs.

La recherche des anticorps effectuée tous les trois ou quatre jours montre que l'ensemble des lapins s'immunise plus rapidement que dans les séries

Jours	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40			
Injections 500 UE/kg		+	+	+			+	+	+																																			
Prélèvements		+		+					+					+																														
Suite 2 <sup>o</sup> série 57j après début de la 1 <sup>o</sup>																																												
Lapin 1-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Lapin 1-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Lapin 3-1	-		M*																																									
Lapin 3-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lapin 3-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

M\* : mort

/// : recherche  
positive

Tableau XI: Recherche des anticorps anti-asparaginase par immunodiffusion, chez des lapins ayant déjà fabriqué des anticorps fugaces et chez des lapins dont c'est la première cure, après 6 injections rapprochées de 500 UE/kg/j (suite de la 1<sup>ère</sup> série et 3<sup>ème</sup> série).



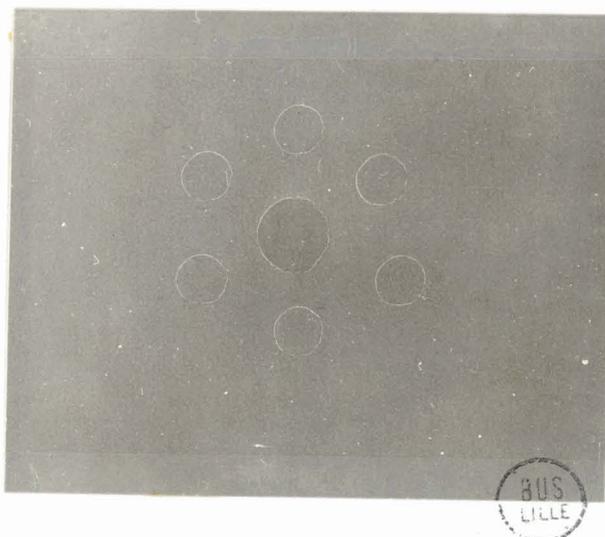


Figure 13 : Recherche des anticorps anti-asparaginase par immunodiffusion (lapin 2-1) effectuée le 15ème jour après le début du traitement.

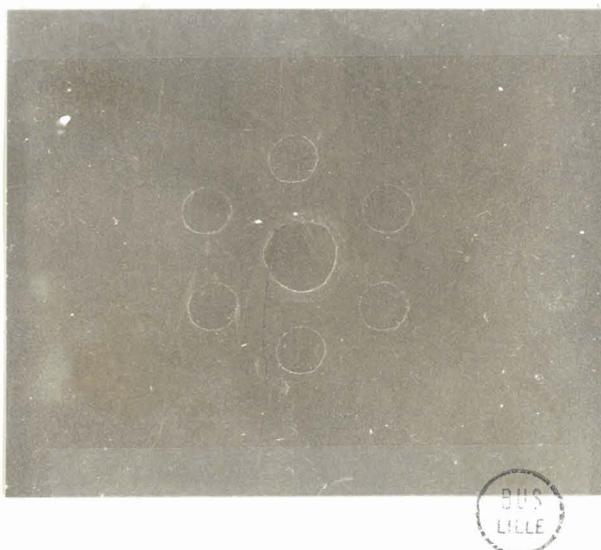


Figure 14 : idem, 26ème jour soit 8 jours après la fin du second traitement.

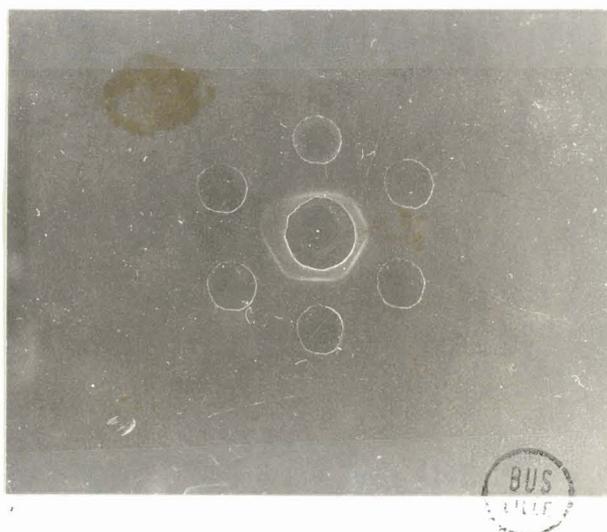


Figure 15 : idem, 32ème jour soit 13 jours après la fin du second traitement.

précédentes ; tous les lapins sont immunisés le 14ème jour. Cette immunisation est importante et durable. De plus, les lapins ayant déjà été préalablement traités s'immunisent encore plus rapidement et plus fortement que ceux dont c'est la première cure (fig. 16, 17, 18).

De ces expériences préliminaires, il est donc possible de conclure que le traitement par l'asparaginase injectée par voie intraveineuse à raison de 500 UE/kg provoque chez le lapin une immunisation avec apparition d'anticorps précipitants de façon constante.

Il semble que la répétition des injections et des cures favorise la vitesse et l'intensité de l'immunisation.

## 2) Influence d'un traitement au long cours par différentes doses d'asparaginase chez le lapin

Nous avons démontré précédemment que l'asparaginase était immunogène ; toutefois, certains auteurs lui attribuent aussi un pouvoir immunosuppresseur. En particulier KHAN et coll<sup>(92)</sup> ont montré chez le lapin que l'asparaginase injectée par voie intraveineuse à des doses supérieures à 200 UE/kg pendant 21 jours n'entraînait plus la formation d'anticorps anti-asparaginase.

Nous avons repris cette expérience dont la signification pourrait être importante puisqu'elle tendrait à démontrer que suivant les doses injectées l'asparaginase peut être considérée, soit comme un antigène, soit comme un immunosuppresseur, ce qui serait tout à fait original.



Figure 16 : Recherche des anticorps anti-asparaginase par immunodiffusion (lapin 1-1) effectuée le 17ème jour après le début du traitement (2ème immunisation).

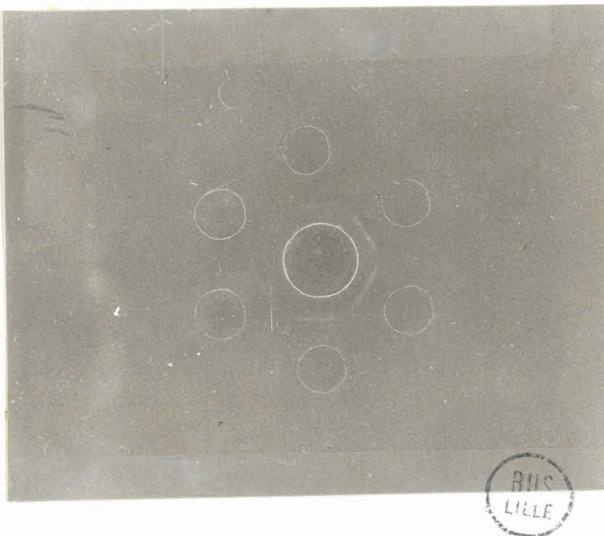


Figure 17 : Recherche des anticorps anti-asparaginase par immunodiffusion (lapin 3-3) effectuée le 17ème jour après le début du traitement (1ère immunisation).

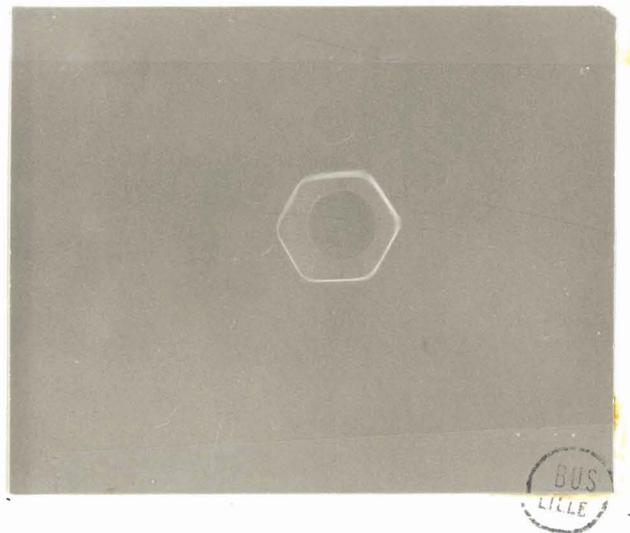


Figure 18 : Recherche des anticorps anti-asparaginase par immunodiffusion (lapin 3-3) effectuée 2 mois après le début du traitement (1ère immunisation).

Nous avons pris pour cette expérience 25 lapins dont 5 lapins témoins ne recevant pas d'asparaginase. Les 20 lapins restants ont été divisés en trois séries : 10 lapins pour la série A, 5 lapins pour la série B et 5 lapins pour la série C ; ces lapins ont été traités respectivement par des doses de 500 (série A), 100 (série B) et 10 UE/kg (série C). Les lapins des trois séries ont reçu 16 injections par voie intraveineuse étalées sur 18 jours, ce qui peut être considéré comme un traitement continu.

Les anticorps anti-asparaginase ont été recherchés par trois techniques différentes : immunodiffusion selon OUCHTERLONY - réaction d'hémagglutination passive au  $\text{CrCl}_3$  - réaction d'agglutination de particules de latex sensibilisées par de l'asparaginase

a) Recherche des anticorps anti-asparaginase par différentes techniques  
.....

↳ Recherche des anticorps anti-asparaginase par immunodiffusion en gélose

Les dates des injections, des prélèvements et des résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau XII.

. Si l'on considère les lapins de la série A (lapins recevant 500 UE/kg), notons d'abord qu'une forte mortalité survient après la seconde et la troisième injection, en effet la moitié des lapins de cette série sont morts ( $A_1, A_2, A_3, A_4, A_5$ ). Ceci confirme les résultats que nous avons pu observés précédemment pour des doses identiques. Deux autres lapins sont morts dans cette série, beaucoup plus tard ; l'un d'entre eux après la mise en évidence d'anticorps.

Jours	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40							
Injections		+	+	+	+	+		+	+	+	+				+	+	+	+	+																													
Prélèvements		+						+			+										+		+																									
A <sub>1</sub>		-																																														
A <sub>2</sub>		-						M*																																								
A <sub>3</sub>		-						M*																																								
A <sub>4</sub>		-						M*																																								
A <sub>5</sub>		-						M*																																								
A <sub>6</sub>		-						-			-																																					
A <sub>7</sub>		-						-			-								M*			M*																										
A <sub>8</sub>		-						-			-																																					
A <sub>9</sub>		-						-			-																																					
A <sub>10</sub>		-						-			-																																					
B <sub>1</sub>		-						-			-																																					
B <sub>2</sub>		-						-			-																																					
B <sub>3</sub>		-						-			-																																					
B <sub>4</sub>		-						-			-																																					
B <sub>5</sub>		-						-			-																																					
C <sub>1</sub>		-						-			-																																					
C <sub>2</sub>		-						-			-																																					
C <sub>3</sub>		-						-			-																																					
C <sub>4</sub>		-						-			-																																					
C <sub>5</sub>		-						-			-																																					

3111  
2111  
2111

M\* : mort

NF\* : non fait

//// : recherche positive

Tableau XII : Schéma de traitement et recherche des anticorps précipitants en immunodiffusion chez trois séries de lapin A, B et C recevant respectivement des injections de 500, 100 et 10 UE/kg.

En ce qui concerne l'immunisation, les anticorps précipitants ne sont pas révélés en immunodiffusion pendant le traitement. Les anticorps apparaissent 6 jours après la fin du traitement chez un lapin et 13 jours après chez les deux autres. Un lapin sur quatre n'a pas fabriqué d'anticorps précipitants

Après un traitement long par des doses élevées, l'immunisation n'apparaît pas constante, les anticorps précipitants sont révélés tardivement par immunodiffusion après la fin du traitement.

. Dans la série B (lapins recevant 100 UE/kg), nous ne retrouvons plus la mortalité de début de traitement. Deux lapins sont morts en cours d'expérience d'infections intercurrentes dans des conditions identiques à celles observées dans la série témoin.

Chez un lapin, l'immunisation est dépistée le jour de la dernière injection, donc en cours de traitement. Trois jours après la fin des injections, la moitié des lapins est immunisée. Treize jours après l'arrêt des injections, tous les lapins survivants possèdent dans leur sérum des anticorps précipitants.

L'immunisation aux doses de 100 UE/kg est constante. L'asparaginase semble plus immunogène à cette dose, car la moitié des lapins s'immunisent juste après l'arrêt du traitement.

. Enfin dans la série C (lapins recevant 10 UE/kg), les anticorps apparaissent encore plus rapidement. Dès le 11ème jour après le début des injections, un lapin est immunisé ; quatre lapins sur cinq possèdent des anticorps sériques alors que le traitement n'est pas terminé, soit avant le 18ème jour.

Les anticorps sont apparus juste après la fin du traitement chez le dernier.

L'immunisation aux doses de 10 UE/kg est donc constante, rapide et survient pendant le traitement.

Bien que ces résultats soient relatifs à des séries d'animaux peu importantes, d'autant plus que la mortalité n'est pas négligeable, il apparaît néanmoins assez nettement que pour des traitements longs et continus, les anticorps précipitants apparaissent d'autant plus rapidement que les doses d'antigène injecté sont faibles (fig. 19 ).

A une exception près l'immunisation est constante.

- Recherche des anticorps anti-asparaginase par hémagglutination passive au  $\text{CrCl}_3$

La vitesse d'apparition des anticorps dans les séries A et B est assez comparable. Dans ces deux séries, la moitié des lapins sont immunisés le jour de la dernière injection et les trois quarts 3 jours après l'arrêt du traitement.

Tous les lapins de la série A se sont immunisés.

La recherche des anticorps n'a pas pu être poursuivie chez le lapin B<sub>1</sub> qui est mort alors que la réaction de précipitation en gélose était toujours négative.

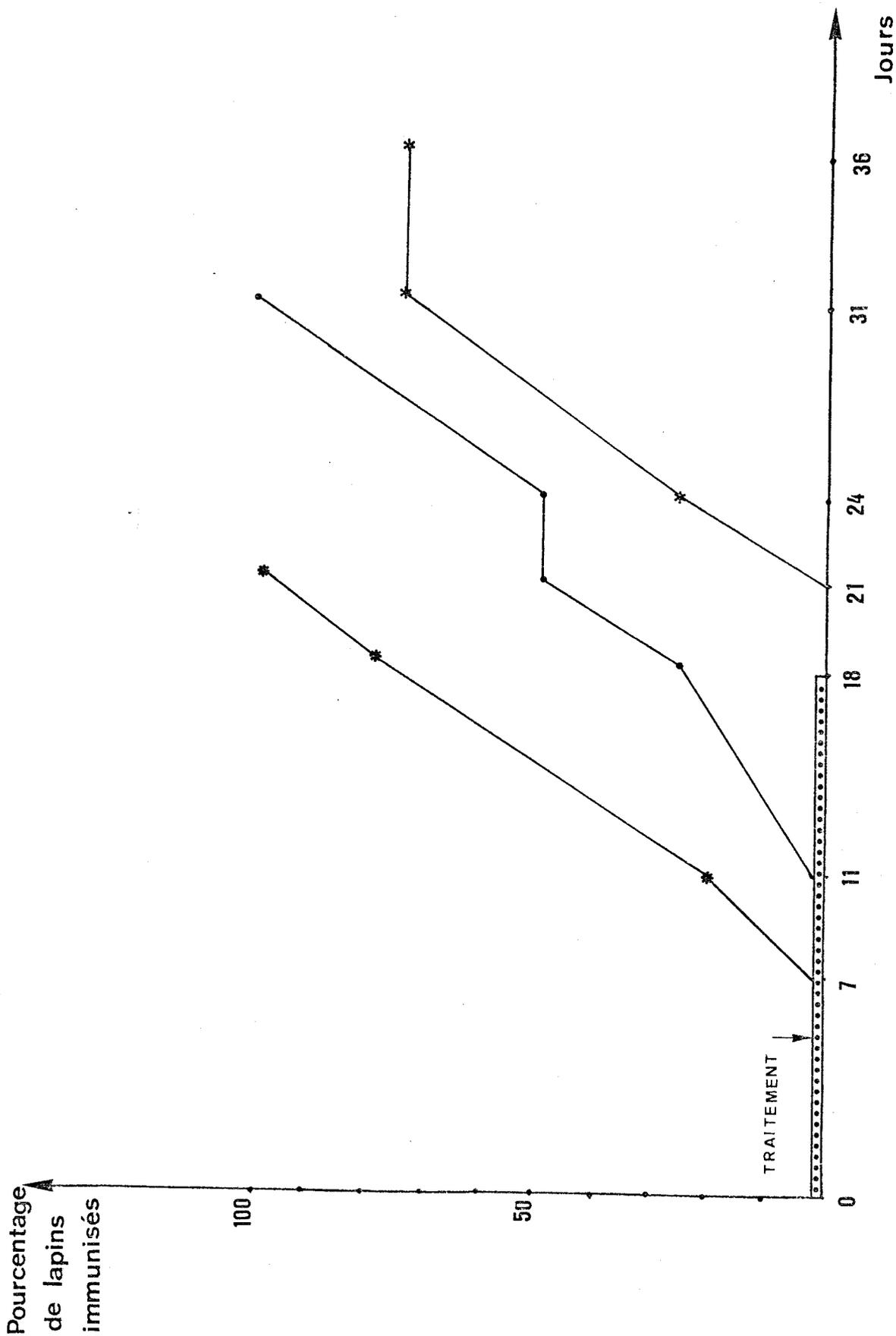


Figure 19 : Pourcentage de lapins immunisés possédant des anticorps précipitants dans les séries A (\*), B (•) et C (#) en fonction du temps.



Dans la série C, l'immunisation est constante et plus précoce que dans les autres séries ; en effet deux lapins sur cinq sont déjà immunisés dès le 11<sup>ème</sup> jour. Tous les lapins de cette série possèdent des anticorps avant la fin du traitement (tableau XIII).

La recherche des anticorps par cette technique, peut-être plus sensible puisque des anticorps sont dépistés plus précocement, confirme cependant en partie les résultats précédents : l'immunisation est constante, plus rapide pour les doses faibles (série C), par contre nous ne retrouvons plus de différences significatives entre les résultats de la série A et de la série B.

Si l'on compare la rapidité d'apparition des anticorps par l'une et l'autre technique (tableaux XII et XIII), nous constatons qu'il existe une certaine concordance entre les résultats.

- Recherche des anticorps anti-asparaginase par agglutination de particules de latex sensibilisées par l'asparaginase

Si l'on observe les résultats rassemblés dans le tableau XIV, nous constatons immédiatement que la distinction précédemment observée avec les autres techniques en ce qui concerne la rapidité et l'intensité de l'immunisation n'apparaît plus.

Nous pouvons toutefois remarquer qu'il semble que le titre des anticorps atteint un taux maximum quelques soient les séries, le 21<sup>ème</sup> jour après le début du traitement, soit 3 jours après l'arrêt de celui-ci. Le titre des anticorps diminue par la suite. (fig. 20)

Jours	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40						
Injections		+	+	+	+	+		+	+	+	+			+	+	+	+	+																													
Prélèvements	+						+				+								+		+											+									+						
A <sub>1</sub>								M*																																							
A <sub>2</sub>								M*																																							
A <sub>3</sub>								M*																																							
A <sub>4</sub>								M*																																							
A <sub>5</sub>								M*																																							
A <sub>6</sub>																																															
A <sub>7</sub>																																															
A <sub>8</sub>																																															
A <sub>9</sub>																																															
A <sub>10</sub>																																															
B <sub>1</sub>																																															
B <sub>2</sub>																																															
B <sub>3</sub>																																															
B <sub>4</sub>																																															
B <sub>5</sub>																																															
C <sub>1</sub>																																															
C <sub>2</sub>																																															
C <sub>3</sub>																																															
C <sub>4</sub>																																															
C <sub>5</sub>																																															

M\* : mort

/// : recherche positive

Tableau XIII : Schéma de traitement et recherche des anticorps anti-asparaginase par réaction d'agglutination passive au CrCl<sub>3</sub> chez trois séries de lapin A, B et C recevant respectivement des injections de 500, 100 et 10 UE/kg.





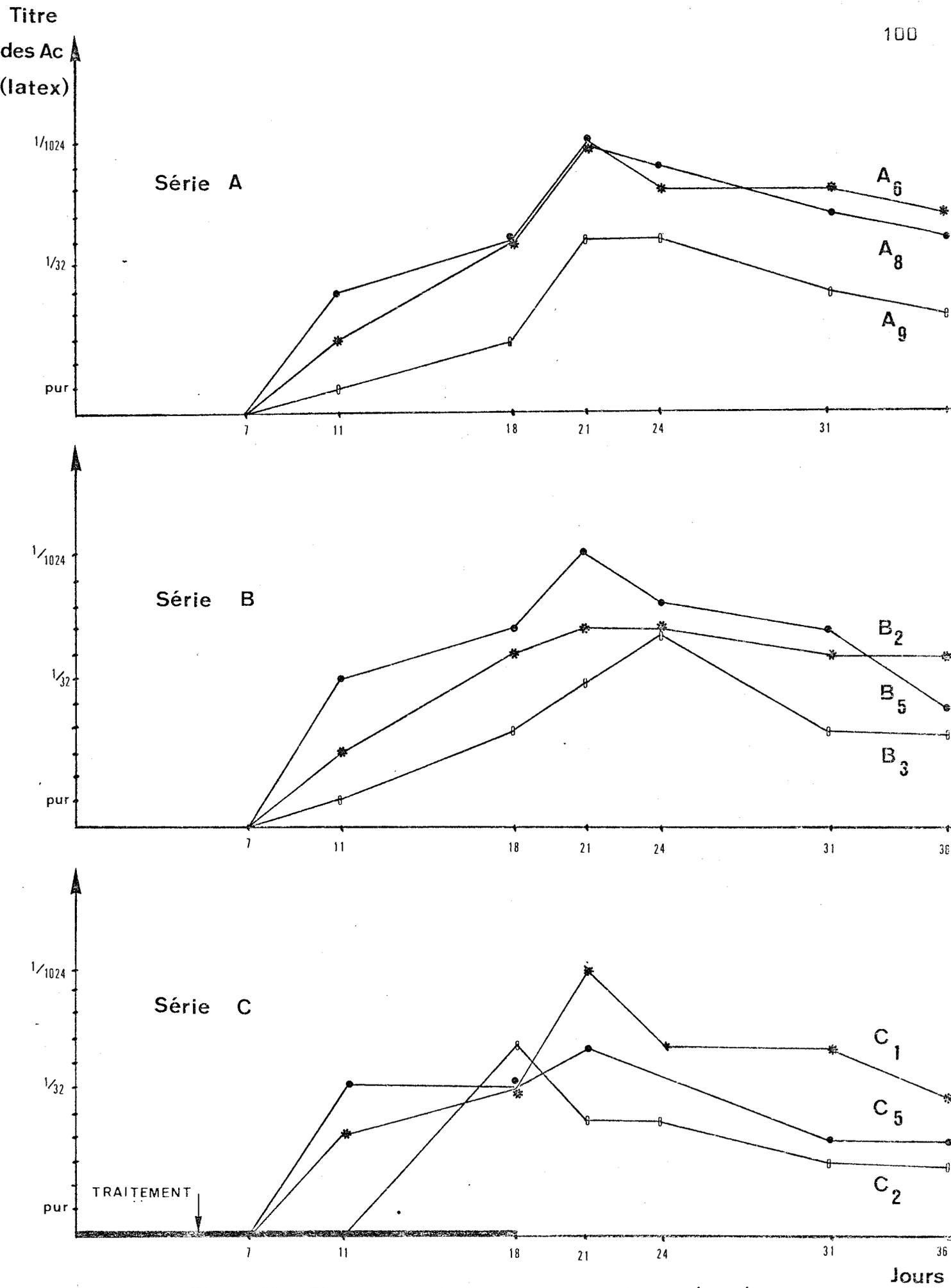


Figure 20 : Titre des anticorps anti-asparaginase dépistés par agglutination de particules de latex en fonction du temps dans les séries A, B et C.



