

N° 872

50376
1980
222

50376
1980
222

MEMOIRE

PRÉSENTÉ À

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

POUR OBTENIR LE TITRE DE

DOCTEUR DE 3° CYCLE

SPÉCIALITÉ BIOCHIMIE

PAR

MARIE-VÉRONIQUE DUPRESSOIR-BURLET

MISE AU POINT DE TECHNIQUES IMMUNO-ENZYMATIQUES POUR
LE DEPISTAGE ET LE DOSAGE DES ANTICORPS ANTITETANIQUES

PRÉSENTÉ LE 12 DÉCEMBRE 1980

DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN :



PRESIDENT ET RAPPORTEUR : J. MONTREUIL

MEMBRES : G. SPIK
M. GOUEMAND
M. MANIEZ-MONTREUIL



0300107976

Ce travail a été effectué dans le laboratoire de l'antigène AUSTRALIA du Centre Régional de Transfusion Sanguine de LILLE sous la direction de Madame MANIEZ, chef de laboratoire et de Monsieur le Professeur GOUEMAND, Directeur.

Les premiers résultats de ce travail ont fait l'objet d'une communication à la Société Nationale de Transfusion Sanguine à TOULOUSE le 24 novembre 1978. Les résultats ultérieurs ont donné matière à une communication par affichage au Congrès National de Transfusion Sanguine à STRASBOURG le 25 juin 1979 ainsi qu'à une publication dans la Revue Française de Transfusion et d'immuno-hématologie (1980 XIII (4) : 451) sous le titre "Dépistage et dosage des anticorps antitétaniques par méthode immunoenzymatique".

INTRODUCTION

p 1

GÉNÉRALITÉS

LE TETANOS ET SA PREVENTION

I) <u>HISTORIQUE</u>	p	3
II) <u>LE BACILLE DE NICOLAÏER</u>	p	3
1°) Caractères généraux.....	p	3
2°) Epidémiologie.....	p	4
III) <u>TOXINE TETANIQUE</u>	p	4
1°) Elaboration et obtention de la toxine.....	p	4
2°) Quelques caractéristiques de la toxine.....	p	5
3°) Physiopathologie.....	p	5
A) <i>Cheminement de la toxine</i>	p	5
B) <i>Fixation de la toxine</i>	p	5
C) <i>Mécanisme d'action</i>	p	5
IV) <u>ETUDE CLINIQUE</u>	p	6
1°) Les symptômes.....	p	6
2°) Evolution.....	p	6
3°) Traitement.....	p	7
A) <i>Traitement de la plaie</i>	p	7
B) <i>Sérothérapie</i>	p	7
C) <i>Anatoxinothérapie curative</i>	p	7
V) <u>PREVENTION</u>	p	7
1°) <u>Immunité active : vaccination</u>	p	7
A) <i>L'anatoxine tétanique</i>	p	8

B) <i>Le vaccin</i>	p	9
C) <i>La vaccination</i>	p	9
2°) <i>Immunité passive : immunoglobulines</i>	p	11
A) <i>Sérum hétérologue</i>	p	11
B) <i>Intérêt des Immunoglobulines humaines</i>	p	11
C) <i>Rôle des centres de transfusion dans la production des immunoglobulines antitétaniques humaines..</i>	p	12
D) <i>Collecte des plasmas riches en Ac AT</i>	p	12
E) <i>Préparation des Immunoglobulines</i>	p	13
VI) <u>CONCLUSION</u>	p	14

TECHNIQUES DE DEPISTAGE ET DE DOSAGE DES

ANTICORPS ANTITETANIQUES

I) <u>TITRAGE DES ANTICORPS ANTITETANIQUES IN VIVO CHEZ LA SOURIS</u>	p	15
1°) Principe.....	p	15
2°) Technique.....	p	15
II) <u>TITRAGE DES ANTICORPS ANTITETANIQUES IN VITRO</u>	p	16
1°) Méthodes basées sur la précipitation en milieu gélifié.....	p	16
A) <i>Méthode de MANCINI adaptée par NETTER</i>	p	16
B) <i>Méthode selon la technique de LAURELL</i>	p	18
C) <i>Electroimmunodiffusion</i>	p	20
2°) Méthodes basées sur l'agglutination.....	p	21
A) <i>Principe général</i>	p	21
B) <i>Méthode au latex</i>	p	23
C) <i>Méthodes d'hémagglutination passive directe</i> ..	p	23
3°) Techniques nouvelles.....	p	25
A) <i>Immunonéphélométrie</i>	p	25