Il est donc possible que cette technique rapide qui dépiste l'immunisation d'une façon précoce (11ème jour) mette en évidence des anticorps de nature différente de ceux mis en évidence par les deux techniques précédentes.

En conclusion, si l'on admet que l'asparaginase est un immunosuppresseur comme cela a été démontré par de nombreux auteurs, il faut admettre aussi que cette immunosuppression ne s'exerce pas vis-à-vis de tous les anticorps. En effet, les résultats obtenus par immunodiffusion en gélose et par agglutination passive au  $\text{CrCl}_3$  plaident en faveur de l'effet immunosuppresseur mais l'agglutination des particules de latex qui révèle certainement des anticorps de nature différente s'y oppose.

Quoiqu'il en soit, il ressort de l'étude expérimentale de l'effet immunogène de l'asparaginase effectuée chez le lapin que l'asparaginase est quelques soient les doses injectées un antigène puissant, ce qui n'est pas surprenant si l'on considère qu'il s'agit d'une molécule protéique de poids moléculaire élevé.

b) Surveillance biologique des lapins traités par l'asparaginase  
 .....

Cette surveillance a porté uniquement sur quelques données précises dont on pouvait penser d'après l'expérience d'autres auteurs qu'elles donneraient lieu à des modifications plus ou moins significatives.

- Comportement, état général et poids des animaux

. Nous avons vu antérieurement qu'il existe manifestement une tolérance individuelle inexpliquée des lapins puisque à fortes doses, on observe une mortalité importante touchant 50 % environ des animaux.

. Les troubles de l'état général observés sont en corrélation avec l'importance des doses injectées. Ils sont essentiellement caractérisés par la survenue précoce (dès les 3 premiers jours) d'une anorexie quasi totale pour les fortes doses. Celle-ci dure pendant presque toute la durée du traitement et est responsable d'une perte de poids assez importante chez le lapin soumis à des injections quotidiennes pendant 18 jours. On peut ainsi estimer que cette perte de poids a été en moyenne de 25 % pour les animaux recevant des fortes doses (500 UE/kg) et des doses moyennes (100 UE/kg) mais par contre chez les lapins traités par des faibles doses, le poids reste stable après parfois un léger amaigrissement en début de traitement ; cependant, il faut noter que les lapins témoins ont dans le même temps eu un gain de poids de + 7,5 %.

- Retentissement hématopoïétique

La surveillance des données de l'hémogramme des animaux nous a paru justifiée par le fait que les cellules hématopoïétiques sont parmi celles de l'organisme dont la division est la plus active.

. Etude de l'hématocrite

Bien que les numérations de globules rouges nous aient donné des résultats comparables à ceux de l'hématocrite, nous avons préféré nous

baser sur les résultats de l'hématocrite beaucoup moins sujets à des causes d'erreurs.

Si nous comparons la moyenne de l'hématocrite de chaque série A, B et C par rapport à la série témoin (T) qui a subi des prélèvements identiques aux autres séries mais qui n'a pas reçu d'injections d'asparaginase, nous constatons comme l'indique le tableau XV que plus les doses d'asparaginase injectées sont élevées, plus le pourcentage de diminution de l'hématocrite est important.

Séries	Début de traitement	Fin de traitement	Pourcentage de diminution
T	33,0	33,4	Pas de changement
A	32,6	20,6	- 37 %
B	37,2	27,3	- 27 %
C	33,9	26,9	- 20 %

Tableau XV : Comparaison de la moyenne de l'hématocrite dans les différentes séries en début et en fin de traitement par l'asparaginase

Les injections d'asparaginase semblent donc inhiber l'érythropoïèse dans les conditions d'expérience, celle-ci est pourtant stimulée par les prélèvements répétés.

. Etude de la numération des globules blancs

Le nombre normal des globules blancs du lapin est très variable suivant les animaux. Ainsi les chiffres varient dans les prélèvements témoins entre 5000 et 14 000 par  $\text{mm}^3$ . Les variations observées en cours de traitement dans les différentes séries ne sont pas significatives et restent situées dans les normes.

. Examen de la formule sanguine

Nous n'avons pas observé de modifications significatives consécutives au traitement par l'asparaginase à différentes doses.

Nous avons pu constater toutefois les modifications des globules rouges habituelles après spoliations sanguines répétées : anisocytose avec poikilocytose accompagnée d'une hypochromie avec polychromatophilie.

De plus, sur les frottis effectués en fin de traitement, nous avons rencontré assez souvent un faible pourcentage de cellules "lymphoïdes" hyperbasophiles qui peuvent être le témoin des stimulations antigéniques auxquelles les lapins ont été soumis.

- Modifications de la synthèse des protéines

. Etude du taux de fibrinogène

Comme pour les numérations des globules blancs, les taux de fibrinogène chez le lapin sont variables suivant les animaux et sont compris par exemple dans les prélèvements témoins entre 2,30 et 7,25 g/l.

Les modifications observées aussi bien dans la série témoin n'ayant pas reçu d'injections d'asparaginase que dans les autres séries ayant été traitées, ne permettent pas de conclure à une augmentation ou à une diminution de la synthèse du fibrinogène pendant le traitement.

#### . Electrophorèse sur acétate de cellulose

Les résultats ont été acquis chez les lapins de la 3ème série. Rappelons que cette série est constituée pour les lapins ayant survécu jusqu'à la fin du traitement de deux lapins témoins (3-4, 3-5), de deux lapins dont c'était la première cure (3-2, 3-3) et de deux autres lapins ayant déjà fabriqué des anticorps précipitants mais n'en possédant plus dans leurs sérums (1-1, 1-2). Les quatre lapins ont été traités par six injections de 500 UE/kg espacées sur 9 jours.

Les prélèvements ont été effectués au jour 0 de l'expérience c'est-à-dire avant le début des injections pour les lapins traités ; au jour 8, ce qui correspond à la fin du traitement et au jour 17, soit un peu plus d'une semaine après la fin des injections.

Sur chacun des prélèvements, nous avons déterminé la protidémie sérique et le taux des différentes fractions électrophorétiques chez les lapins témoins et les lapins traités (tableaux XVI, XVII).

Lapins témoins		Jour 0	Jour 7	Jour 17
Lapin 3-4	P.T.*	5.60	5.70	pas de prélèvement
	alb.**	3.83	3.64	
	$\alpha_1$	0.28	0.34	
	$\alpha_2$	0.22	0.22	
	$\beta^2$	0.44	0.62	
	$\gamma$	0.81	0.85	
Lapin 3-5	P.T.	5.40	5.40	5.30
	alb	3.64	3.18	3.12
	$\alpha_1$	0.37	0.45	0.39
	$\alpha_2$	0.24	0.48	0.29
	$\beta^2$	0.54	0.75	0.79
	$\gamma$	0.59	0.51	0.68

Tableau XVI : Etude des modifications des protéines sériques  
et des différentes fractions électrophorétiques  
chez les lapins non traités

\* : protéines totales

\*\* : albumine



Lapins traités par l'asparaginase		Jour 0	Jour 7	Jour 17
Lapin 3-2	P.T*	5.20	4.30	5.30
	alb**	3.32	2.70	2.99
	$\alpha_1$	0.33	0.32	0.37
	$\alpha_2$	0.23	0.23	0.34
	$\beta^2$	0.54	0.51	0.87
	$\gamma$	0.75	0.51	0.71
Lapin 3-3	P.T.	5.20	4.10	5.30
	alb	3.48	2.43	3.20
	$\alpha_1$	0.28	0.34	0.34
	$\alpha_2$	0.18	0.26	0.18
	$\beta^2$	0.78	0.63	0.87
	$\gamma$	0.46	0.41	0.68
Lapin 1-1	P.T.	6.30	3.50	7.10
	alb	3.96	2.20	3.97
	$\alpha_1$	0.40	0.22	0.49
	$\alpha_2$	0.28	0.10	0.28
	$\beta^2$	0.75	0.45	1.13
	$\gamma$	0.88	0.50	1.20
Lapin 1-2	P.T.	6.30	4.60	6.20
	alb	4.12	2.71	2.97
	$\alpha_1$	0.34	0.36	0.52
	$\alpha_2$	0.22	0.13	0.27
	$\beta^2$	0.69	0.78	1.14
	$\gamma$	0.91	0.59	1.27

Tableau XVII : Etude des modifications des protéines sériques et des différentes fractions électrophorétiques chez les lapins traités.

\* : protéines totales

\*\* : albumine



L'analyse comparée des résultats permet de constater les modifications suivantes (fig. 21) : il existe de façon nette une diminution du taux des protéines sériques chez les lapins traités, avec récupération progressive après l'arrêt du traitement ; cette diminution porte essentiellement sur les fractions albumine et  $\gamma$ -globulinique tandis que les fractions  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  et  $\beta$  ne sont pratiquement pas touchées.

L'asparaginase semble donc induire une diminution de la synthèse des protéines sériques touchant de façon préférentielle les protéines migrant dans les zones albumine et  $\gamma$ -globulinique.

3) Recherche des anticorps anti-asparaginase chez les malades leucémiques traités par l'asparaginase et étude des conditions d'apparition de ceux-ci

a) Recherche des anticorps par différentes techniques  
.....

Chez les 49 malades étudiés, 14 se sont avérés porteurs d'anticorps anti-asparaginase.

L'ensemble des résultats positifs est rassemblé dans le tableau XVIII.

- Immunodiffusion en gélose

Dans 6 cas sur 14, nous avons pu mettre en évidence des anticorps précipitants dont la présence pouvait être confirmée par au moins deux des trois autres techniques utilisées. Leur révélation est souvent gênée par la présence d'une hyperlipidémie sérique induite par l'asparaginase.

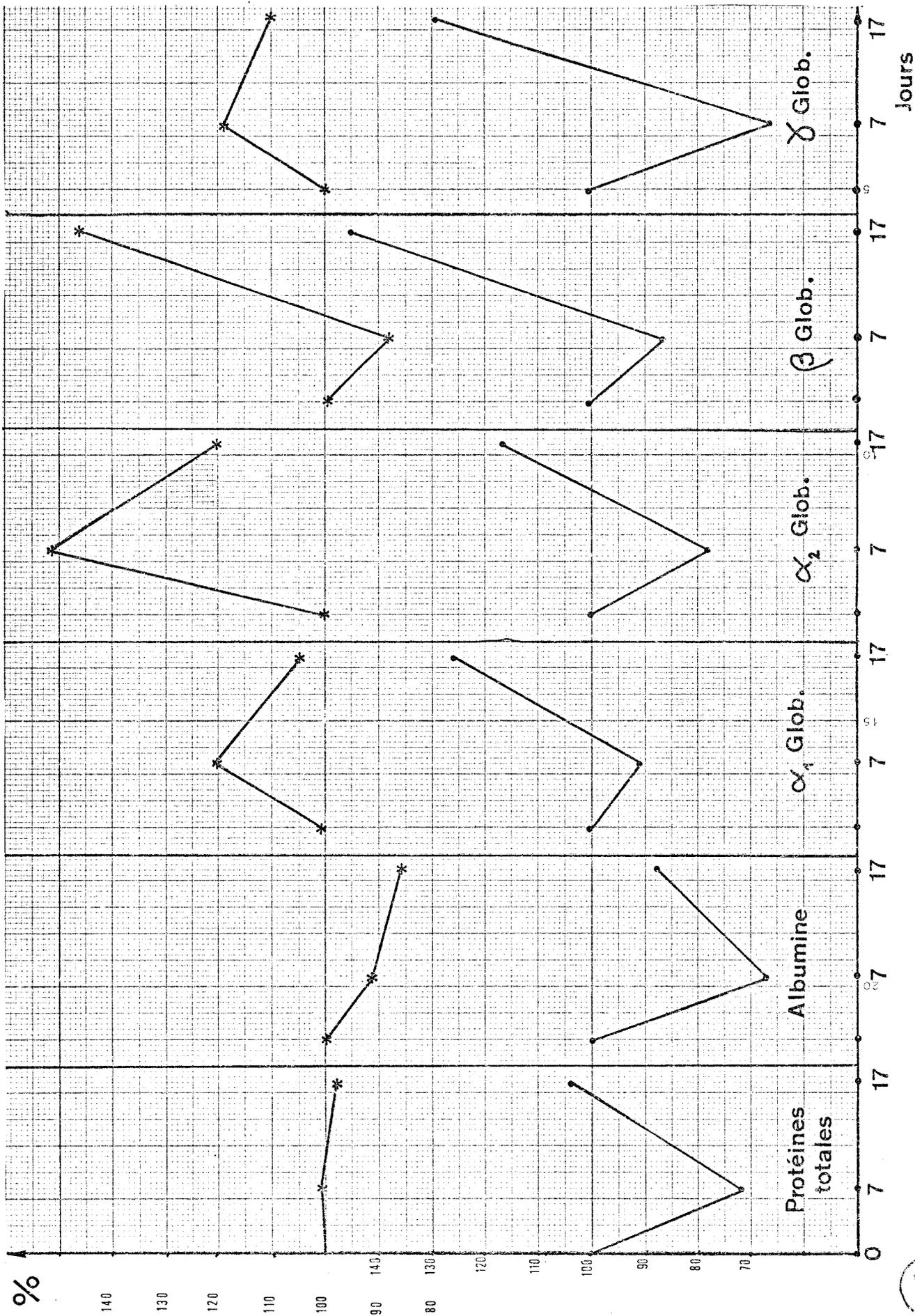


Figure 21 : Etude des modifications des protéines sériques et des différentes fractions électrophorétiques chez les lapins traités (---\*) et témoins (—●—).



	Immunodiffusion	Fixation du complément	Hémagglutination passive	Agglutination passive (latex)
1 - AS.. Gilbert	-	-	+ 1/64	NT*
2 - DE.. Pierre (CA)	-	-	+ 1/64	NT
3 - DU.. Pierre	+	+ 1/16	+ 1/64	NT
4 - DU Antoine (CA)	+	Anti C'***	+ 1/128	+ 1/1000
5 - FL.. Marie (CA)	-	+ 1/16	-	+
6 - HE.. Hervé (CA)	-	-	+ 1/64	NT
7 - HU.. Chantal (CA)	+	NT	+ 1/32	+ 1/32
8 - LA.. Catherine	-	+ 1/16	-	+ 1/16
9 - LE.. Laurette	-	+ 1/16	-	NT
10 - MO.. Gérard (CA)	+	Anti C'	+ 1/64	+ 1/8
11 - MO.. André	-	+ 1/16	-	NT
12 - PS Edmond (CA)	+	-	+ 1/64	+ 1/64
13 - ST.. Isabelle	+	+ 1/16	+ 1/128	+ 1/64
14 - WI.. Valérie (CA)	-	+ 1/16	-	+ 1/16

Tableau XVIII : Mise en évidence des anticorps anti-asparaginase chez des malades leucémiques traités.

\* NT : sérum non testé. La technique d'agglutination de particules de latex sensibilisées, récemment mise au point, n'a pu être utilisée pour tous les sérums étudiés.

\*\* anti C' : pouvoir anti-complémentaire du sérum

\*\*\* : Chez ce malade, les anticorps ont été mis en évidence dans le sérum et le LCR

CA : malades ayant présenté un choc anaphylactique.



Chez le malade N° 10 qui a subi un traitement par une intrarachidienne des anticorps ont pu être mis en évidence à la fois dans le sérum et dans le L.C.R. après concentration de ce dernier quatre fois par contre dialyse sous vide (fig. 22 et 23 ).

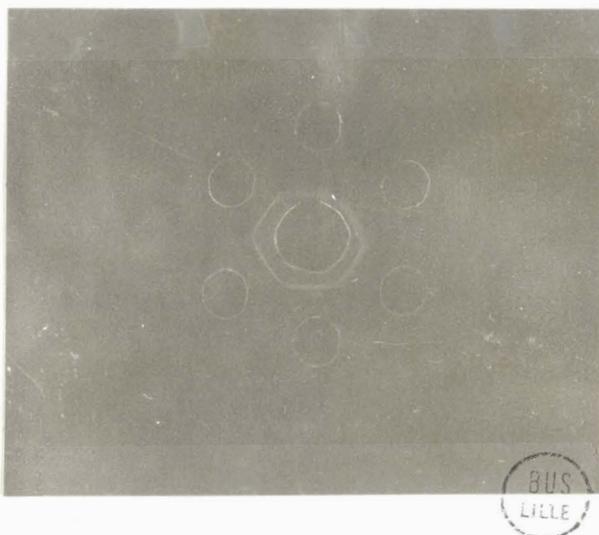


Figure 22 : Recherche des anticorps anti-asparaginase précipitants dans le sérum du malade N° 10.

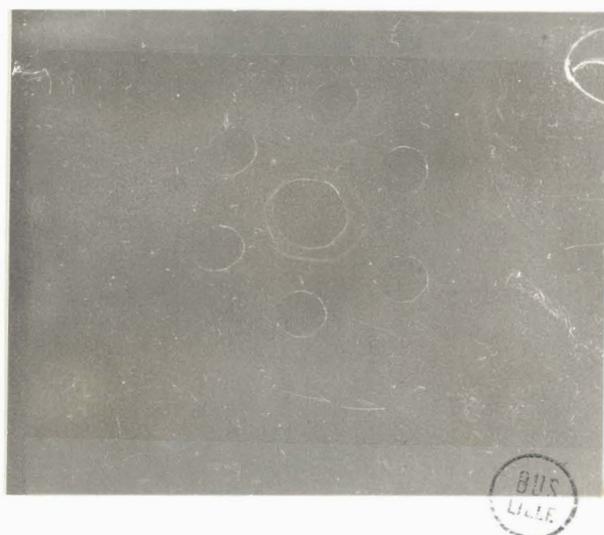


Figure 23 : Recherche des anticorps anti-asparaginase précipitants dans le LCR concentré du malade N° 10.

- Réaction de fixation du complément

Sept des 14 anticorps ont été révélés en fixation du complément à un titre au moins égal à 1/16ème (fig. 24 et 25) ; dans deux cas la réaction a été ininterprétable en raison d'un pouvoir anticomplémentaire du sérum.

		Dilutions d'asparaginase en UE/ml							
		8000	4000	2000	1000	500	250	125	T.S.
Dilutions du sérum étudié	Pur	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-
	1/2	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-
	1/4	+++	+++	+++	+++	+	-	-	-
	1/8	+++	+++	+++	++	-	-	-	-
	1/16	+++	+++	+++	+	-	-	-	-
	T.A.	-	-	-	-	-	-	-	-

Figure 24 : Recherche des anticorps fixant le complément chez le malade  
N° 3.

		Dilutions d'asparaginase en UE/ml							
		8000	4000	2000	1000	500	250	125	T.S.
Dilutions du sérum étudié	Pur	++	+	+	-	-	-	-	-
	1/2	+	+	-	-	-	-	-	-
	1/4	-	-	-	-	-	-	-	-
	1/8	-	-	-	-	-	-	-	-
	1/16	-	-	-	-	-	-	-	-
	T.A.	-	-	-	-	-	-	-	-

Figure 25 : Recherche des anticorps fixant le complément chez un malade  
négatif.

- Réaction d'hémagglutination passive au  $\text{CrCl}_3$

Par cette technique, 9 des 14 anticorps ont été mis en évidence jusqu'à une dilution au moins égale à 1/16ème et parfois jusqu'à 1/128ème ou plus (fig. 26 ).

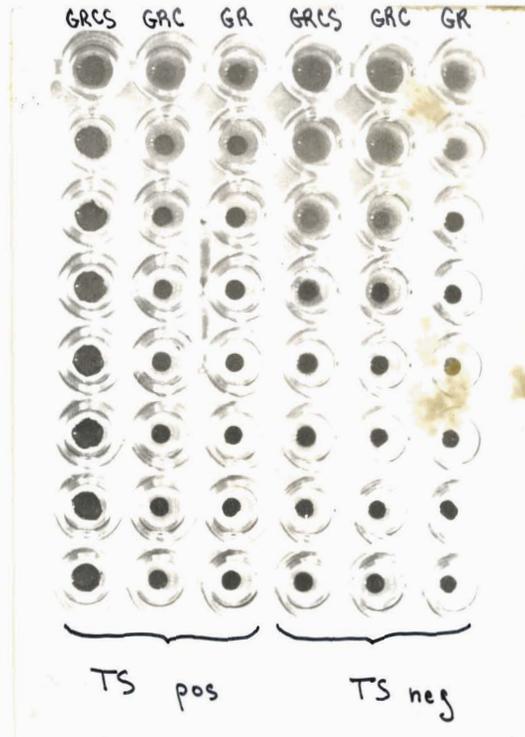


Figure 26 : Recherche des anticorps anti-asparaginase hémagglutinants chez le malade N° 13 et chez un témoin négatif.