B) <i>Radioimmunologie</i>	p	25
III) <u>CONCLUSION</u>	p	29

L'IMMUNOENZYMOLOGIE

I) <u>HISTORIQUE</u>	p	30
II) <u>DOSAGES IMMUNOENZYMATIQUES</u>	p	33
1°) Schémas réactionnels.....	p	33
A) <i>Dosage immunoenzymatique en phase homogène</i> ...	p	33
B) <i>Dosage immunoenzymatique en phase hétérogène</i>	p	36
2°) Réactifs nécessaires à la réalisation de dosages immunoenzymatiques.....	p	41
A) <i>L'immunoadsorbant</i>	p	41
B) <i>Le conjugué</i>	p	44
C) <i>Le substrat</i>	p	51
3°) Expression des résultats.....	p	51
4°) Avantages et inconvénients des techniques immunoenzymatiques.....	p	52
III) <u>APPLICATION AU DOSAGE DES ANTICORPS ANTITETANIQUES</u>	p	54

TRAVAUX PERSONNELS

MATERIEL ET METHODES

=====

TECHNIQUES IMMUNOENZYMATIQUES REALISEES

1°) Leurs principes.....	p	56
--------------------------	---	----

2°) La méthodologie.....	p	56
--------------------------	---	----

PREPARATION DES REACTIFS

I) <u>ADSORPTION DE L'ANATOXINE TETANIQUE SUR LE SUPPORT SOLIDE.....</u>	p	58
--	---	----

1°) Comparaison de l'adsorption de l'anatoxine tétanique sur le support plastique par séchage et par contact.....	p	58
---	---	----

A) <i>Principe</i>	p	59
--------------------------	---	----

B) <i>Protocole</i>	p	60
---------------------------	---	----

2°) Etude de l'adsorption par séchage à pH 7,4.....	p	61
---	---	----

A) <i>Principe</i>	p	61
--------------------------	---	----

B) <i>Etude de différents paramètres</i>	p	61
--	---	----

II) <u>COUPLAGE DE L'ANATOXINE TETANIQUE AVEC LA PEROXYDASE DE RAIFORT.</u>	p	62
---	---	----

1°) <i>Principe</i>	p	62
---------------------------	---	----

2°) <i>Protocole</i>	p	63
----------------------------	---	----

ETUDE DE DIFFERENTS PARAMETRES INTERVENANT DANS LA

REACTION IMMUNOENZYMATIQUE

1°) Etude des temps d'incubation.....	p	65
---------------------------------------	---	----

A) <i>Technique immunoenzymatique indirecte</i>	p	65
---	---	----

B) <i>Technique sandwich</i>	p	65
------------------------------------	---	----

2°) Détermination de la dilution de travail des conjugués	p	66
---	---	----

A) <i>Technique indirecte</i>	p	66
-------------------------------------	---	----

B) <i>Technique sandwich</i>	p	66
------------------------------------	---	----

3°) Etude simultanée de 2 paramètres : concentration de l'anatoxine tétanique adsorbée sur le support plastique, dilution de travail des échantillons.....	p	66
--	---	----

A) <i>Principe</i>	p	66
--------------------------	---	----

B) <i>Technique indirecte</i>	p	66
-------------------------------------	---	----

C) <i>Technique sandwich</i>	p	67
4°) Influence de la concentration du substrat.....	p	67

DEPISTAGE ET DOSAGE DES ANTICORPS ANTITETANIQUES

1°) Protocole.....	p	67
2°) Dépistage et dosage des anticorps antitétaniques.....	p	69
3°) Reproductibilité.....	p	69