Actuellement nous travaillons à partir de la dilution du sérum au quart, la réaction n'étant généralement pas spécifique avec le sérum pur et dilué au demi. Une recherche est considérée positive s'il y a agglutination jusqu'à la dilution au 1/16ème.

- Réaction d'agglutination passive de particules de latex sensibilisées par l'asparaginase

Cette technique, plus récemment mise au point, a pu être testée avec huit des anticorps : tous ont donné des résultats nettement positifs. Par contre, nous n'avons trouvé aucun résultat positif parmi les 26 sérums qui s'étaient avérés négatifs par les trois autres techniques (fig. 27 ).

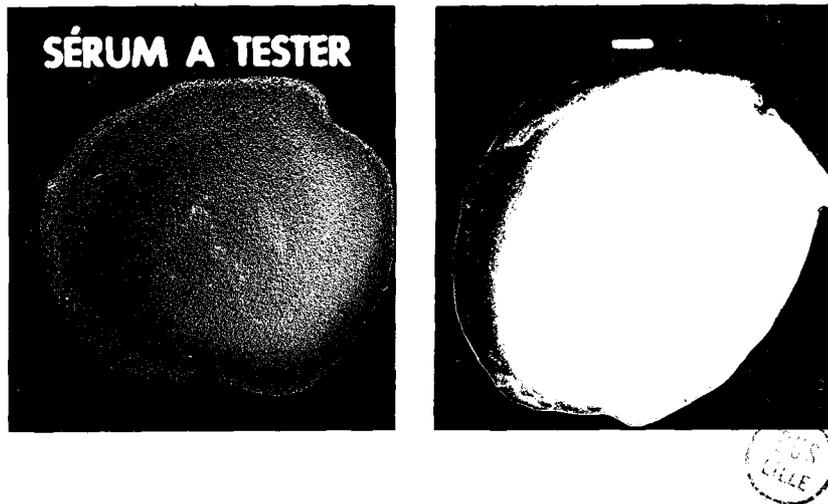


Figure 27 : Recherche des anticorps anti-asparaginase par agglutination de particules de latex sensibilisées chez le malade N° 12 et chez un témoin négatif.

b) Commentaires concernant les résultats de la recherche des anticorps anti-asparaginase chez l'homme

Les 6 anticorps précipitants ont été confirmés par au moins deux des trois autres techniques.

Chez cinq malades, les anticorps n'ont pu être décelés que par une des trois techniques si l'on ne prend pas en considération les résultats obtenus avec le latex qui sont incomplets ; trois ont été dépistés en hémagglutination passive et deux en réaction de fixation du complément.

Chez le malade N° 4, les anticorps ont d'abord été mis en évidence par la technique d'agglutination passive au latex avant que n'apparaissent, huit jours plus tard, des anticorps précipitants et hémagglutinants. Cette technique rapide semble donc dépister l'immunisation plus rapidement et avec plus de certitude que chacune des autres techniques prises séparément. Notons aussi que dans la majorité des cas, la recherche des anticorps a pu être effectuée dans un délai de 5 jours à 1 mois après l'arrêt du traitement. Pour 9 malades parmi les premiers étudiés, les sérums ont cependant été prélevés dans des délais allant de deux mois à un an après la fin du traitement. Enfin, chez trois sujets, les anticorps ont pu être suivis sur une série de sérums prélevés pendant 1 à 6 mois après leur mise en évidence : chez deux d'entre eux, les anticorps ont disparu au bout de 1 mois, chez le troisième au bout de 6 mois.

En conclusion, l'immunisation est importante, elle doit être recherchée précocement et de façon répétée après la fin du traitement, la disparition des anticorps pouvant être assez rapide. Toutes ces conditions n'ayant pas été res-

pectées au début de notre étude, il est possible que nous ayons sous-estimé la fréquence réelle de l'immunisation.

c) Etude des conditions d'apparition des anticorps  
 .....

- Fréquence d'apparition des anticorps suivant les modalités du traitement

Nous avons divisé le tableau XIX en deux parties en fonction de l'origine et des doses d'asparaginase utilisées dans les traitements. Chaque partie a été subdivisée plus ou moins arbitrairement en fonction du nombre d'injections et éventuellement du nombre de cures effectuées.

Chez les trois malades possédant des anticorps après plusieurs cures, notons que la recherche n'a été effectuée qu'après la fin de la dernière cure qui dans un cas seulement avait été très mal tolérée.

- Fréquence d'apparition des anticorps suivant le type cytologique de la leucémie aiguë

Le tableau XX fait apparaître une immunisation un peu plus importante dans les leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL) que dans les leucémies aiguës myéloblastiques (LAM), cependant cette différence n'est sans doute pas significative si l'on tient compte du fait que le nombre d'injections effectuées est en moyenne nettement moins important dans les LAL que dans les LAM.

Nombre d'injections d'asparaginase I.V.		Anticorps	Pas d'anticorps	Proportions de malades avec anticorps
moins de 6		1	3	1/4
6 à 15 en 1 cure		4	9	4/13
plus de 15	en 1 cure	1	8	1/9
	en plusieurs cures	3	9	3/13
Injections intrarachidiennes seules		1	2	1/3
Total		10	31	10/41

1) - Asparaginase S par voie intraveineuse (I.V.) à raison de 1000 UE/kg/j.

Nombre d'injections I.V.		Anticorps	Pas d'anticorps	Proportions de malades avec anticorps
moins de 6		1	1	1/2
6 à 15		3	3	3/6
Total		4	4	4/8

2) - Asparaginase CB par voie intraveineuse à raison de 200 UE/kg/j.

Tableau XIX : Anticorps anti-asparaginase en fonction du nombre d'injections.



	L.A.M.	L.A.L.
Nombre de malades	15	34
Nombre d'anticorps	3	11
Proportion de malades avec anticorps	3/15	11/34

Tableau XX : Anticorps anti-asparaginase en fonction du type cytologique de la leucémie aiguë.

Chez les 15 malades atteints de L.A.M. :

- 4 ont reçu moins de 6 injections IV (1 avec Ac)
- 11 ont reçu plus de 6 injections IV (2 avec Ac)

Chez les 34 malades atteints de L.A.L. :

- 3 ont reçu moins de 6 injections IV (1 avec Ac à la suite d'un traitement par voie intrarachidienne seule)
- 31 ont reçu plus de 6 injections (10 avec Ac).

4) Etude préliminaire des caractères quantitatifs et qualitatifs des anticorps mis en évidence

Nous avons voulu, dans une étude préliminaire, montrer que les anticorps anti-asparaginase mis en évidence chez le lapin et chez l'homme possèdent effectivement les caractéristiques qualitatives et quantitatives des immuno-globulines anticorps.

a) Immunoélectrophorèse en gélose  
.....

Nous avons utilisé la microméthode de SCHEIDEGGER (152) avec un appareillage IKB.

Après migration des sérums du malade N° 10 et du lapin, nous déposons dans les gouttières situées de part et d'autre de la zone de migration, de l'asparaginase diluée à 15 UE/ml d'un côté et des anti-sérums spécifiques  $\gamma$ A,  $\gamma$ G et  $\gamma$ M de l'autre. Pour le sérum de lapin, seul un sérum anti- $\gamma$ -globulines a été utilisé.

Les anticorps du lapin et du malade N° 10 sont des  $\gamma$ -globulines: en effet en immunoélectrophorèse (fig. 28), nous pouvons constater que l'arc de précipitation obtenu entre l'asparaginase et l'anticorps anti-asparaginase a les mêmes caractéristiques de migration que les  $\gamma$ -globulines, vis-à-vis d'un sérum anti- $\gamma$ -globulines.

De plus en ce qui concerne l'anticorps d'origine humaine, la double diffusion en gélose, selon CUCHTERLONY, permet de mettre en évidence un double arc de précipitation dont l'un peut être identifié à des  $\gamma$ G globulines de type kappa et l'autre à des globulines  $\gamma$ M.

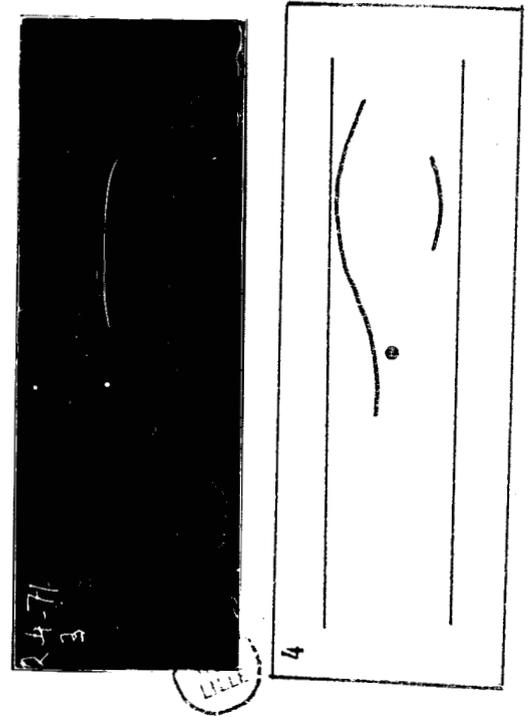
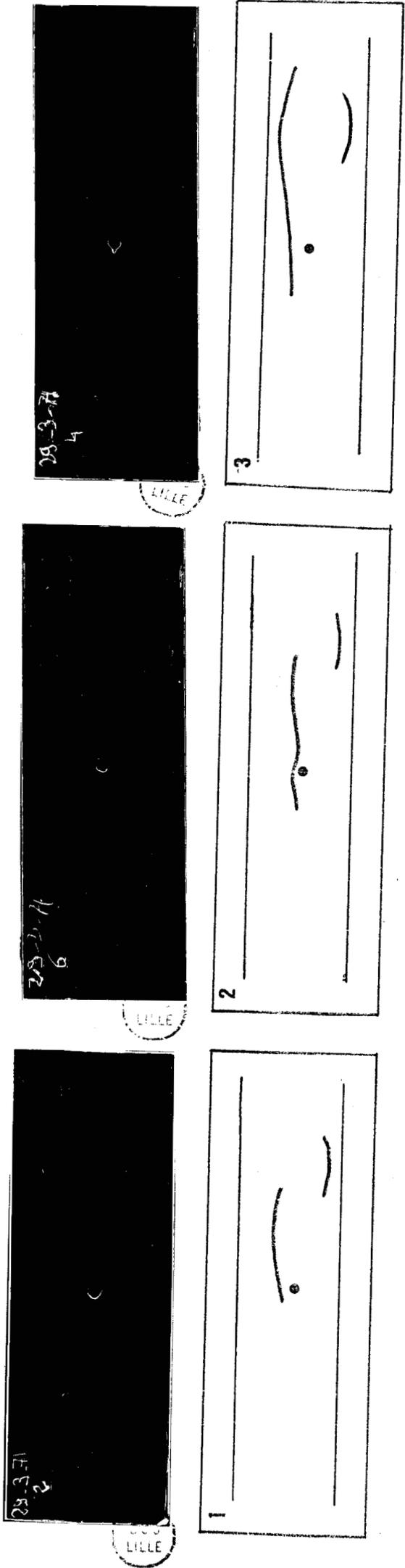


Figure 28 : Comparaison en immunoelectrophorèse des caractéristiques de migration de l'anticorps anti-asparaginase et des immunoglobulines sériques mises en évidence par des sérums spécifiques chez l'homme (1 : comparaison avec les  $\gamma A$ , 2 : avec les  $\gamma M$ , 3 : avec les  $\gamma G$ ) et chez le lapin avec un sérum anti- $\gamma$ -globulines (4).

b) Etude des anticorps par une méthode de précipitation en  
 .....  
 milieu liquide  
 .....

Les anticorps anti-asparaginase de lapin et de l'homme ont été étudiés de façon quantitative par mesure densitométrique de la précipitation en milieu liquide.

A 0,1 ml de sérum sont ajoutées 0,1 ml de différentes solutions d'asparaginase. Le mélange est ensuite dilué par addition de 1,8 ml d'eau physiologique filtrée afin d'obtenir un volume suffisant pour la lecture qui est réalisée après une heure d'incubation à 37°C.

Nous prenons comme blanc le même sérum dilué en eau physiologique.

Les résultats obtenus (fig. 29) montrent que les courbes de précipitation sont effectivement du type de celles rencontrées dans toutes les réactions entre antigènes et anticorps précipitants. Ces courbes permettent de définir une zone d'équivalence et des zones d'inhibition par augmentation ou diminution de la quantité d'anticorps.

Les populations d'anticorps chez l'homme et l'animal sont sans doute hétérogène et comportent au moins deux types différents d'anticorps définissant une courbe à deux sommets avec deux zones d'équivalence. Ceci est en bonne corrélation avec la démonstration de la nature  $\gamma M$  et  $\gamma G$  des anticorps humains.

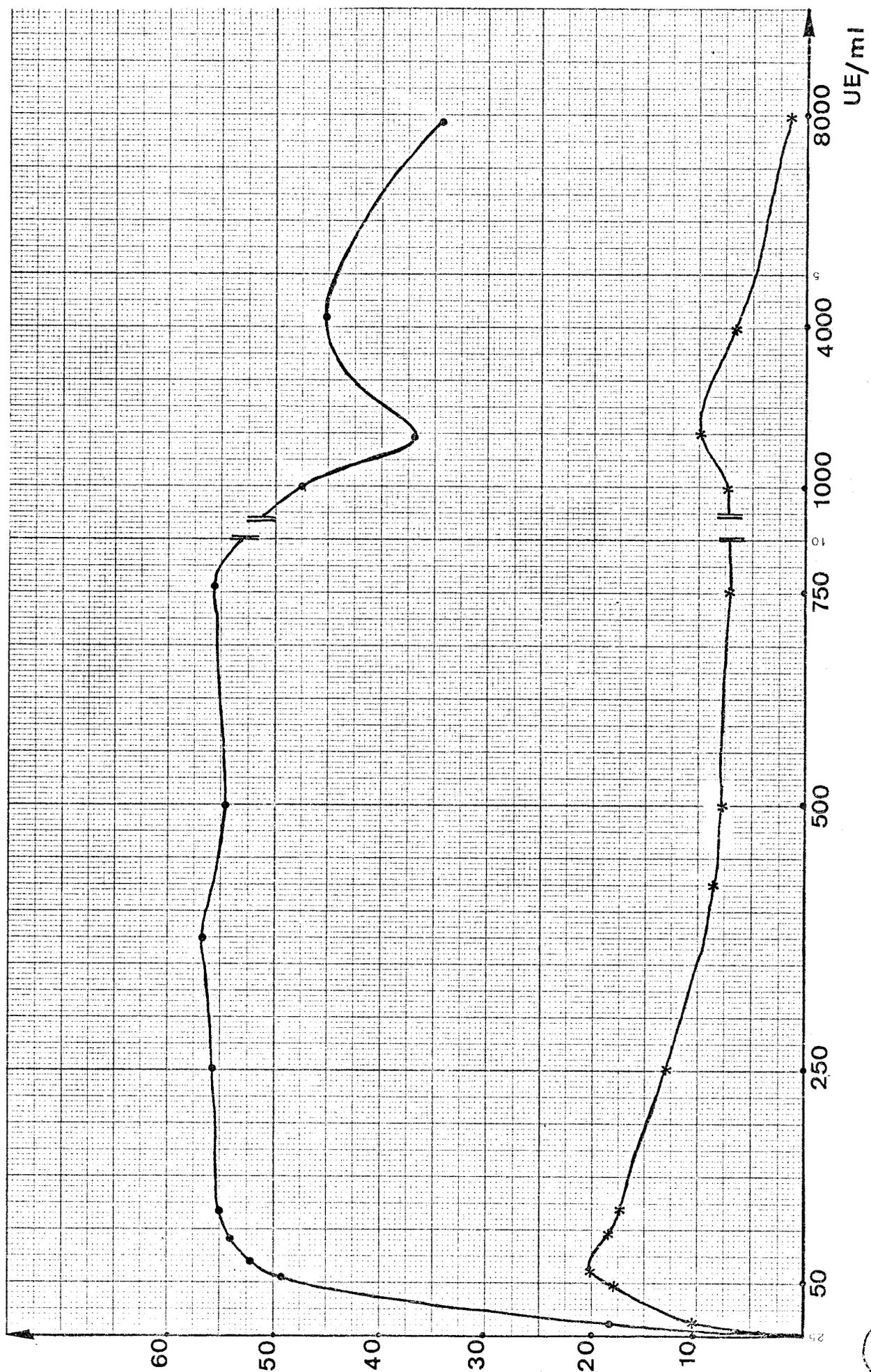


Figure 29 : Etude quantitative d'un anticorps de lapin (•—•) et d'un anticorps

humain (\*—\*) par mesure turbidimétrique de la précipitation en

milieu liquide.

5) Spécificité de la réaction asparaginase anticorps anti-asparaginase

Pour essayer de préciser la spécificité de la réaction asparaginase anticorps anti-asparaginase, nous avons essayé de répondre à un certain nombre de questions :

- les anticorps sont-ils dirigés contre l'asparaginase ou contre des impuretés de la préparation enzymatique ?
- les anticorps sont-ils directement actifs sur le site enzymatique ou non ?
- la spécificité des différents anticorps précipitants fabriqués par les lapins et les malades est-elle la même ?
- les anticorps sont-ils actifs contre d'autres asparaginases que celle qui a entraîné l'immunisation ?

a) Les anticorps anti-asparaginase sont dirigés contre l'asparaginase .....

En effet, la migration en électrophorèse sur acétate de cellulose de l'asparaginase même concentrée ne montre qu'une seule bande de migration homogène ce qui permet de penser que l'asparaginase utilisée est relativement pure.

En immunoélectrophorèse, l'arc de précipitation obtenu entre les anticorps et l'asparaginase se situe exactement au niveau de cette bande ; surtout cet arc peut, après mise en contact avec de l'asparagine être directement révélé par le réactif de NESSLER ce qui démontre la libération d'ammoniaque en rapport avec la persistance d'une activité asparaginasique du précipité.

Enfin, les anticorps précipitants anti-asparaginase peuvent totalement être neutralisés par addition au sérum d'une solution d'asparaginase à une concentration correspondant à la zone d'équivalence précédemment déterminée (fig. 30).

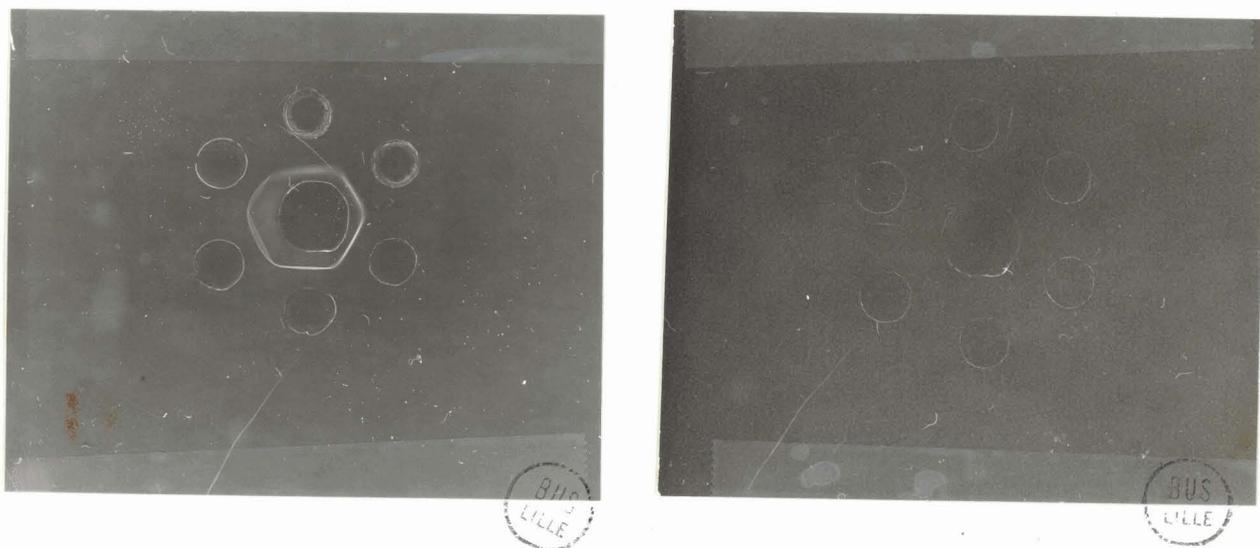


Figure 30 : Neutralisation d'un sérum anticorps anti-asparaginase par une solution d'asparaginase (375 UE/ml).

Lame 1 - Avant neutralisation

Lame 2 - Surnageant du même sérum après neutralisation.

b) Les anticorps anti-asparaginase sont essentiellement dirigés contre  
 .....  
 l'apoenzyme de la molécule enzymatique  
 .....

La coloration des arcs de précipitation par le réactif de Nessler apporte aussi la preuve qu'une partie au moins de l'activité enzymatique est conservée après réaction antigène-anticorps.

Nous avons précisé et confirmé cette constatation par l'étude plus précise de la neutralisation in vitro de l'asparaginase par les anticorps anti-asparaginase en faisant varier le rapport quantitatif entre l'antigène et l'anticorps mis en présence et en effectuant la mesure de l'activité enzymatique résiduelle du mélange avec ou sans élimination du précipité par centrifugation.

La technique utilisée a été la suivante : nous avons effectué une série de 8 dilutions de raison 2 de deux sérums positifs (lapin et malade N° 13) et d'un sérum négatif ; 0,5 ml de chacune des dilutions est additionné de 2 UE d'asparaginase puis incubé pendant 1 h à 37°C. Pour chaque mélange ainsi obtenu, la mesure de l'activité enzymatique est effectuée avant et après centrifugation du précipité.