RESULTATS ET DISCUSSION

=====

I) <u>ETUDE DE L'ADSORPTION DE L'ANATOXINE TETANIQUE SUR LE SUPPORT SOLIDE</u>	p	70
1°) Comparaison de l'adsorption de l'anatoxine tétanique sur support plastique par séchage et par contact.....	p	70
2°) Adsorption par séchage à pH 7,4.....	p	70
A) <i>Influence du temps d'incubation et de la fixation par le glutaraldéhyde</i>	p	70
B) <i>Influence de la concentration d'anatoxine</i>	p	73
C) <i>Essais d'amélioration de l'adsorption de l'anatoxine</i>	p	75
3°) Conclusion.....	p	77
II) <u>ETUDE DES DIFFERENTS PARAMETRES</u>	p	78
1°) Temps d'incubation.....	p	78
A) <i>Technique immunoenzymatique indirecte</i>	p	78
B) <i>Technique immunoenzymatique sandwich</i>	p	82
2°) Influence de la concentration du conjugué.....	p	82
A) <i>Technique indirecte</i>	p	82
B) <i>Technique sandwich</i>	p	84

3°) Interdépendance des 2 paramètres : concentration d'anatoxine ; dilution des échantillons.....	p	84
A) <i>Technique indirecte</i>	p	86
B) <i>Technique sandwich</i>	p	86
4°) Influence de la concentration du substrat.....	p	91
5°) Conclusion.....	p	91
III) <u>APPLICATION AUX DEPISTAGE ET DOSAGE DES Ac AT</u>	p	93
1°) Courbes d'étalonnage.....	p	93
2°) Dépistage des anticorps antitétaniques.....	p	93
3°) Reproductibilité.....	p	103
4°) Conclusion.....	p	106
CONCLUSION	p	107

BIBLIOGRAPHIE

APPENDICE

ABREVIATIONS

Ac : anticorps

Ac AT : anticorps antitétaniques

Ac-E : conjugué anticorps-enzyme

A.F.P. : alpha-foeto-protéine

Ag : antigène

An-E : conjugué anatoxine tétanique-enzyme

AT : antitétanique

C.N.T.S. : Centre National de Transfusion Sanguine

C.R.T.S. : Centre Régional de Transfusion Sanguine

C.T.S. : Centre de Transfusion Sanguine

D.O. : densité optique

E.I.D. : electro-immunodiffusion

E.M.I.T. : enzyme multiplied immunoassay technique

Hp : haptène

I.B.F. : Industrie Biologique Française

Lf : Lines flocculationis

O.M.S. : Organisation Mondiale de la Santé

P.B.S. : eau physiologique tamponnée en ions phosphates

P.E.G. : polyéthylène glycol

R.L.S. : ratio light scattering

UI : Unité Internationale

INTRODUCTION

Malgré l'existence d'une prévention absolue : la vaccination antitétanique, la plus efficace et la mieux tolérée de toutes les vaccinations, le tétanos a encore tué, en 1978, environ 200 personnes en France.

Depuis 1977, les Centres de Transfusion Sanguine sont seuls autorisés à préparer les immunoglobulines spécifiques d'origine humaine servant à la prophylaxie et au traitement du tétanos. Ces organismes ont donc été amenés à participer à la défense active de la population contre le tétanos, en entreprenant, sous l'égide du Ministère de la Santé des campagnes de vaccination pour les donneurs de sang, d'une part, et à mettre sur pied des structures leur permettant d'assurer le dépistage des anticorps et la production d'immunoglobulines antitétaniques, d'autre part.

Dans ce but, il est nécessaire de sélectionner, parmi la totalité des donneurs, ceux qui ont un taux d'anticorps antitétaniques suffisant (au moins égal à 4 UI/ml) pour la préparation d'immunoglobulines spécifiques. Plus encore, les plasmas ainsi repérés doivent être classés en différentes catégories selon le taux d'anticorps, ceci permettant par un mélange approprié de plasmas d'obtenir en fin de fractionnement une immunoglobuline titrant au moins 125 UI/ml.

Pour atteindre ces 2 objectifs, il est indispensable de disposer de méthodes à la fois rapides, précises et adaptables à un dépistage de masse permettant le dosage des anticorps. De nombreuses techniques ont été proposées dans ce but : l'électroimmunodiffusion qui reste la méthode de base la plus utilisée ainsi que la technique de Laurell, l'hémagglutination. Les méthodes immunoenzymatiques jusqu'à présent ne répondent pas aux critères déjà évoqués.