Les résultats rapportés sur les figures 31 et 32 montrent que l'activité enzymatique n'est pas modifiée par l'adjonction d'un sérum négatif, quelque soit la dilution, que le mélange ait été ou non centrifugé.

Par contre, en présence de sérums positifs, il existe une diminution nette de l'activité enzymatique ; celle-ci est importante lorsque le mélange a été centrifugé et est proportionnelle à la quantité de sérum anticorps ajouté ;

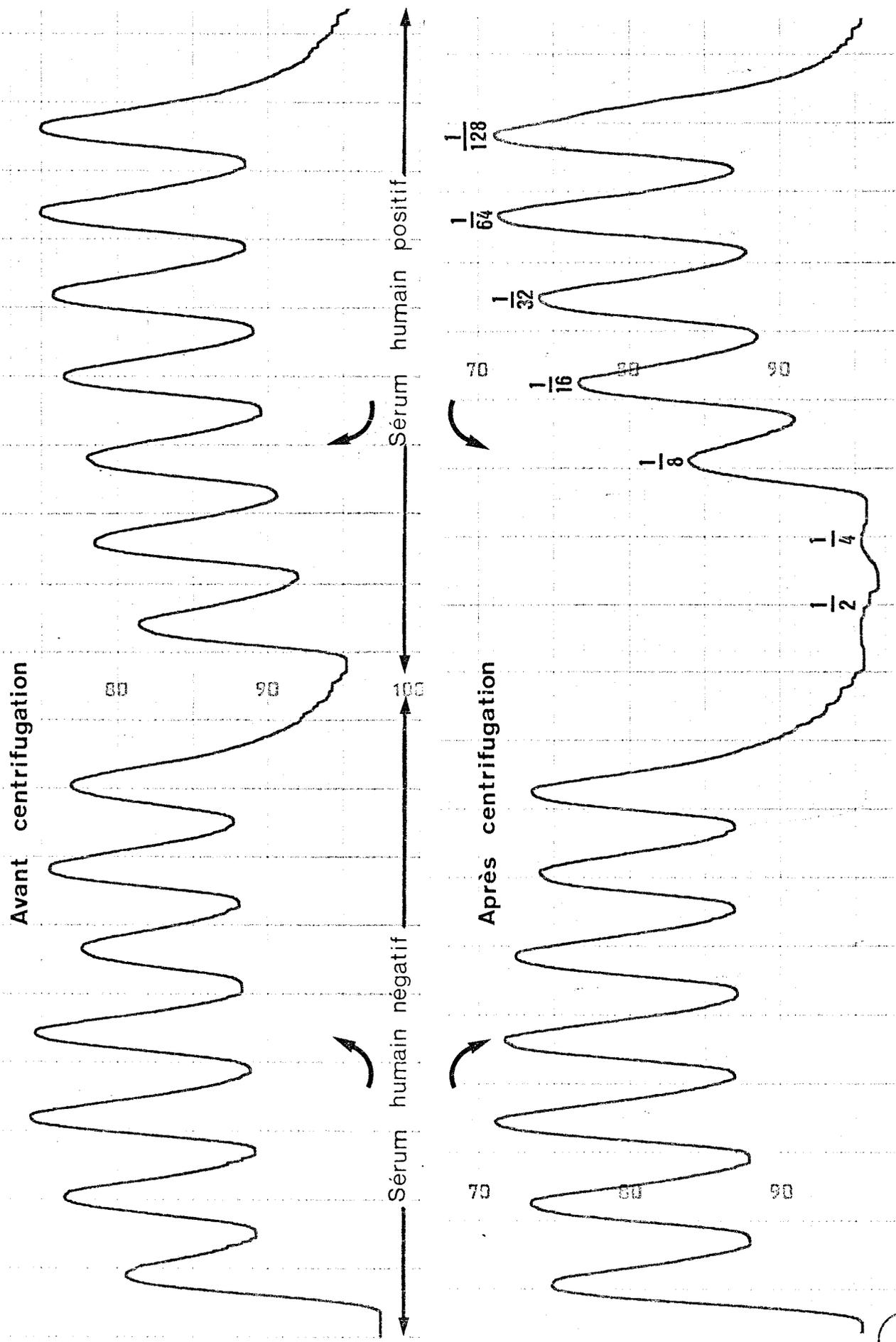


Figure 31 : Etude quantitative de l'activité enzymatique résiduelle d'un mélange "asparaginase-anticorps précipitants anti-asparaginase" à différentes dilutions avant et après centrifugation sur un sérum humain négatif et un sérum humain positif.

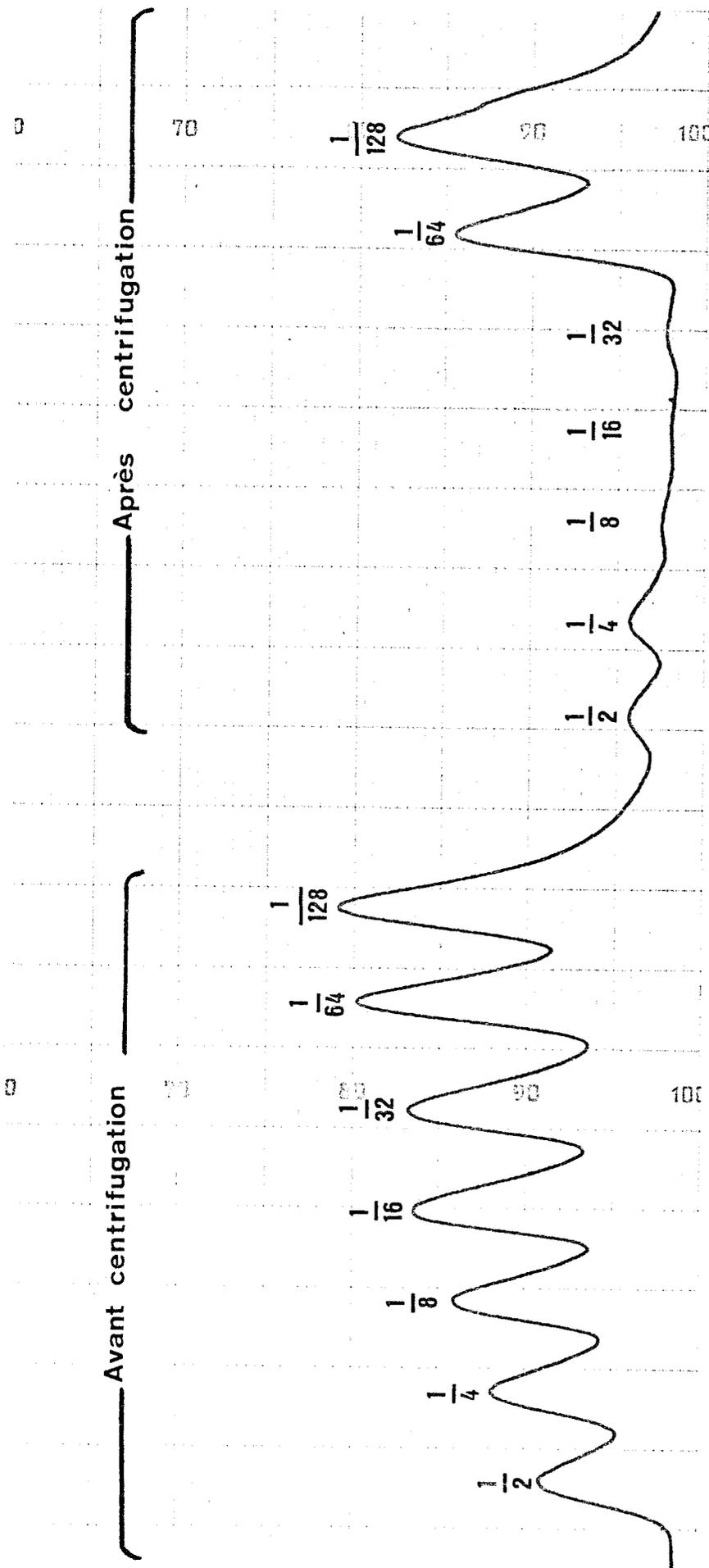


Figure 32 : Etude quantitative de l'activité enzymatique résiduelle d'un mélange "asparaginase-anticorps précipitants anti-asparaginase" à différentes dilutions avant et après centrifugation sur un sérum de lapin positif.



elle est beaucoup moins nette si le mélange n'est pas centrifugé. La légère diminution observée peut être en rapport avec une sédimentation partielle spontanée du précipité ou traduire un empêchement stérique du site d'activité enzymatique par la liaison avec l'anticorps.

En conclusion, les anticorps anti-asparaginase se lient bien spécifiquement à l'asparaginase sans en modifier tout au moins de façon importante l'activité enzymatique. Dans une certaine mesure, cette technique de neutralisation pourrait être utilisée pour la mesure quantitative des anticorps précipitants.

c) Les anticorps fabriqués par le lapin et l'homme sont dirigés contre  
 .....  
 le même déterminant antigénique  
 .....

Nous avons comparé par immunodiffusion les arcs obtenus vis-à-vis de l'asparaginase au moyen d'une série de sérums de lapins, au moyen d'une série de sérums humains ; les deux types de sérum ayant été comparés entre eux.

Il apparaît sur les figures 33, 34 et 35 que les arcs de précipitation donnent dans tous les cas des réactions d'identité totale, permettant d'affirmer que tous ces anticorps ont exactement la même spécificité.

d) Les anticorps obtenus en réponse à une immunisation par une  
 .....  
 asparaginase d'*Escherichia coli* sont également actifs sur une autre asparaginase  
 .....  
 d'origine différente  
 .....

Nous avons testé l'activité de nos anticorps anti-asparaginase de lapin et humain vis-à-vis d'une asparaginase provenant d'une bactérie phylogéneti-

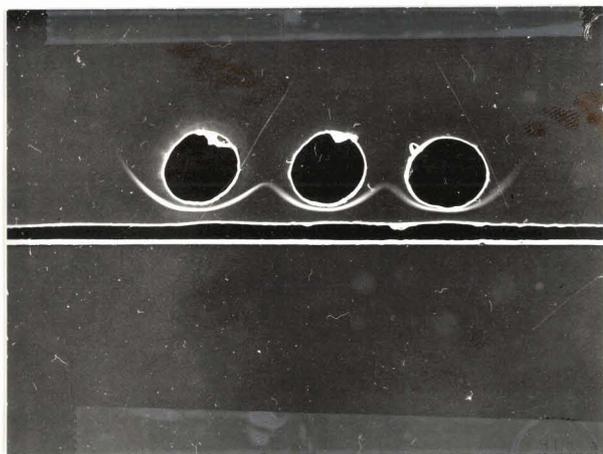


Figure 33 : Identité des spécificités anti-asparaginase de différents sérums de lapin.



Figure 34 : Identité des spécificités anti-asparaginase de différents sérums humains.

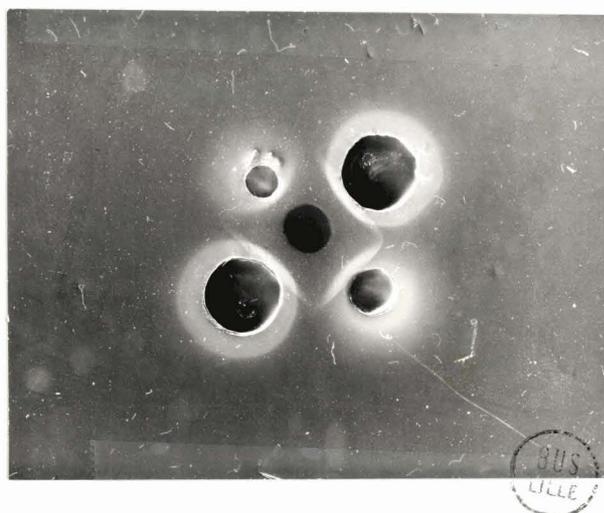


Figure 35 : Identité des spécificités anti-asparaginase entre des sérums de lapin et des sérums humains.

quement très éloignée d'Escherichia coli, en l'occurrence Mycobacterium phlei ; cette asparaginase a été extraite, purifiée et mise à notre disposition par HORNEZ (81).

On peut constater (fig. 36) que nos anticorps sont capables de réagir avec l'asparaginase de Mycobacterium phlei ; il existe donc une communauté antigénique au moins partielle entre les deux asparaginases.

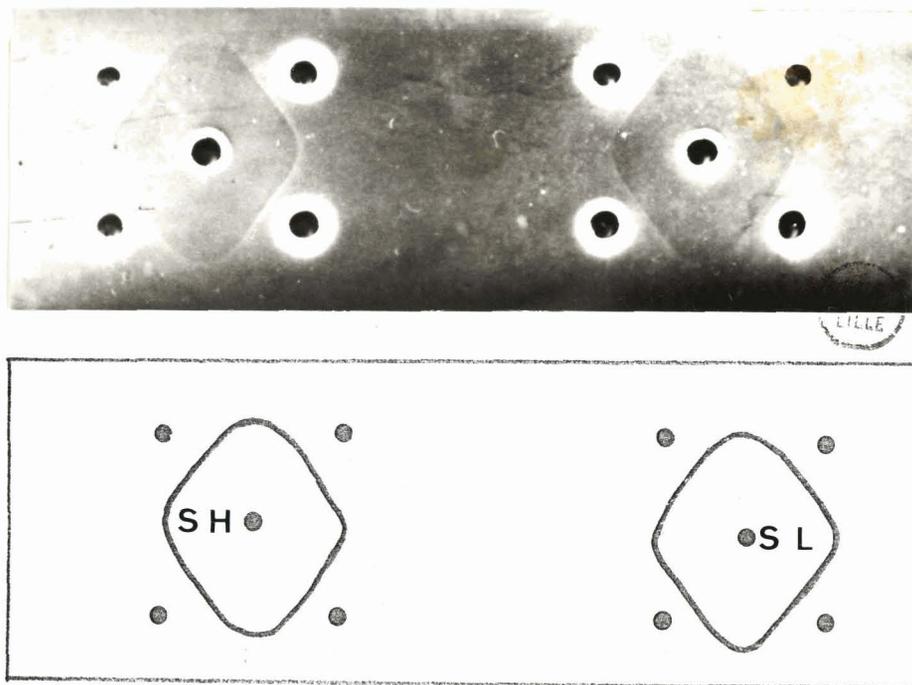


Figure 36 : Mise en évidence d'une communauté antigénique au moins partielle entre les asparaginases de Mycobacterium phlei et d'Escherichia coli.

En conclusion, les anticorps anti-asparaginase sont bien dirigés contre l'asparaginase et non contre des impuretés de la préparation, ils reconnaissent le ou les mêmes déterminants antigéniques ; ceux-ci sont situés au niveau de l'apcenzyme de la molécule enzymatique. De plus, les anticorps fabriqués par l'homme et le lapin contre l'asparaginase d'Escherichia coli sont capables de réagir avec de l'asparaginase extraite de Mycobacterium phlei ce qui prouve qu'il existe entre les deux asparaginases des communautés antigéniques.

La mise en évidence fréquente d'une immunisation pose le problème du devenir de cette enzyme in vivo. On peut en effet penser que le complexe antigène-anticorps est rapidement éliminé de la circulation et que la mesure de l'asparaginasémie devrait traduire précocement l'installation d'une immunisation.

B) Corrélations entre la mesure de l'asparaginasémie et l'apparition des anticorps anti-asparaginase

1) Résultats expérimentaux

a) Etude de la vitesse d'élimination de l'asparaginase d'*Escherichia coli* injectée par voie intraveineuse chez le lapin : durée de vie

L'étude a porté sur trois lapins recevant chacun une injection de 500 UE/kg par voie intraveineuse. Les prélèvements destinés aux mesures de l'activité enzymatique ont été effectués juste avant l'injection, puis à différents temps régulièrement espacés après l'injection, compris entre 15 min. et 6 heures ; des prélèvements ont également été réalisés 24 heures et 48 heures après l'injection chez l'un des lapins (lapin 101).

Les mesures de l'activité enzymatique de chaque prélèvement ont été reportées sur papier millimétrique en coordonnées arithmétiques (fig. 37). La courbe obtenue pour le lapin 101 montre que l'activité enzymatique décroît selon une courbe exponentielle en fonction du temps et que la demi-vie (temps correspondant à la disparition de la moitié de l'activité enzymatique sérique) est d'environ 7 heures 15.

Chez les lapins 1-1 et 1-2, les mesures ont été effectuées entre 15 min. et 6 heures, cependant il est possible d'extrapoler les courbes et d'obtenir alors une estimation de la demi-vie de 6 heures 30. Bien que la détermination de cette demi-vie n'ait été effectuée que chez trois animaux, la concordance des résultats obtenus permet d'évaluer celle-ci entre 6 heures et 8 heures.

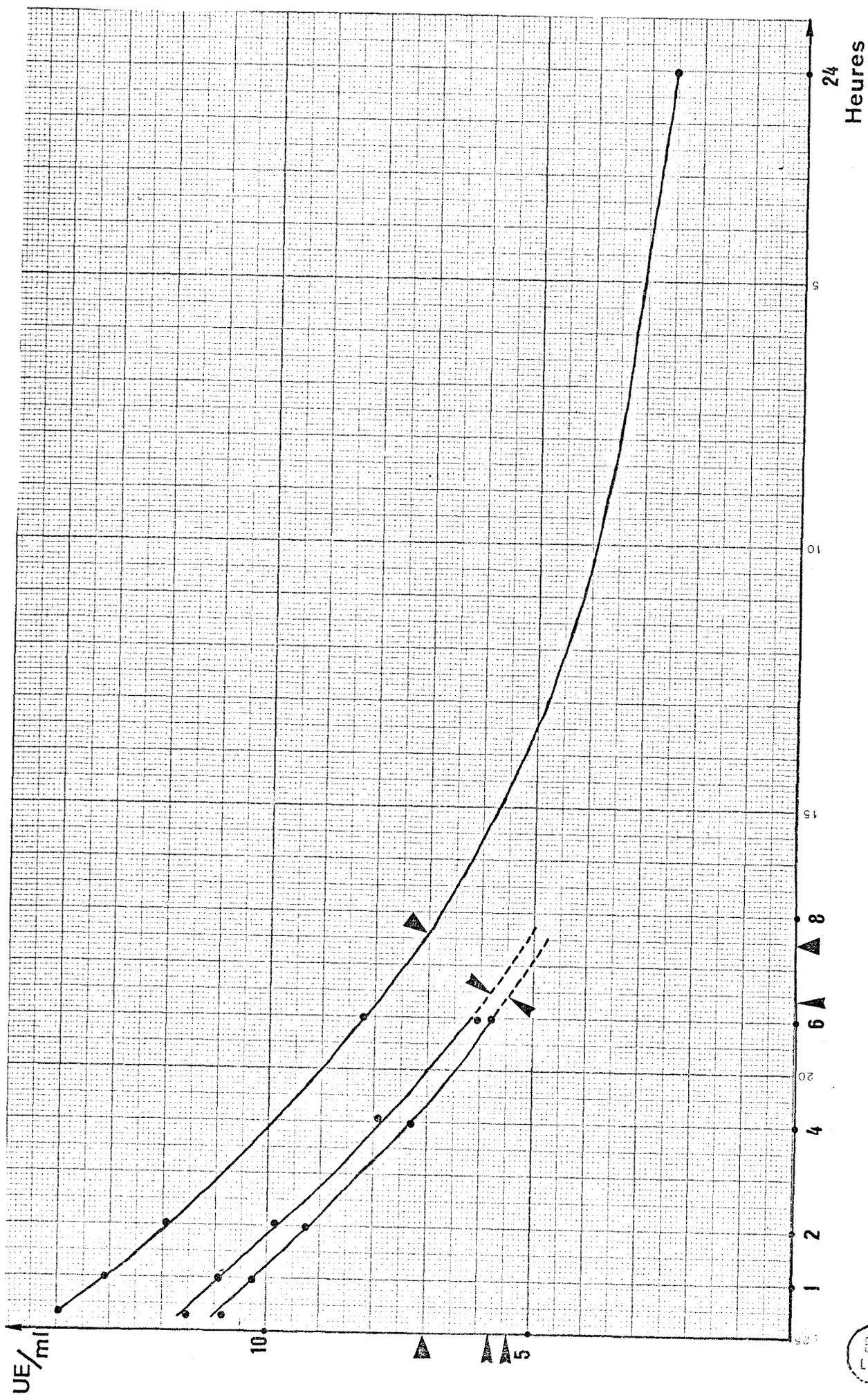


Figure 37 : Etude cinétique de l'asparaginasémie chez trois lapins différents après la première injection d'asparaginase (500 UE/kg) : détermination de la demi-vie.



Chez le lapin 101, les mesures effectuées 24 heures et 48 heures après une seule injection de 500 UE/kg, montrent qu'au bout de 48 heures le taux d'enzyme atteint est de 0,7 UE/ml, soit un taux presque identique au taux de base constaté chez l'animal avant toute injection (fig. 38). On peut donc penser que toute l'asparaginase injectée a pratiquement disparu au bout de 48 heures.

b) Conséquence de l'immunisation sur le taux d'activité enzymatique sérique  
 .....  
 .....  
 .....  
 .....  
 .....

Nous venons de voir chez les lapins 1-1 et 1-2 qu'elle était l'évolution du taux d'activité enzymatique de l'asparaginase dès la 1ère injection. Nous avons continué ensuite les injections d'enzyme afin d'étudier l'effet immunogène de l'asparaginase.

Pour explorer le devenir de l'asparaginase en cas d'immunisation, nous avons effectué après l'apparition des anticorps précipitants une asparaginasémie identique à celle de début de traitement.

Chez les deux lapins immunisés, nous avons obtenu des résultats absolument identiques. Comme le montre la figure 39, il apparaît nettement que la présence d'anticorps précipitants dans le sérum du lapin entraîne une chute rapide, puisqu'elle survient dans le quart d'heure qui suit l'injection, et complète de l'activité enzymatique de l'asparaginase injectée. Cette constatation nous a amené à envisager l'étude de l'évolution de l'asparaginasémie au cours d'un traitement prolongé en corrélation avec l'apparition progressive des anticorps.

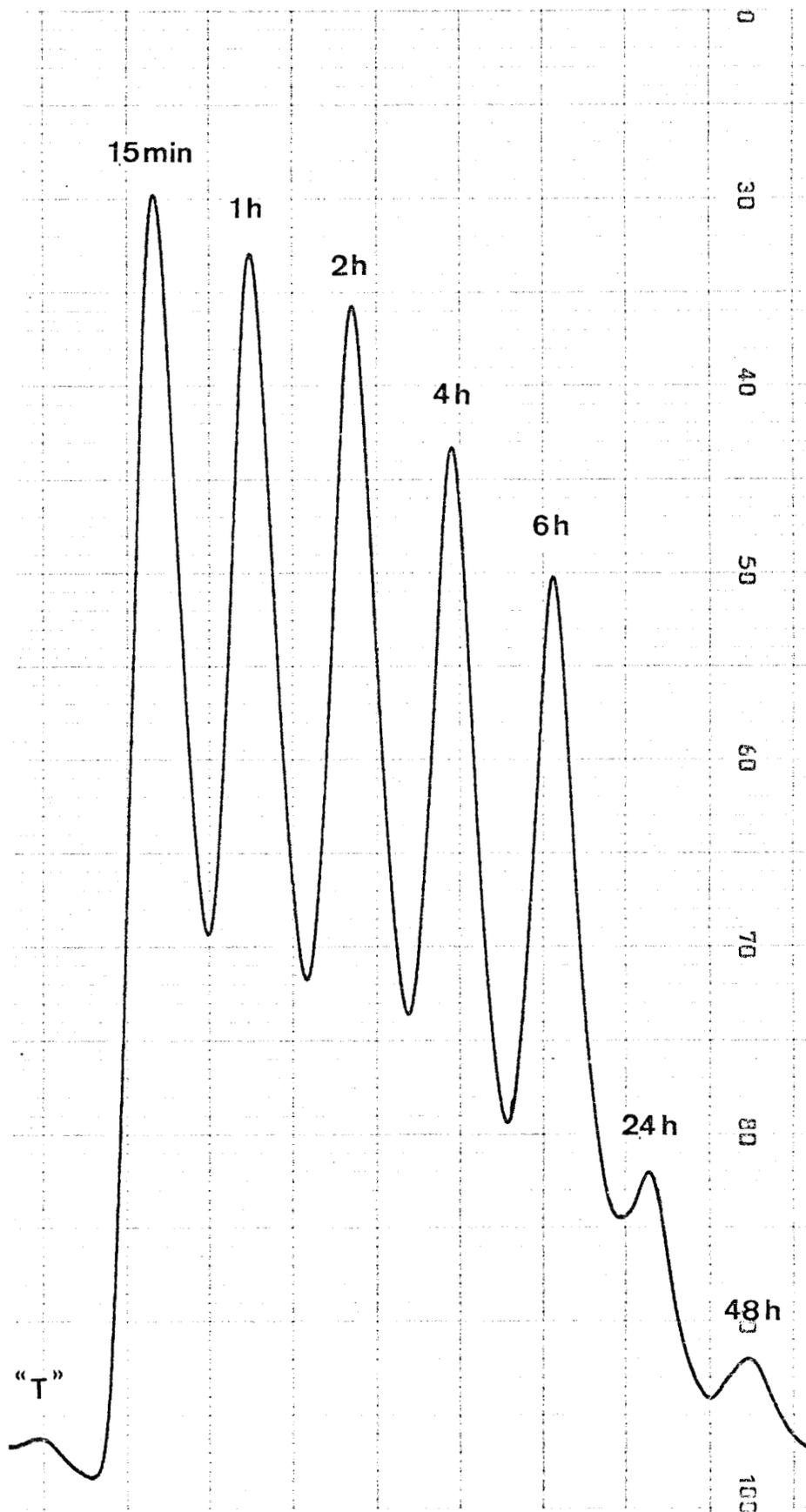


Figure 38 : Etude cinétique de la disparition de l'activité asparaginasique chez le lapin 101 après une première injection de 500 UE/kg.

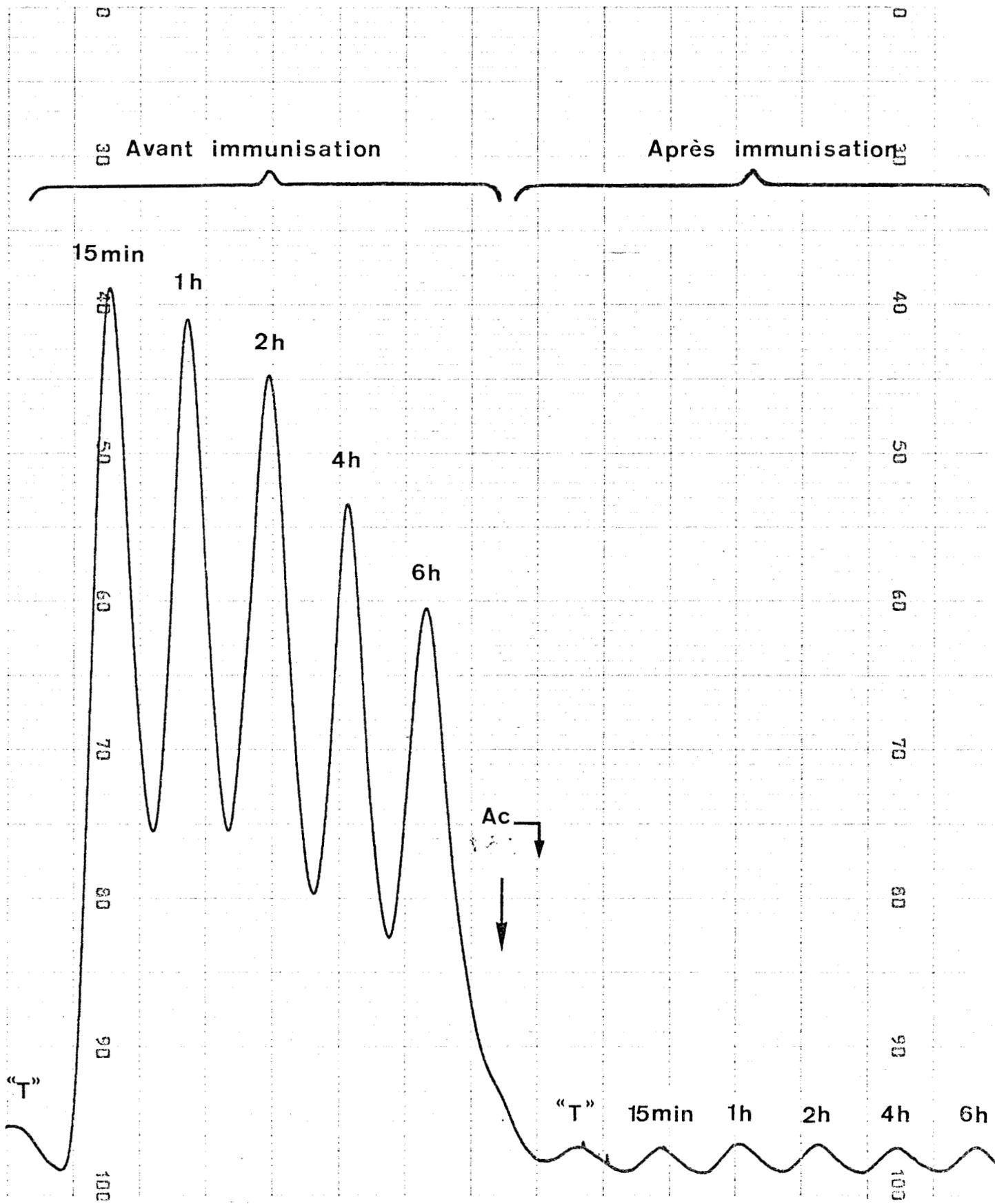


Figure 39 : Etude cinétique de la disparition de l'activité asparaginase avant et après immunisation chez le lapin.

c) Etude cinétique de l'évolution de l'asparaginasémie tout au long d'une immunisation

Une première étude portant sur deux lapins a été effectuée ; nous avons ensuite poursuivi celle-ci chez les lapins des séries A, B et C étudiés précédemment.

- Deux lapins (92 T et 94 T) ont été traités par des injections d'asparaginase à raison de 100 UE/kg selon le schéma de traitement précisé sur le tableau XXI en vue de provoquer une immunisation.

Une étude complète de l'asparaginasémie a été effectuée le premier et le huitième jour, par la suite des prélèvements ont été réalisés tous les jours, 2 heures après l'injection d'asparaginase.

L'étude de l'activité enzymatique des prélèvements réalisés après 15 min., 1, 2, 4 et 6 heures, montre que les asparaginasémies des premier et huitième jours sont identiques ; par contre, lors des injections suivantes, les prélèvements au bout de 2 heures font apparaître une chute de l'activité asparaginasique qui survient le seizième et le vingtième jour respectivement chez les lapins 92 T et 94 T (fig. 40).

Tous les prélèvements utilisés pour la mesure de l'asparaginasémie ont en même temps fait l'objet d'une recherche d'anticorps anti-asparaginasique par immunodiffusion, hémagglutination passive au  $\text{CrCl}_3$  et agglutination de particules de latex sensibilisées par l'asparaginase.

Chez le lapin 92 T (tableau XXI), la chute du taux d'asparaginasémie est constatée sur le même prélèvement que celui qui révèle pour la première

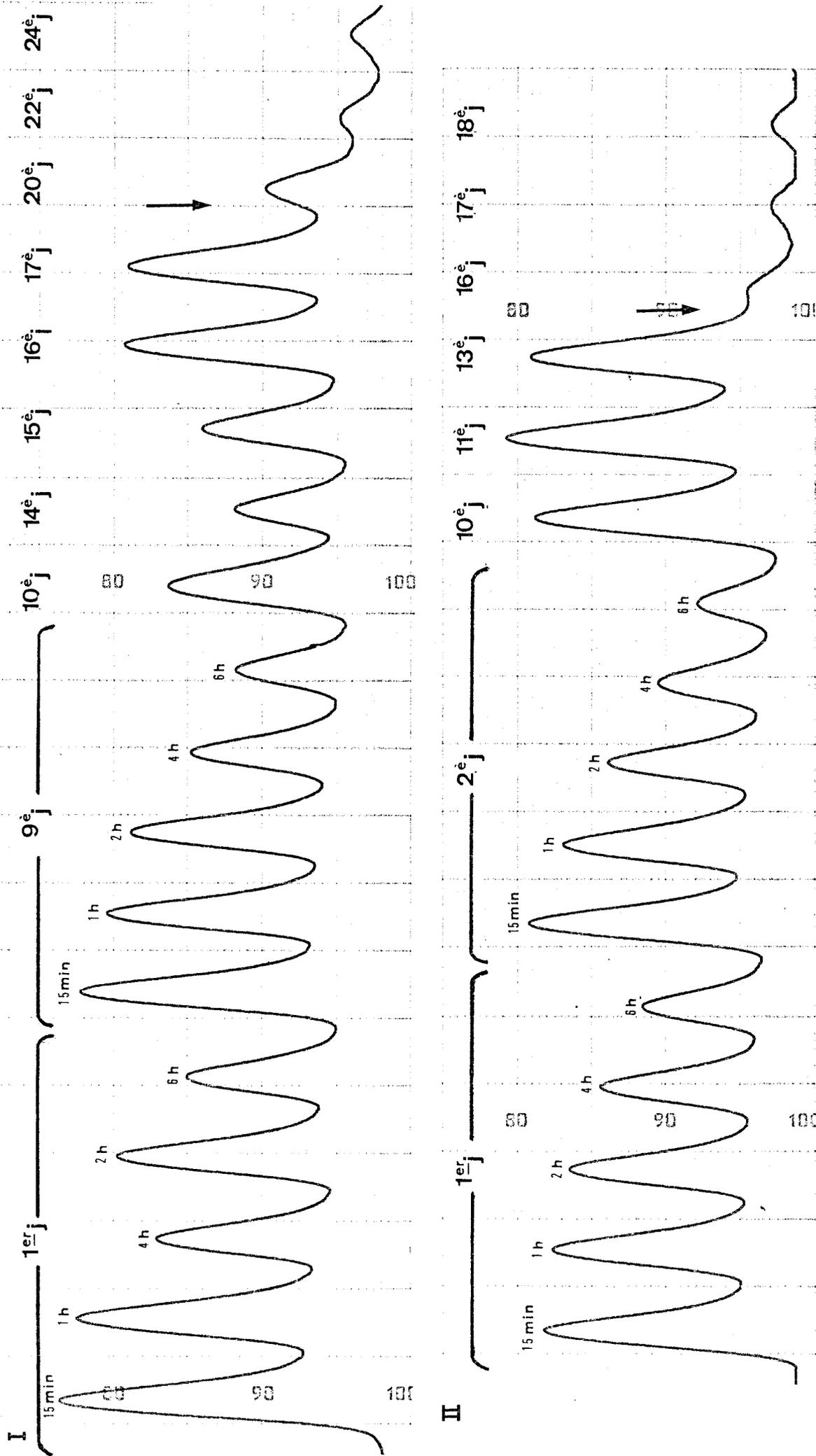


Figure 40 : Variation du taux d'activité asparaginase chez les lapins 94 T (I) et 92 T (II) au cours d'un traitement prolongé par l'asparaginase (100 UE/kg).

Jours		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
Injections 100 UE/kg		+	+	+					+	+	+	+					+	+	+							
Prélèvements		+							+	+	+	+					+	+	+							
Diminution de l'asparaginasémie																										
Techniques de recherche des anticorps	Immuno- diffusion																									
	Hémagglutina- tion passive au CrCl <sub>3</sub>																									
	Latex																									

(a)

Jours		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
Injections 100 UE/kg		+	+	+					+	+	+			+	+	+	+	+			+					
Prélèvements		+							+	+	+				+	+	+	+			+					
Diminution de l'asparaginasémie																										
Techniques de recherche des anticorps	Immuno- diffusion																									
	Hémagglutina- tion passive au CrCl <sub>3</sub>																									
	Latex																									

(b)

Tableau XXI : Corrélations entre la chute de l'asparaginasémie et l'apparition des anticorps anti-asparaginase mis en évidence par différentes techniques :

- a : lapin 92 T

- b : lapin 94 T



fois la présence d'anticorps par hémagglutination passive au  $\text{CrCl}_3$  et par agglutination au latex. Malencontreusement, le prélèvement juste antérieur avait été effectué 4 jours plus tôt, laissant donc une période d'incertitude concernant la technique susceptible d'être la plus sensible pour le dépistage précoce de l'immunisation. Ce n'est que 7 jours plus tard qu'apparaîtront des anticorps précipitants.

Chez le lapin 94 T (tableau XXI) on peut noter également au vingtième jour de l'expérience la concordance entre la diminution de l'asparaginasémie et la mise en évidence d'anticorps par hémagglutination passive au  $\text{CrCl}_3$  et agglutination au latex ; cependant, il faut noter que 3 jours plus tôt des anticorps très faibles avaient été dépistés sans modification appréciable du taux de l'asparaginasémie. Pendant la période séparant ces deux constatations aucun prélèvement n'avait été effectué.

- Ces résultats nous ont paru intéressants à confirmer ; c'est pourquoi, dans les séries expérimentales A, B et C que nous avons étudiées précédemment, dans le cadre de l'influence des doses d'asparaginase injectées sur l'apparition de l'immunisation, nous avons également pu établir la corrélation entre l'évolution de l'asparaginasémie et la mise en évidence des anticorps anti-asparaginase.

Le protocole expérimental a consisté en l'injection par voie intraveineuse d'asparaginase, du premier au dix-huitième jour d'expérience, sauf aux jours 6 et 13, à des doses de 500 UE/kg pour la série A, de 100 UE/kg pour

la série B et de 10 UE/kg pour la série C.

Les résultats obtenus sont rapportés dans les figures 41, 42 et 43.

Plusieurs constatations peuvent être faites :

. Tout d'abord, la chute du taux de l'asparaginasémie apparaît dans tous les cas à partir du onzième jour de l'expérience. Cette chute se présente souvent sous forme d'une courbe sigmoïde, pour les séries A et B, comportant donc une chute initiale suivie d'un plateau puis d'une nouvelle chute. Il est possible que ceci corresponde à l'apparition successive de deux types d'anticorps différents.

. Nous avons déjà vu antérieurement que la mise en évidence des anticorps se fait à des temps variables selon la technique utilisée : ainsi, dans les séries A et B, les anticorps sont-ils d'abord dépistés par agglutination passive au latex, puis 7 à 10 jours plus tard par hémagglutination passive au  $\text{CrCl}_3$  et enfin, une semaine encore plus tard, par immunodiffusion.

Par contre, dans la série C, la cinétique d'apparition des anticorps est un peu différente ; en effet, la mise en évidence par les trois techniques survient successivement comme précédemment, mais dans de très courts laps de temps, voire le plus souvent en même temps.



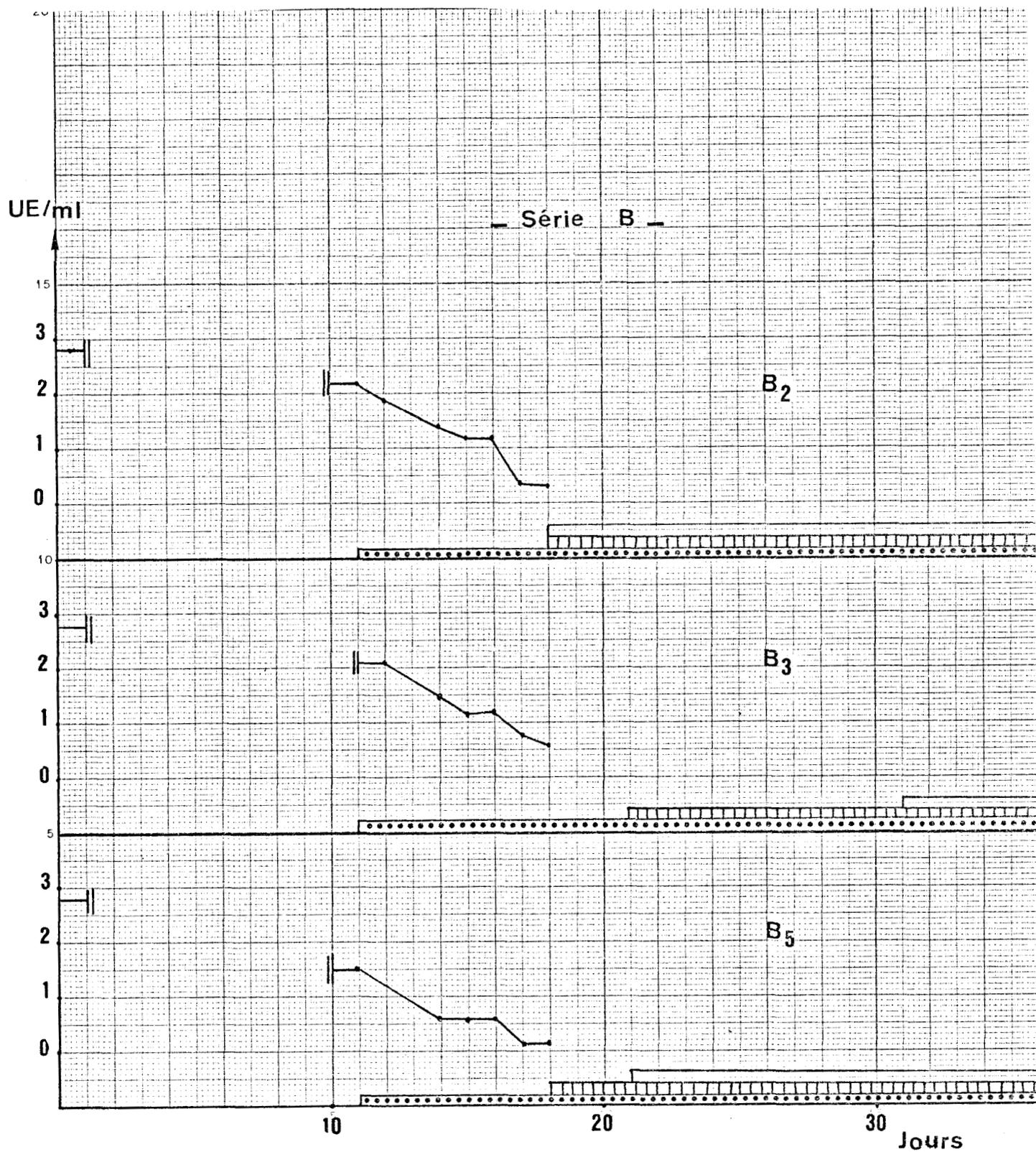


Figure 42 : Légende cf. figure 41.



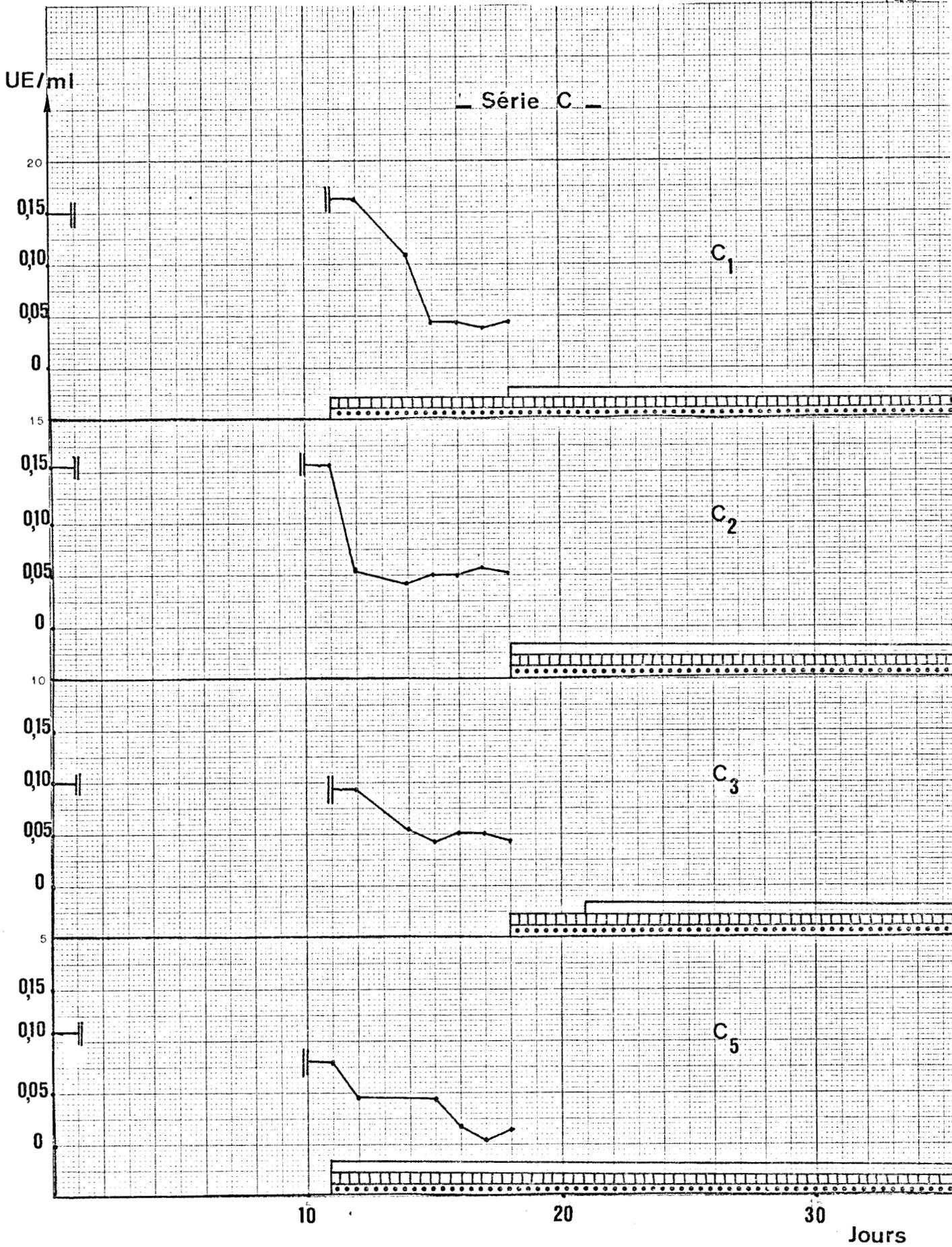


Figure 43 : Légende cf. figure 41.



Les corrélations que l'on peut établir entre les deux données précédentes sont les suivantes :

. Dans la série A, l'on peut dire qu'au moment du dépistage des anticorps, la mesure de l'asparaginasémie effectuée le lendemain montre toujours une chute du taux d'asparaginase au moins égale à 25 %. Cette chute se confirme nettement, après une période de relative stabilisation, 5 jours plus tard.

. Dans la série B, les résultats sont très comparables à ceux de la série A ; notons seulement que la pente initiale de la chute du taux de l'asparaginasémie est sensiblement plus faible.

. Dans la série C, les résultats sont apparemment différents en effet, si la chute de l'asparaginasémie apparaît également le onzième jour, elle semble plus brutale, voire totale. Dans deux cas, elle précède nettement la mise en évidence des anticorps ; cependant, nous avons vu que la cinétique d'apparition de ceux-ci était également différente de celle des séries A et B.

Par ailleurs, il faut rappeler que ces animaux ne reçoivent que de faibles doses d'enzyme qui peuvent donc être neutralisées par les faibles doses d'anticorps apparaissant dès le début de l'immunisation.

- Dans ces deux séries d'expériences, nous pouvons donc conclure que :

. l'immunisation se traduit comme l'on pouvait le prévoir d'après les expériences de neutralisation in vitro par une diminution du taux de l'asparaginasémie

. cette étude cinétique de l'asparaginasémie dans l'optique du dépistage précoce de l'immunisation montre que cette technique n'apparaît pas nettement supérieure à la recherche des anticorps par la technique d'agglutination des particules de latex ; elle peut cependant la compléter ou la confirmer ; elle apparaît cependant plus sensible que la technique d'hémagglutination passive au  $\text{CrCl}_3$  et surtout que la technique de recherche des anticorps précipitants.

## 2) Application au dépistage précoce de l'immunisation chez l'homme : résultats préliminaires

Il nous est apparu intéressant, pour diverses raisons, de voir si les résultats expérimentaux obtenus précédemment étaient transposables à l'homme. En effet, il apparaît évident qu'à partir du moment où l'asparaginase a fait la preuve de son pouvoir immunogène chez l'animal et chez l'homme, quelques soient

les modalités des injections, il est très important de mettre en oeuvre tous les moyens qui permettraient de dépister précocement l'immunisation. L'asparaginase étant utilisée chez l'homme dans un but thérapeutique, cette immunisation constitue à la fois un écueil à l'efficacité du traitement, voire, un danger en raison du risque de choc anaphylactique que nous n'avons cependant pas observé chez nos animaux d'expérience.

a) Etude de la durée de vie de l'asparaginase d'*Escherichia coli*  
 injectée par voie intraveineuse chez l'homme

L'étude a porté sur deux malades atteints de leucémie aiguë, dont le traitement comportait des injections journalières à raison de 1000 UE/kg

- Pour déterminer la durée de demi-vie, nous avons disposé de prélèvements effectués avant la première injection et à différents temps après celle-ci ; la mesure de l'activité enzymatique a donné les résultats indiqués dans le tableau XXII. ci-dessous.

Malades	Avant la 1ère injection	15 min.	30 min.	3 h	6 h	18 h	24 h
B.. Annie	0.5	18.50	NF*	13.60	11.20	NF*	5.00
D.. Jeanine	NF*	NF*	14.0	12.0	9.6	5.1	NF*

NF\* : non fait

Tableau XXII : Evolution du taux de l'activité asparaginasémique chez deux malades leucémiques, après une première injection par voie intraveineuse de 1000 UE/kg en fonction du temps.

Les résultats exprimés en coordonnées arithmétiques confirment que l'activité enzymatique décroît d'une façon exponentielle en fonction du temps comme nous l'avons déjà observé chez le lapin.

La construction des courbes à partir des mesures effectuées permet d'estimer la demi-vie de l'asparaginase à 9 heures 30 et 11 heures, pour les deux malades explorés (fig: 44). La précision dans la détermination de cette durée est certes approximative, mais se situe néanmoins dans la gamme des chiffres cités par d'autres auteurs (132, 163).

- Notons que des injections journalières répétées aux doses de 1000 UE/kg ne montrent pas de phénomènes d'accumulation ; en effet, chez plusieurs malades nous avons suivi le taux de l'asparaginasémie mesurée 2 heures après chaque injection pendant la durée d'une cure, la figure 45 en donne un exemple.

Tous les prélèvements conservés et mesurés le même jour se traduisent par des activités identiques (rappelons que la légère diminution apparente du premier pic est liée à l'inertie de l'appareil enregistreur, comme nous l'avons démontré dans le premier chapitre).

b) Etude cinétique de l'asparaginasémie au cours du traitement  
 .....  
 chez l'homme  
 .....

Cette étude mise en oeuvre récemment, ne nous a permis de suivre l'évolution de l'asparaginasémie de façon continue que chez cinq malades traités

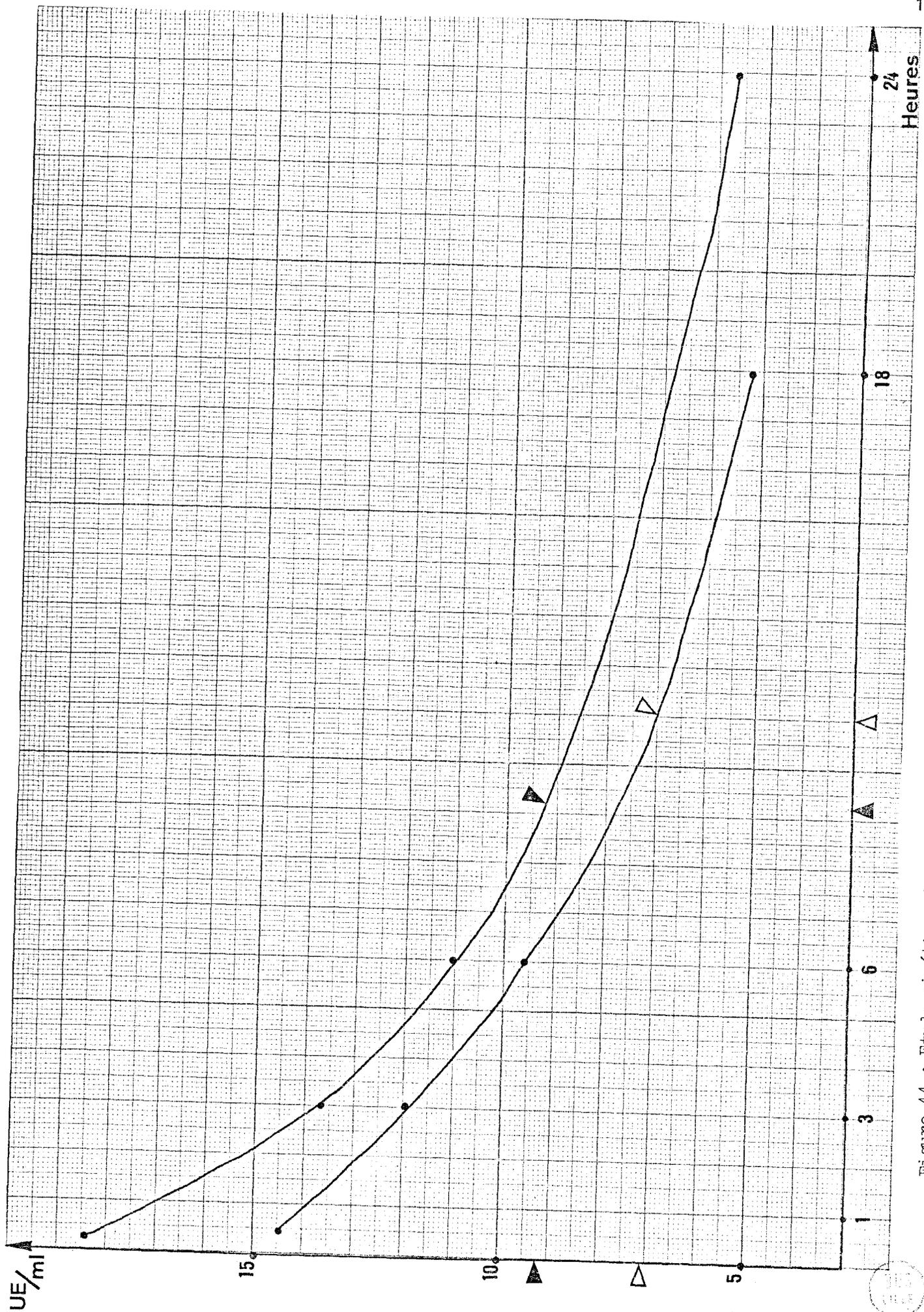


Figure 44 : Etude cinétique de l'asparaginasémie chez deux malades leucémiques après la première injection d'asparaginase (1000 UE/kg) : détermination de la demi-vie.

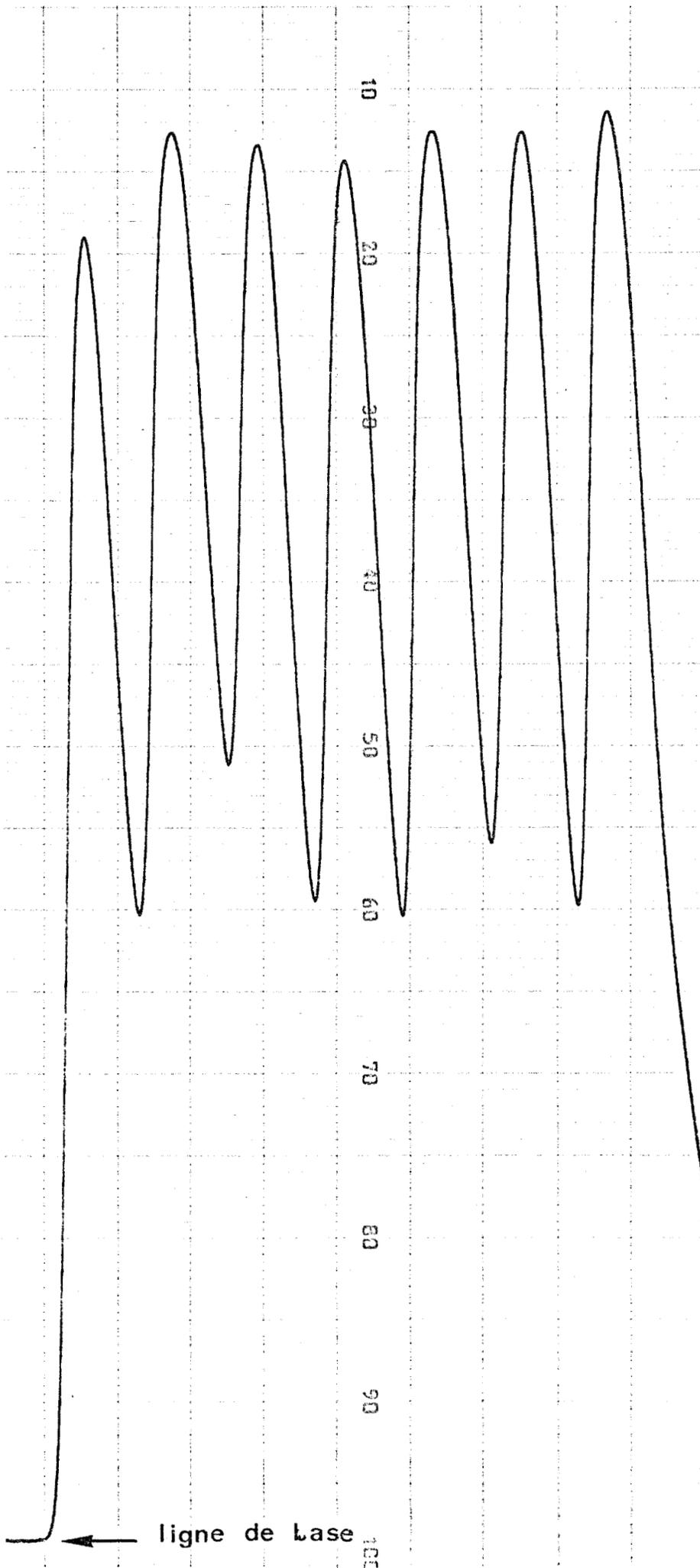


Figure 45 :

Mesure de l'asparaginase effectuée chez un malade leucémique sur les sérums prélevés les 7 premiers jours d'un traitement, 2 heures après chaque injection d'asparaginase à 1000 UE/kg.



par des injections journalières de 1000 UE/kg pendant des temps variables selon les schémas de traitement.

Les prélèvements effectués en vue de la mesure de l'activité asparaginasémique sont réalisés précisément 2 heures après chaque injection.

Chez 4 des 5 malades suivis, aucune variation du taux d'activité enzymatique n'a pu être mis en évidence ; dans tous ces cas le traitement a été parfaitement toléré et aucun anticorps n'a été mis en évidence pendant la période de surveillance.

Les résultats obtenus chez le cinquième malade sont reportés dans le tableau XXIII. ci-dessous.

Jours		1...5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Choc immunologique											
Diminution de l'asparaginasémie											
Technique de recherche des anticorps	Immunodiffusion		-	-			-	-	-	-	-
	Hémagglutination passive au CrCl <sub>3</sub>		-	-							
	Fixation du complément										
	Hémagglutination au latex		-	-							

Tableau XXIII : Etude comparée de la diminution de l'asparaginasémie et de la cinétique d'apparition des anticorps chez un malade dont l'immunisation a été responsable d'un choc anaphylactique.

Nous voyons que la diminution de l'asparaginasémie (fig. 46) a précédé de quatre jours l'apparition d'un choc anaphylactique. La recherche des anticorps par les différentes techniques montre que ceux-ci, dépistés par hémagglutination passive au  $\text{CrCl}_3$  et par agglutination de particules de latex sensibilisées, précèdent également l'apparition du choc de 4 jours, alors que la recherche des anticorps fixant le complément ne le précède que d'un jour et que la recherche des anticorps précipitants par immunodiffusion est restée négative.

De ce seul cas intéressant, il ne nous est pas possible de conclure comme chez le lapin que l'étude de l'asparaginasémie soit capable de dépister l'immunisation avant l'apparition des anticorps.

Il est cependant utile de noter que le dépistage précède l'apparition d'incidents d'intolérance. De plus, cette observation permet de confirmer qu'un choc anaphylactique peut survenir sans que des anticorps précipitants soient mis en évidence ; ceux-ci ne sont d'ailleurs pas apparus chez cette malade.

Ainsi, il apparaît de cette étude préliminaire, dont les résultats concordent avec l'étude expérimentale plus étayée chez l'animal, que le dépistage précoce de l'immunisation doit recourir aux techniques qui sont en définitif le mieux adaptées : mesure de l'asparaginasémie et recherche des anticorps par agglutination de particules de latex sensibilisées par l'asparaginase.

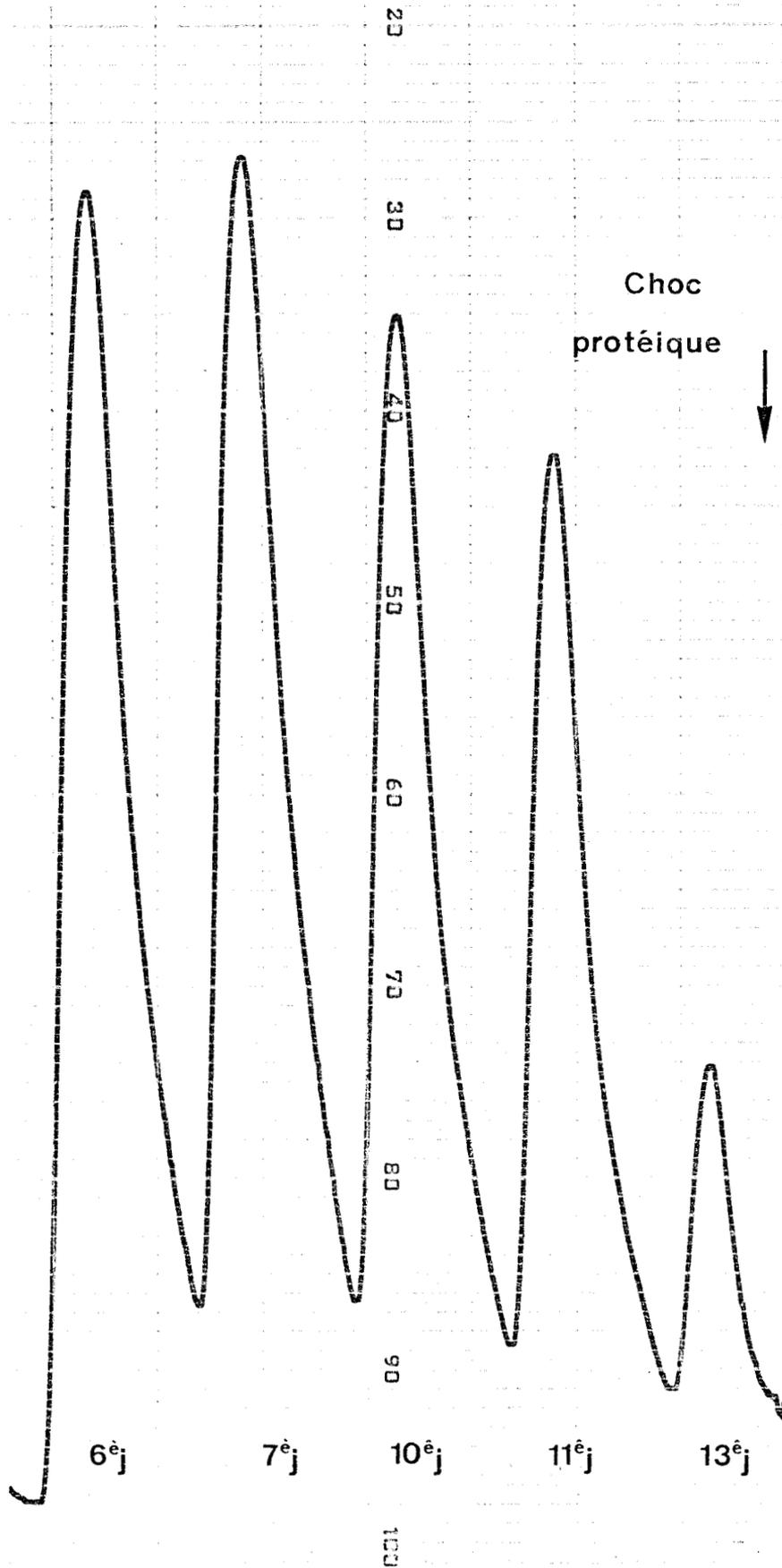


Figure 46 : Mesure de l'asparaginémie sur des sérums prélevés certains jours, deux heures après les injections, chez un malade ayant effectué un choc en cours de traitement.







Il apparaît fondamental dans toutes les expériences qui étudient l'immunosuppression induite par l'asparaginase de suivre en même temps dans des conditions optimales l'immunisation contre cette enzyme, ce qui n'a généralement pas été fait dans nombre d'études expérimentales.

Chez l'homme nous avons vu que cette immunisation est inconstante puisque 14 sur 45 des malades étudiés ont présenté des anticorps anti-asparaginase ; encore faut-il noter qu'il ne s'agit pas de sujets sains mais de sujets atteints de leucémie aiguë qui bénéficient par ailleurs de divers autres thérapeutiques possédant elles-mêmes une activité immunosuppressive.

Chez l'animal la rapidité et l'intensité de cette immunisation est fonction des conditions expérimentales :

- à des doses fortes de 500 UE/kg nous avons constaté comme PUTNER (147) que l'immunisation est favorisée par la répétition espacée des injections
- lors d'injections journalières nombreuses, la rapidité de l'immunisation est fonction inverse de l'importance des doses ; en effet, avec les doses faibles de 10 UE/kg, les anticorps précipitants et hémagglutinants apparaissent en cours d'expérience, alors qu'aux doses plus fortes leur mise en évidence ne peut être effectuée qu'à la fin (pour les doses de 100 UE/kg) ou après (pour les doses de 500 UE/kg) l'arrêt d'une expérience de 18 jours. Ces résultats vont à l'encontre des conclusions de PRATT et coll. (146) qui préconisent les doses fortes espacées.

Il faut noter que chez l'animal immunisé, nous n'avons jamais observé de manifestations de choc anaphylactique susceptible de traduire la présence des anticorps.

Chez l'homme, nous l'avons dit, les faits sont plus complexes. Nous devons signaler que les anticorps anti-asparaginase ne sont apparus que chez les sujets dont la leucémie s'est améliorée sous l'effet des injections d'enzyme nous reviendrons sur la signification éventuelle de cette constatation. Surtout il faut rappeler que dans 8 cas ces anticorps ont été responsables de chocs anaphylactiques sévères.

Chez le lapin comme chez l'homme, les anticorps anti-asparaginase possèdent les mêmes caractéristiques. L'étude quantitative de la précipitation in vitro montre qu'il existe plusieurs populations d'anticorps de nature différente. La spécificité de ces anticorps est bien dirigée contre l'asparaginase, comme il l'a été également démontré par REIS et SCHMIDT (151). Les anticorps précipitants que nous avons étudié ne neutralisent pas l'activité enzymatique de l'asparaginase ; nous pouvons donc confirmer que le site enzymatique est différent du site antigénique qui fait partie de la structure de l'apoenzyme. C'est pourquoi nous avons testé nos anticorps vis-à-vis d'une asparaginase extraite de Mycobacterium phlei. Nous avons vu qu'il existait cependant une communauté antigénique entre ces deux asparaginases qui réagissent avec nos anticorps. La recherche d'une asparaginase de structure très différente devrait donc sans doute être envisagée chez les eucaryotes.

Nous avons démontré que la présence d'anticorps in vivo entraînait une disparition très rapide de l'asparaginase injectée ; une telle constatation a été également rapportée par DOHLWITZ et coll. (53) ainsi que par PETERSON et coll. (141). Cette disparition de l'antigène en présence d'anticorps corres-

pond à l'élimination rapide des complexes antigènes anticorps dont on sait qu'elle est le meilleur témoin d'une immunisation : c'est la notion classique de "l'antigen disappearance rate". C'est pourquoi dans nos expériences nous avons suivi conjointement la cinétique de l'asparaginasémie et l'apparition des anticorps.

Nous avons donc déterminé tout d'abord la durée de vie de l'asparaginase en l'absence d'immunisation. Chez le lapin nous avons estimé la demi-vie comprise entre 6 et 8 h. PUTTER (147) rapporte une demi-vie de 4 h après injections d'une dose unique de 500 UE/kg comme dans notre étude ; l'asparaginase utilisée par ce dernier n'est pas de même fabrication que celle que nous avons utilisée. Chez l'homme nous avons estimé la demi-vie à 9 h 30 et 11 h. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus par SCHWARTZ ( ) avec deux lots différents d'asparaginase ; cependant les résultats obtenus par le même auteur avec deux autres lots s'écartent notablement des précédents bien que les quatre lots utilisés aient été préparés à partir de cultures d'Escherichia coli. Une discordance du même ordre est rapportée par PUTTER (147). Les différences d'origine exacte, de l'asparaginase, (souche d'Escherichia coli utilisée, modalités de préparation) suffisent sans doute à expliquer ces discordances.

Nous avons également montré que chez l'animal en cours d'immunisation, on pouvait observer une chute du taux de l'asparaginasémie : celle-ci est constatée presque en même temps que les anticorps sont dépistés par la technique d'agglutination passive au latex et ceci quelques soient les doses d'asparaginase injectées. Par contre, il n'en est pas de même pour les anticorps mis en évidence

par hémagglutination au  $\text{CrCl}_3$  et par immunodiffusion ; la rapidité d'apparition de ceux-ci est en effet d'autant plus tardive que les doses d'asparaginase sont plus fortes.

D'autre part, nous avons vu que pour les fortes doses d'asparaginase la chute du taux de l'asparaginasémie n'est pas progressive mais se produit en deux temps selon une courbe sigmoïde ce qui pourrait correspondre à l'apparition successive des deux types d'anticorps mis en évidence par les techniques de précipitation quantitative. Chez l'homme, l'étude cinétique de l'asparaginasémie a donné des résultats comparables ayant la même signification ; des résultats analogues ont été rapportés par CAPIZZI et coll. (40).

Enfin, de nos résultats quelques éléments peuvent être tirés en ce qui concerne l'activité immunosuppressive de l'asparaginase. Nous avons en effet vu que les fortes doses d'enzyme répétées journallement pendant un certain temps retardaient de façon significative l'apparition de certains anticorps qui n'apparaissent alors qu'après l'arrêt du traitement. Par ailleurs, nous avons montré que l'asparaginase entraînait une hypoprotidémie touchant plus particulièrement les  $\gamma$ -globulines.

Des expériences préliminaires ont été réalisées chez des lapins soumis à une stimulation antigénique par des  $\gamma$ -globulines humaines au cours d'une série d'injections à différentes doses d'asparaginase. Par rapport aux lapins témoins stimulés par les  $\gamma$ -globulines mais non soumis aux injections d'asparaginase, l'apparition des anticorps précipitants anti- $\gamma$ -globulines est nettement retardée chez les lapins recevant de fortes doses (100 et 500 UE/kg). Ces résultats, peuvent que nous inciter à poursuivre le but que nous nous sommes initialement fixé. Ils montrent de plus à quel point il est nécessaire de suivre parallèlement et par de multiples techniques et expériences les deux aspects du problème ; l'interprétation des résultats de l'immunisation ne pouvant certainement pas faire abstraction du pouvoir immunosuppresseur de l'asparaginase et inversement.





- 1 - ALTENBERN R.A. and ROUSENRIGHT R.D.  
Stereospecific asparaginase in smooth Brucella abortus S.19.  
Arch. Biochem., 1954, 49, 130.
- 2 - ANDREWS T., CHANG P.K. and HANDSCHUMAKER R.E.  
Synthesis of radioactive 5-diazo 4-oxo L-norvaline and metabolic studies with this asparagine analog.  
Abs. Paper Amer. Chem. Soc., 1967, 154, 160.
- 3 - ARCAND G.M. and SWIFT E.H.  
Coulometric titration of ammonia with hypobromite.  
Anal. Chem., 1956, 28, 440.
- 4 - ARENS A., RAUENBUSCH E., IRION E., WAGNER O., BAVER K. and KAUFMAN W.  
Isolation and properties of L-asparaginase from Escherichia coli.  
Z. Physiol., Chem., 1970, 351, 197.
- 5 - ARFIN S.M.  
Asparagine synthesis in chick embryo liver.  
Biochem. Biophys. Acta., 1957, 136, 233.
- 6 - ASMAR  
The properties of glutaminase and asparaginase of a Pseudomonad and the mechanism of their action in suppressing tumor growth.  
Univ. Microfilms order n° 65.8432, 144 p et dissertation abst.,  
1965, 26, 1317.
- 7 - ASTALDI G., BRUCKNER I., MICU D., MAXIMILLIAN S., LEAHU S. and BURGIO G.R.  
L-asparaginase and germinal centers.  
Boll. Ist. Sieroterap., 1970, 49, 22.

- 8 - ASTALDI G., BURGIO G.R., BISCALLI G., ASTALDI A., and FERGLIO I.  
L-asparaginase and blastogenesis.  
Lancet, i, 1969, 643.
- 9 - ASTALDI G., SURGIO G.R., KRČ J., GENOVA R. and ASTALDI A.A.  
L-asparaginase and blastogenesis.  
Lancet, i, 1969, 423.
- 10 - AUR R.J., SIMONE J.V. and PRATT C.B.  
Successful remission induction in children with acute lymphocytic  
leukemia at high risk for treatment failure.  
Cancer, 1971, 27, 1332.
- 11 - BACH J.F., LABORDE M.A. et DORMONT J.  
Mode d'action des immunosuppresseurs.  
G.M. de France, 1971, 78, 47.
- 12 - BEARD M.E.J., CROWTHER D., GALTON D.A.G., GUYER R.J., FAIRLEY G.H.,  
KAY H.E.M., KNAPTON P.J., MALPAS J.S. and SCOTT R.B.  
L-asparaginase in treatment of acute leukemia and lymphosarcoma.  
Brit. Med. J., 1970, I, 191.
- 13 - BEAUMONT J.L., BAUDET M.F., DELPLANQUE B. et PERON F.  
L'hémagglutination passive au chlorure de chrome. Son emploi  
sans diluant macro-moléculaire.  
Path. Biol., 1969, 17, 429.
- 14 - BERENBAUM M.C.  
Immunosuppression by L-asparaginase.  
Nature, 1970, 225, 550.
- 15 - BEREZOV T.T.  
Glutaminase and asparaginase activity in normal tissues and  
malignant tumors.  
Ukr. Biokhim. Zb., 1966, 38, 484.

- 16 - BERNARD J., JACQUILLAT Cl., BOIRON M., WEIL M., BUSSEL A.,  
LARRIEU M.J., DELOBEL J., GOGUEL A., LEVY D. et TANZER J.  
Traitement des leucémies aiguës par la L-asparaginase.  
Résultats préliminaires portant sur 84 cas.  
Presse Méd., 1970, 78, 161.
- 17 - BERTHELOT M.P.E.  
Rapport de Chimie appliquée.  
Paris, 1859, 1, 254.
- 18 - BERTILLI A., DONATI L., TAIDELLI G.A. and TRABUCCHI E.Jr.  
Prolongation of skin allograft survival in C<sub>57</sub>BL and C3H mice  
by L-asparaginase treatment.  
Transplantation, 1971, 11, 106.
- 19 - BETTIGOLE R.E., HIMMELSTEIN E.S. and OETTGEN H.F.  
Hypofibrinogemia due to L-asparaginase : studies of fibrinogen  
survival using autologous <sup>131</sup>I fibrinogen.  
Blood, 1970, 35, 195.
- 20 - BIERLING R.  
Experimental investigations on problems of the clinical use of  
L-asparaginase.  
Recent results in cancer research (33). Edited by GRUNDMANN E.  
and OETTGEN H.F. Springer-verlag. Berlin Heidelberg New York  
1970, 114.
- 21 - BILIMORIA M.H.  
Conditions for the production of L-asparaginase 2 by Coliform  
bacteria.  
Appl. Microbiol., 1969, 18, 1025.
- 22 - BOYD J.W. and PHILIPS A.W.  
Inhibition of lymphoma 6C3 HED by L-asparaginase form  
Serratia marcescens.  
J. Nat. Cancer Inst., 1971, 46, 1271.

- 23 - BOYD J.W. and PHILIPS A.W.  
Purification and properties of L-asparaginase from Serratia marcescens.  
J. Bact., 1971, 106, 578.
- 24 - BOYSE E.A., OLD L.J. and STOCKERT E.  
Inhibitory effect of guinea pig serum on a member of new leukemias in mice.  
Nature, 1963, 198, 800.
- 25 - BOYSE E.A., OLD L.J., CAMPBELL H.A. and MASHBURN L.T.  
Suppression of murine leukemias by L-asparaginase. Incidence of sensitive among leukemias of various types : comparative inhibitory activities of guinea pig serum L-asparaginase and Escherichia coli L-asparaginase.  
J. Exptl. Med., 1967, 125, 17.
- 26 - BRAMBILLA G., PARODI S., CAVAINA M., CARACENI C.E. and BALDINI L.  
The immunodepressive activity of Escherichia coli L-asparaginase in some transplantation systems.  
Cancer Res., 1970, 30, 2665.
- 27 - BRODSKY I., KHAN S.B., VASH G., ROSSE E.M. and PETKOU G.  
Fibrinogen survival with (<sup>75</sup>Se) selenomethionine during L-asparaginase therapy.  
Brit. J. Haematol., 1971, 20, 477.
- 28 - BROOME J.D.  
Evidence that the asparaginase activity of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects.  
Nature, 1961, 191, 1114.
- 29 - BROOME J.D.  
Evidence that the L-asparaginase of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects : I. Properties of the L-asparaginase of guinea pig serum in relation to those of the antilymphoma substance.  
J. Exp. Med., 1963, 118, 99.

30 - BROOME J.D.

Evidence that the L-asparaginase of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects : II. Lymphoma 6C3 HED cells cultured in a medium devoid of asparagine lose their susceptibility to the effects of guinea pig serum in vivo. J. Exp. Med., 1963, 118, 121.

31 - BROOME J.D.

Antilymphoma activity of L-asparaginase in vivo : clearance rates of enzyme preparations from guinea pig serum and yeast in relation to their effect on tumor growth. J. Natl. Cancer Institute, 1965, 35, 967.

32 - BROOME J.D. and SCHWARTZ J.H.

Differences in the production of L-asparagine in asparaginase sensitive and resistant lymphoma cells. Biochem. Biophys. Acta, 1967, 138, 637.

33 - BROOME J.D.

Factors which may influence the effectiveness of L-asparaginase as tumor inhibitors. Brit. J. Cancer, 1968, 22, 595.

34 - BROOME J.D.

L-asparaginase : early findings and current studies and the metabolism of L-asparagine in lymphoma cells. Recent results in cancer Research (33). Edited by GRUNDMANN E. and OETTGEN H.F. Springer verlag. Berlin Heidelberg New York, 1970, 15.

35 - BROWN H.D., CHATTOPADHAY S.K. and MATTHEWS W.S.

L-asparaginase activity in several mammalian species. Int. J. Biochem., 1970, I, 357.

- 36 - BURCHALL J.J., REICHELT E.C. and WOLIN M.J.  
Purification and properties of the asparaginase synthetase of  
Streptococcus bovis.  
J. Biol. Chem., 1964, 239, 1794.
- 37 - BURGIO G.R., ASTALDI A.A. Jr., KRC I., MICU D. and ASTALDI G.  
L-asparaginase and inhibition of the lymphocyte immune reaction.  
Farmaco, 1970, 25, 85.
- 38 - CAMPBELL H.A., MASHBURN L.T., BOYSE E.A. and OLD L.J.  
Two L-asparaginases from Escherichia coli B. Their separation,  
purification and anti-tumor activity.  
Biochemistry, 1967, 6, 721.
- 39 - CAPIZZI R.L., PETERSON R.G., COONEY D.A., CREASEY W.A. and  
HANDSCHUMACHER R.E.  
L-asparaginase therapy of acute leukemia : biochemical and  
clinical observations.  
Proc. Amer. Ass. Cancer Res., 1969, 10, 12.
- 40 - CAPIZZI R.L., BERTINO J.R., SKEEL R.T., CREASEY W.A., Ph. D.,  
ZANES R., OLAYON C., PETERSON R.G. and HANDSCHUMACHER R.E.  
L-asparaginase : clinical, biochemical, pharmacological and  
immunological studies.  
Ann. of Int. Med., 1971, 74, 893.
- 41 - CARCASONNE et LAGLACE  
Expérience de la L-asparaginase dans le traitement des  
hémopathies malignes.  
Marseille Méd., 1971, 108, 7.

- 42 - CEDAR H. and SCHWARTZ J.H.  
Localization of the two L-asparaginases in anaerobically grown  
Escherichia coli.  
J. Biol. Chem., 1967, 242, 3753.
- 43 - CHAKRABARTY A.K. and FRIEDMAN H.  
L-asparaginase induced immunosuppression : effects on antibody-  
forming cells and serum titers.  
Science, 1970, 167, 869.
- 44 - CHANG T.M.S.  
The in vivo effects of semi-permeable microcapsules containing  
L-asparaginase on 6C3 HED lymphosarcoma.  
Nature, 1971, 229, 117.
- 45 - CHRISTIAN G.D., KNOBLOCK E.C. and PURDT W.C.  
A coulometric determination of urea nitrogen in blood and urine.  
Clin. Chem., 1965, 11, 700.
- 46 - CLEMENTI A.  
Desamination enzymatique de l'asparagine.  
Arch. Int. Physiol., 1922, 19, 369.
- 47 - COLOMBANI M., COLOMBANI J., DELHAY C. and DAUSSET J.  
A micro-technique of platelet complement fixation. Results  
obtained with sera and eluates as the source of antibody.  
Histocompatibility testing, (Minkgaard, Ed.), 1970, 533.
- 48 - CONARD J., SAMANA M., BILSKI-PASQUIER G. and BOUSSER J.  
Le test de gélification du plasma par l'alcool dans le  
diagnostic des coagulations intra-vasculaires disséminées.  
Presse Méd., 1971, 79, 1123.

- 49 - CONARD J., SAMANA M., BILSKI-PASQUIER G. et BOUSSER J.  
Toxicité in vivo de la L-asparaginase sur les facteurs de la  
coagulation et en particulier sur l'antithrombine III.  
Coagulation, 1971, 4, 195.
- 50 - COONEY D.A., CAPIZZI R.L. and HANDSCHUMACHER R.E.  
Evaluation of L-asparagine metabolism in animals and man.  
Cancer Res., 1970, 30, 929.
- 51 - DE BARROST T., CUNHA-FILHO M., FERREIRA De SANTANA C., VALENCI M.,  
PEIRERA DA SILVA, GUESDES J. et De CARVALHO A.R.L.  
Utilização da L-asparaginase en paciente humano portador de  
neoplasia maligna.  
An. Fac. Med. Univ. Recife, 1965, 25, 21.
- 52 - DEUTSCH E., FRISCHAUF H., HONETZ N., LECHNER K. and WEIBMANN A.  
The nature of the blood coagulation defect induced by treatment  
with L-asparaginase. In : XIII<sup>th</sup> International Congress of  
Hematology.  
Abstract, Munich 1970, 239.
- 53 - DOHLWITZ A., FRANZEN S., HOLMGREN A., KILLANDER A., KILLANDER D.,  
WIDE L. and ÅHSTRÖM L.  
Study on antibody formation in patients treated with L-asparaginase  
Recent results in cancer research (33). Edited by GRUNDMANN E.  
and OETTGEN H.F. Springer-verlag. Berlin Heidelberg New York  
1970, 198.
- 54 - DOLOWY W.C., HENSON D., CORNET J. and SELLIN H.  
Toxic and antineoplastic effects of L-asparaginase. Studies  
of mice with lymphoma and normal monkeys and a report on a child  
with leukemia.  
Cancer, 1966, 19, 1813.

- 55 - DUMAS J.  
Les animaux de laboratoire.  
Eds Flammarion, 1953, 36.
- 56 - DUNNICLIFF M.A., EIGER E.A., JAFFE N., TRAGGIS D. and ROSENBERG V.M.  
Plasma asparagine concentrations and the prediction of  
anaphylactic reactions.  
Proc. Amer. Ass. Cancer Res., 1970, II, 22.
- 57 - EAGLE H., WASHINGTON D., LEVY M. and COHEN L.  
The population dependent requirement by cultured mammalian  
cells for metabolites which they can synthesize L-glutamic acid  
and glutamine, aspartic acid and asparagine.  
J. Biol. Chem., 1966, 241, 4994.
- 58 - EPP O., STEIGEMANN W., FORMANCK H. and HUBER R.  
Crystallographic evidence for the tetrameric subunit structure  
of L-asparaginase from Escherichia coli.  
Eur. J. Biochem., 1971, 20, 432.
- 59 - ETHEREDGE E.E., SHONS A., HARRIS N. and NAJARIAN J.S.  
Prolongation of skin xenograft survival by L-asparaginase.  
Transplantation, 1971, II, 353.
- 60 - FRIEDMAN H. and CHAKRABARTY A.K.  
Immunosuppressive effects of bacterial asparaginase on antibody  
formation and allograft immunity.  
Immunology, 1971, 21, 989.
- 61 - GEORGE W. and WELTON K.W.  
Purification and concentration of Dye-Protein conjugates  
by gel filtration.  
Nature, 1961, 192, 1188.

- 62 - GIRI K.V., RADHKRISHNAN A.N. and VAIDYA NATHAN C.S.  
A simple paper chromatographic method for the study of  
transamination reactions.  
Nature Lond., 1952, 170, 1025.
- 63 - GLOSSMANN, HARTMUT and WOLFRAM BODE  
L-asparaginase A from Escherichia coli. The molecular weight  
of the subunit and the demonstration of an intramolecular disulfide  
bridge.  
Hope Seyler'S Z Physiol. Chem., 1971, 352, 132.
- 64 - GOUDEMAMM M., BAUTERS F. et LERCHE B.  
Les résultats du traitement des leucémies aiguës lymphoblastiques  
de l'enfant.  
Lille Médical, 1972, 17, 220
- 65 - GRALNICK H.R. and HENDERSON E.  
Hypofibrinogenemia and coagulation factor deficiencies with  
L-asparaginase treatment.  
Cancer, 1971, 27, 1313.
- 66 - GRALNICK H.R. and HENRY P.H.  
L-asparaginase induced coagulopathy.  
Proc. Amer. Assoc. Cancer Res., 1969, 10, 32.
- 67 - GUHA S.R., SAXIMA R.P. and GHATAK S.  
Asparaginase activity of Salmonella typhosa.  
J. Sci. Ind. Res., 1962, 216, 228.
- 68 - HALL J.G.  
The partitioning of L-asparaginase between blood and lymph.  
Recent results in cancer research (33). Edited by GRUNDMANN E.  
and OETTGEN H.F. Springer-verlag. Berlin Heidelberg New York  
1970, 75.

- 69 - HANSS M. et REY A.  
Application de la méthode conductimétrique à certains dosages enzymatiques.  
2ème Congrès Français d'Electronique Médicale et de Génie Biologique, Nancy, 1969.
- 70 - HARDY W.D. and OLD L.J.  
L-asparaginase in the treatment of neoplastic diseases of the dog, cat and cow.  
Recent results in cancer research (33). Edited by GRUNDMANN E. and OETTGEN H.F. Springer-verlag. Berlin Heidelberg New York, 1970, 31.
- 71 - HASKELL C.M., CANELLOS G.P., LEVENTHAL B.G., CARBONE P.P., SERPICK A.A. and HANSEN H.H.  
L-asparaginase toxicity.  
Cancer Res., 1969, 29, 974.
- 72 - HASKELL C.M., CANELLOS G.P., LEVENTHAL B.G., CARBONE P.P., SERPICK A.A. and SELAWRY O.S.  
L-asparaginase. Therapeutic and toxic effects in patients with neoplastic disease.  
N. Engl. J. Med., 1969, 281, 1028.
- 72bis - HASKELL C.M., CANELLOS Y.P., COONEY D.A. and HANSEN H.H.  
Biochemical and pharmacological effects of L-asparaginase in man.  
J. Lab. Clin. Med., 1970, 75, 763.
- 73 - HERBUT P.A. and KRAEMER W.H.  
The effects of animals serums on lymphosarcoma 6C3 HED in C3H mice.  
Am. J. Pathol., 1958, 34, 767.
- 74 - HERSH E.M.  
Immunosuppression by L-asparaginase and related enzymes.  
Transplantation, 1971, 12, 368.

- 75 - HILL J.M., ROBERTS J., LOEB E., KHAN A., Mc LELLAN A. and HILL R.W.  
L-asparaginase therapy for leukemia and other malignant neoplasms. Remissions in human leukemia.  
J.A.M.A., 1967, 202, 882.
- 76 - HO P.P.K., FRANK B.H. and BURCK P.J.  
Crystallin L-asparaginase from Escherichia coli B.  
Science, 1969, 165, 510.
- 77 - HO D.H.W., THETFORD B., CARTER C.J.K. and FREI E.  
Clinical pharmacologic studies of L-asparaginase.  
Clin. Pharmacol. Ther., 1970, II, 408.
- 78 - HOBİK H.P.  
Immunosuppressive Wirkung von L-asparaginase in der graft-versus-host reaktion.  
Naturwissenschaften, 1969, 56, 279.
- 79 - HOFFMAN G.  
Les animaux de laboratoires.  
Ed. VIGOT Frères, 1963, 119.
- 80 - HOLMQUIST N.D.  
Effect of normal sera of several related rodents on 6C3 HED lymphoma in vivo.  
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 1963, 113, 444.
- 81 - HORNEZ J.P.  
Etude sur l'asparaginase de Mycobacterium phlei.  
D.E.A de Biochimie, Lille, 1970.
- 82 - HORNEZ J.P. et LAMBERT G.  
Mise en évidence de la L-asparaginase chez Mycobacterium phlei.  
Ann. Inst. Pasteur Lille, 1971, XII, 313.

- 83 - HORNEZ J.P., LAMBERT G. et DELMAS-MARSALET Y.  
Purification de la L-asparaginase de Mycobacterium phlei et mise en évidence de communautés antigéniques avec l'enzyme d'Escherichia coli.  
C.R. Soc. Biol. (à paraître).
- 84 - HOROWITZ B., MADRAS B.K., MEISTER A., OLD L.J., BOYSE E.A. and STOCKERT E.  
Asparagine synthetase activity of mouse leukemias.  
Science, 1968, 160, 533.
- 85 - JACKSON R.C. and HANDSCHUMACKER R.E.  
Escherichia coli L-asparaginase : catalytic activity and subunit nature.  
Biochemistry, 1970, 9, 3585.
- 86 - JAFFE N., TRAGGIS D., DAS L., MOLONEY W.C., HANN H.W., KIM B.S. and HAIR R.  
L-asparaginase in the treatment of neoplastic diseases in children.  
Cancer Res., 1971, 31, 942.
- 87 - JAMESON E., AHIS H. and RYAN R.M.  
Action of guinea pig serum and human gamma globulin on the growth of a rat tumor.  
Science, 1956, 124, 980.
- 88 - JAYARAM H.N., RAMAKRISHNAN T. and VALDIYANATHAN C.S.  
L-asparaginases from Mycobacterium tuberculosis strains H 37 RV and H 37 RA.  
Arch. Biochem., 1968, 126, 165.
- 89 - KACZURBA E.  
L-asparaginase production by various species of Salmonella.  
Acta Microbiol. Polon., 1971, 3, 135.

90 - KATZ S.A. and COWANS J.A.

Direct potentiometric study of the urea-urease system.  
Biochim. Biophys. Acta, 1965, 107, 605.

91 - KHAN A. and HILL J.M.

Neutralizing precipitin in the serum of a patient treated  
with L-asparaginase.  
J. Lab. Clin. Med., 1969, 73, 846.

92 - KHAN A. and HILL J.M.

Suppression of skin hypersensitivity and antibody formation  
by L-asparaginase.  
J. of Immunology, 1970, 104, 679.

93 - KHAN A., HILL J.M. and ADACHI M.

L-asparaginase in experimental auto-immune disease : inhibition  
of allergic encephalomyelitis.  
J. of Immunology, 1970, 105, 256.

94 - KHAN A.A., PAL S.P., RAGHAVAN S.R.V. and BHATTACHARYYA P.K.

Studies on Serratia marcescens L-asparaginase.  
Biochem. Biophys. Res. Com., 1964, 17, 525.

95 - KIDD J.G.

Regression of transplanted lymphomas induced in vivo by means of  
normal guinea pig serum : I. Course of transplanted cancers of  
various kinds on mice and rats given guinea pig serum horse  
serum or rabbit serum.  
J. Exp. Med., 1953, 98, 565.

96 - KIDD J.G.

Regression of transplanted lymphomas induced in vivo by means of  
normal guinea pig serum : II. Studies on the nature of the active  
serum constituent histological mechanism of the regression, tests  
for effects of guinea pig serum on lymphoma cells "in vitro".  
J. Exp. Med., 1953, 98, 582.

- 97 - KIDD J.G. and SOBIN L.H.  
Incorporation of L-asparagine  $^{14}\text{C}$  lymphoma 6C3 HED.  
Cancer Res., 1966, 26, 208.
- 98 - KIRCHEIMER W.F. and WHITTAKER C.K.  
Asparaginase of Mycobacteria.  
Ann. Rev. Tuberc., 1954, 70, 720.
- 99 - LABOUREUR P.  
Biochemistry of asparaginase. Properties of the asparaginase  
system and biological activity.  
Path. Biol., 1969, 17, 885.
- 100 - LASH E., SCHWARTZ M.K., TALLAL L. and OETTGEN H.F.  
Serum lipides in patients receiving L-asparaginase.  
Program of the XIIth Congress of the International Society  
of Hematology, New York, 1968, 10.
- 101 - LAW A.S.  
Thesis, University of Delaware, 1969.
- 102 - LEES E.M. and BLAKEMEY A.B.  
The distribution of asparaginase activity in legumes.  
Biochem. Biophys. Acta, 1970, 215, 145.
- 103 - LEVIN B. and MERRILL J.P.  
Immunosuppressive activity of L-asparaginase.  
Transplantation, 1971, 12, 141.
- 104 - LEVINTON L.  
Evidence that glutamine is a precursor of asparagine in a human  
cell in tissue culture.  
Science, 1957, 126, 611.

- 105 - LONG C.  
Biochemist's Handbook, 1961, London.
- 106 - LORKE D. and TETTENBORN D.  
Experimental studies on the toxicity of crasnitin in animals.  
Recent results in cancer research (33). Edited by GRUNDMANN E.  
and OETTGEN H.F. Springer-verlag. Berlin Heidelberg New York, 1970.
- 107 - LUBOCHINSKY B. et ZALTA J.P.  
Microdosage colorimétrique de l'azote ammoniacal.  
Bull. Soc. Chim. Biol., 1954, 36, 1363.
- 108 - MAC'ELWAIN T.J. and HAYWARD S.K.  
L-asparaginase and blastogenesis.  
Lancet, 1969, I, 527.
- 109 - MARDASHEV P.R. and LESTROVAYA H.N.  
Biological synthesis of asparagine and glutamine by transamination.  
Dokl. Akad. Nauk., 1951, 78, 547.
- 110 - MASHBURN L.T. and GORDON C.S.  
Effect of asparaginase on protein synthesizing system of  
P 1798 lymphosarcoma.  
Fed. Proc., 1967, 26, 807.
- 111 - MASHBURN L.T. and GORDON G.S.  
The effect of L-asparaginase on the amino-acids incorporation  
of mouse lymphoid tumors.  
Cancer Res., 1968, 28, 961.

- 112 - MASHBURN L.T. and LANDIN L.M.  
Some physicochemical aspects of L-asparaginase therapy.  
Recent results in cancer research (33). Edited by GRUNDMANN E.  
and OETTGEN H.F. Springer-verlag. Berlin Heidelberg New York  
1970, 48.
- 113 - MASHBURN L.T. and WRISTON J.C.  
Tumor inhibitory effect of L-asparaginase from E. coli.  
Arch. Biochem. Biophys., 1964, 105, 451.
- 114 - MATHE G., AMIEL J.L., CLARYSSE A., HAYAT M., SCHWARZENBERG L.  
et SCHNEIDER M.  
La L-asparaginase dans le traitement des leucémies aiguës.  
Sem. Hop. Paris, 1971, 46, 1135.
- 115 - MATHE G., AMIEL J.L., SCHWARZENBERG L., SCHNEIDER M., CATTAN A.,  
SCHLUMBERGER J.R., HAYAT M., VASSAL F.D., JASMIN C. et ROSENFELD C.  
Essai de traitement de la leucémie aiguë lymphoblastique par la  
L-asparaginase.  
Presse Méd., 1969, 77, 461.
- 116 - MAUREEN L.B., BOLGER DENISE C. and BRIDGES J.M.  
Factors influencing the in vitro enhancement of L-asparaginase  
activity.  
Biochim. Biophys. Acta, 1971, 242, 226.
- 117 - MEISTER A.  
Biochemistry of amino-acids, Acad. Press New York, 1965, 605.
- 118 - MEISTER A. and FRASER P.E.  
Enzymatic formation of L-asparagine by transaminase.  
J. Biol. Chem., 1954, 210, 37.

- 119 - MIURA M., HIRANO M., KAKIZAWA K., MORITA A., VETANI T. and YAMADA K.  
Inhibitory effect of L-asparaginase in lymphocyte transformation induced by phytohemagglutinin.  
Cancer Res., 1970, 30, 768.
- 120 - MONTALVO J.G.  
Electrode for measuring urease enzyme activity.  
Anal. Chem., 1969, 41, 2093.
- 121 - MOURE J.M.B., WHITECAR J.P. Jr. and BODEY P.  
Electroencephalogram changes secondary to asparaginase.  
Arch. Neurol., 1970, 23, 365.
- 122 - MULLER-BERAT C.N.  
Immunosuppressive action of L-asparaginase studied by means of the localized hemolysis in gel assay.  
Acta Pathol. Microbiol. Scand., 1969, 77, 750.
- 123 - NELSON S.D., MAUREEN B.L. and BRIDGES J.M.  
Immunosuppressive activity of L-asparaginase in mice.  
Transplantation, 1970, 9, 566.
- 124 - NESSLER  
Verhalten des Knechsilbergodids zu ammoniak.  
Freiburg, 1856.
- 125 - NORTH A.C.T., WADE H.E. and CAMMACK K.A.  
Physicochemical studies of L-asparaginase from Erwinia carotovora.  
Nature, 1969, 224, 594.
- 125 - OETTGEN H.F. und SCHULTEN H.K.  
Hemmung maligner neoplasien der Menschen durch L-asparaginase.  
Klin. Wschr., 1969, 47, 65.

- 126 - OETTGEN H.F., OLD L.J., BOYSE E.A., CAMPBELL H.A., PHILIPS F.S.,  
CLARKSON B.D., TALLAL L., LUPER R.D., SWARTZ M.K. and KIM J.H.  
Inhibition of the leukemias in man by L-asparaginase.  
Cancer Res., 1967, 27, 2619.
- 127 - OETTGEN H.F., SEPHENSON P.A., SCHWARTZ M.K., LEEPER R.D., TALLAL L.,  
TAN C.C., CLARKSON B.D., GOLBEY R.B., KRAKOFF I.H., KARNOFSKY D.A.,  
MURPHY M.L. and BURCHENAL J.H.  
Toxicity of Escherichia coli L-asparaginase in man.  
Cancer, 1970, 25, 253.
- 128 - OETTGEN H.F., TALLAL L., TAN C.C., MURPHY M.L., CLARKSON B.D.,  
GOLBEY R.D., KRAKOFF I.H., KARNOFSY D.A. and BURCHEWAL J.H.  
Chemical experience with L-asparaginase.  
Recent results in cancer research (33). Edited by GRUNDMANN E.  
and OETTGEN H.F. Springer-verlag. Berlin Heidelberg New York  
1970, 219.
- 129 - OHNO R. and HERSH E.M.  
Immunosuppressive effects of L-asparaginase.  
Cancer Res., 1970, 30, 1605.
- 130 - OHNO R. and HERSH E.M.  
The inhibition of lymphocyte blastogenesis by L-asparaginase.  
Blood, 1970, 35, 250.
- 131 - OHNUMA T., BERGEL F. and BRAY R.C.  
Enzymes in cancer. Asparaginase from chicken liver.  
Biochem. J., 1967, 103, 238.
- 132 - OHNUMA T., HOLLAND J.F., FREEMAN A. and SINKS L.F.  
Biochemical and pharmacological studies with asparaginase in man.  
Cancer Res., 1970, 30, 2297.

- 133 - OLD L.J., BOYSE E.A. and CAMPBELL H.A.  
L-asparaginase and leukemia.  
Sci. Amer., 1968, 219, 34.
- 134 - OLD L.J., BOYSE E.A., CAMPBELL H.A. and DARIA G.M.  
Leukemia inhibiting properties and L-asparaginase activity of  
sera from certain south american rodents.  
Nature, 1963, 198, 801.
- 135 - OLD L.J., BOYSE E.A., CAMPBELL H.A., BRODEY R.S., FILDER J. and TELLER J.D.  
Treatment of lymphosarcoma in the dog with L-asparaginase.  
Cancer, 1967, 20, 1066.
- 136 - OTT J.L.  
Asparaginase from mycobacteria.  
J. Bact., 1960, 80, 355.
- 137 - OUCHTERLONY O.  
Diffusion in gel methods for immunological analysis.  
Progress in Allergy, New York, 1958, 5, 1.
- 138 - PATTERSON M.K. and ORR G.  
Asparagine biosynthesis by the Novikoff hepatoma. Isolation,  
purification, property and mechanism studies of the enzyme system.  
J. Biol. Chem., 1968, 243, 376.
- 139 - PESEZ M. et POIRIER P.  
Méthodes et réactions de l'analyse organique.  
Masson et Cie, 1954, 3, 39.
- 140 - PETERSON R.E. and CIEGLER A.  
L-asparaginase production by Erwinia aroidea.  
Proc. Bioch., 1968, 24. International fermentation symposium.

- 141 - PETERSON R.G., HANDSCHUMACKER R.E. and MITCHELL M.S.  
Immunological responses to L-asparaginase.  
J. of Clin. Invest., 1971, 50, 1080.
- 142 - PRAGER M.D. and BACHYNSKY N.  
Asparagine-synthetase in asparaginase resistant and susceptible  
mouse lymphomas.  
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1968, 31, 1.
- 143 - PRAGER M.D. and DERR I.  
Inhibition of primary antibody response by Escherichia coli  
asparaginase.  
Nature, 1970, 225, 952.
- 144 - PRAGER M.D. and DERR I.  
Metabolism of asparagine, aspartate, glutamine and glutamate in  
lymphoid tissue : basis for immunosuppression by L-asparaginase.  
J. of Immuno., 1971, 106, 975.
- 145 - PRATT C.B. and WARREN W.J.  
Duration and severity of fatty metamorphosis of the liver follo-  
wing L-asparaginase therapy.  
Cancer, 1971, 28, 361.
- 146 - PRATT C.B., SIMONE J.V., ZEE P., AUR R.J.A. and JOHNSON W.W.  
Comparaison of daily versus weekly L-asparaginase for the treatment  
of childhood acute leukemia.  
J. Pediat., 1970, 77, 474.
- 147 - PÜTTER J.  
Pharmacokinetic behavior of L-asparaginase in men and in animals.  
Recent results in cancer research (33). Edited by GRUNDMANN E.  
and OETTGEN H.F. Springer-verlag. Berlin Heidelberg New York  
1970, 64.

- 148 - RAPAPORT F.T., SHIMADA T. and WATANABE K.  
Prolongation of canine renal allograft survival by L-asparaginase.  
Transplantation, 1971, 12, 217.
- 149 - RAVEL J.M., HORTON S.J., HUMPHREYS J.S. and SHIVE W.  
Asparagine biosynthesis through enzyme inhibition and repression.  
J. Biol. Chem., 1962, 237, 2845.
- 150 - REDDY U.V.S., JAYARAM H.N., SIRSI M. and RAMAKRISHNAN T.  
Inhibitory activity of L-asparaginase from Mycobacterium tuberculosis  
on Yoshida arcites sarcoma in rats.  
Arch. Biochem. Biophys., 1969, 132, 262.
- 151 - REIS H.E., BRAUN W. and SCHMIDT C.G.  
The antigenicity of E. coli asparaginase.  
Rev. Fr. Etude Clin. Biol., 1969, 14, 906.
- 152 - RINDERNECHT H.  
Ultra-rapid fluorescent labelling of proteins.  
Nature, 1962, 193, 167.
- 153 - ROBERTS J., BURSON G. and HILL J.M.  
New procedures for purification of L-asparaginase with high-  
yield from Escherichia coli.  
J. Bact., 1968, 95, 2117.
- 154 - ROBERTS J., PRAGER M.D. and BACHYNSKY N.  
The antitumor activity of Escherichia coli L-asparaginase.  
Cancer Res., 1966, 26, 2213.
- 155 - ROBINSON R.S. and BERK B.  
L-asparaginase synthesis by E. coli B.  
Proc. Biochem., 1968, 24. International fermentation symposium.

- 156 - ROWLEY B. and WRISTON J.C.  
Partial purification and antilymphoma activity of Serratia marcescens L-asparaginase.  
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1967, 28, 160.
- 157 - RUSSEL J.A.  
The colorimetric estimation of small amounts of ammonia by the phenol hypochlorite reaction.  
J. Biol. Chem., 1944, 156, 457.
- 158 - RYAN W.L. and SORNSEN H.L.  
Glycin inhibition of L-asparaginase.  
Science, 1970, 167, 1512.
- 159 - SCHEETZ R.W.  
Thesis, University of Delaware, 1969.
- 160 - SCHEIN P.S., RAKIANTEN N., GORDON B.M., DAVIES R.D. and RALL D.P.  
The toxicity of Escherichia coli L-asparaginase.  
Cancer Res., 1969, 29, 426.
- 161 - SCHREK R., DOLOWY W.C. and AMTERAAL R.N.  
L-asparaginase : toxicity to normal and leukemia human lymphocytes.  
Science, 1967, 155, 329.
- 162 - SCHREK R.  
Cytotoxicity of heterologous sera to normal and leukemia human lymphocytes.  
Nature, 1958, 182, 724.
- 163 - SCHWARTZ M.K.  
The distribution and clearance of L-asparaginase.  
Recent results in cancer research (33) Edited by GRUNDMANN E. and OETTGEN H.F. Springer-verlag. Berlin Heidelberg New York 1970, 58.

- 164 - SCHWARTZ R.S.  
Immunosuppression by L-asparaginase.  
Nature, 1969, 224, 275.
- 165 - SCHWARTZ J.H., REEVES J.Y. and BROOME J.D.  
Two L-asparaginases from Escherichia coli and their action against tumors.  
Proc. Nat. Acad. Sci., 1966, 56, 1516.
- 166 - SEVER J.L., SHANBROM E., STEINMEIER R., SCHACHER S.A., Mc CRACKEN G. and FUCCILLO D.A.  
Latex reagent for determining IgM levels in cord and newborn sera.  
J. of Immunology, 1969, 102, 679.
- 167 - SCHEIDEGGER J.J.  
Une micromethode de l'immunoélectrophorèse.  
Int. Arch. Allergy, 1955, 7, 103.
- 168 - SHONS A., JETZER T. and NAJARIAN J.S.  
Prolongation of skin homograft survival by L-asparaginase.  
Transplantation, 1970, 10, 280.
- 169 - SHOW M.T.  
L-asparaginase and pancreatitis.  
Lancet, 1970, 2, 721.
- 170 - SMIRNOV A.N.  
The use of L-asparaginase in the treatment of leukemia.  
Probl. Dermatol. Pereliv. Krovi., 1970, 15, 62.
- 171 - SRIKRISHNA V., PADARATHISINGH M., BONMASSAR E., WARAVDEKAR V. and GOLDIN A.  
Studies on neutralization of L-asparaginase activity in vitro and in vivo.  
Cancer, 1971, 27, 1321.

172 - SUGIURA K.

Effect of L-asparaginase (NSC-109, 229) on transplantable and spontaneous tumors from mice and rats.

Cancer Chemother. Rep., 1969, 53, 189.

173 - TALIAL L., TAN C., OETTGEN H., WOLINER N., CARTHY Mc., HELSON L., BURCHENAL J., KARNOFSKY D. and MURPHY M.L.

Escherichia coli L-asparaginase in the treatment of leukemia and solid tumors in 131 children.

Cancer, 1970, 25, 306.

174 - TAN C. and OETTGEN H.F.

Clinical experience with L-asparaginase administrated intrathecally.

Proc. Amer. Ass. Cancer Res., 1969, 365, 92.

175 - TOWER D.B.

The neurochemistry of asparagine and glutamine.

Neuro-chemistry of nucléotides and aminoacids, Ed. by BRADY and TOWER, 1960, Willey, New York.

176 - VAAN G.A.M., BAKKEREN J.A.J.M., SCHRETLEN E.D.A.M. and REEVINK H.

L-asparaginase treatment of acute leukemia in children.

Acta pediatr. Scand., 1971, 60, 22.

177 - VARNER J.E.

The enzymes, Acad. Press. New York., 1960, 4, 243.

178 - WADE H.E., ELSWORTH R., HERBERT D., KEPPIE J. and SARGEANT K.

A new L-asparaginase with antitumor activity.

Lancet, 1968, 2, 776.

179 - WARNER A.C.I.

The breakdown of asparagine glutamine and other amides by microorganisms from the sheep's rumen.

Aus. J. Biol. Sci., 1964, 17, 170.