Après avoir abordé cette nouvelle méthode qu'est l'immunoenzymologie, au cours de notre D.E.A, pour le dépistage de l'Ag HBs, antigène sérique associé au virus de l'hépatite B, nous avons cherché à mettre au point une technique immunoenzymatique simple, rapide et précise, permettant un dosage des anticorps antitétaniques par rapport à une gamme étalon.

Dans un premier temps, nous rappellerons les différents aspects du tétanos et de sa prévention, les techniques actuelles de dépistage et dosage des anticorps antitétaniques, enfin les principes généraux de l'immunoenzymologie et les applications réalisées jusqu'à présent pour les Ac AT.

La deuxième partie de ce mémoire concernera nos travaux personnels avec, dans un premier temps, la préparation des réactifs, ensuite, l'étude de différents paramètres aboutissant à la mise au point de techniques immunoenzymatiques que nous appliquerons aux dépistage de masse et dosage des anticorps antitétaniques.

GENERALITES

LE TÉTANOS ET SA PRÉVENTION

Dans ce chapitre nous rappellerons brièvement les différents aspects du tétanos et de sa prévention.

I) HISTORIQUE

HIPPOCRATE, le premier, décrit la maladie.

NICOLAÏER (114), en 1884, isole un bacille en épingle qu'il ne peut cultiver. Cet échec est expliqué par KITASATO (88) en 1887 : le germe se développe en milieu anaérobie.

FABER (56), en 1890, prouve l'existence de la toxine, puis WASSERMAN démontre qu'elle se fixe électivement sur les tissus nerveux.

Après injection de petites doses de toxine à des animaux, ceux-ci produisent une antitoxine. Cette découverte de BEHRING et KITASATO (17) amène la prévention de l'affection par sérothérapie en 1892 (ROUX & VAILLARD (133)). Dès 1923, la production d'anatoxine par RAMON (125) permet d'envisager la vaccination.

II) LE BACILLE DE NICOLAÏER

1°) Caractères généraux

Le bacille de NICOLAÏER, encore appelé "Plectridium tetani", est un bâtonnet Gram positif, le plus souvent isolé. Il produit, après 36 heures de culture, une spore terminale sphérique réfringente.

Ce bacille, mobile et cilié, est un anaérobie strict qui produit une toxine spécifique très active.

Ce germe est sensible à l'autolyse et aux antiseptiques, alors que la spore résiste à l'ébullition pendant 3 heures. En revanche, celle-ci est détruite par la lumière diffuse.

La spore est la forme de résistance du germe. Lorsque les conditions de développement sont favorables, la membrane se rompt et le prolongement émis prend progressivement la forme et les caractères du bacille.

Les spores et bacilles tétaniques se rencontrent essentiellement dans le sol, le fumier, les poussières et les matières fécales de l'homme et des animaux (surtout bovidés et équidés).

2°) Epidémiologie

L'habitat du germe et de la spore induit un risque tétanique élevé chez les cultivateurs, jardiniers, terrassiers, palefreniers, jockeys et, de manière générale, dans les régions rurales. Les cas de tétanos apparaissent durant les mois d'activité agricole importante (Mai à Octobre) (96).

Les principales voies de contamination sont les traumatismes cutanés (piqûres, griffures, etc....). Grâce à la prophylaxie, les conséquences graves sont évitées le plus souvent.

D'autres lésions comme les ulcères chroniques, les eczémas, les injections médicamenteuses intramusculaires, peuvent servir de porte d'entrée. Pendant longtemps, on a pu observer des tétanos après avortement.

A partir de 40 ans, la morbidité tétanique augmente de façon frappante. Les femmes sont particulièrement touchées; en effet, la dernière vaccination (quand elle a été effectuée) a lieu à 15 ans alors que les hommes subissent, au moment du service national, un rappel qui leur assure une meilleure protection (97).

Dans les pays industrialisés, le tétanos du vieillard (1) est très courant. Par opposition, le tétanos néonatal (29) est une des causes principales de morbidité et de mortalité infantile dans les pays en voie de développement.

III) TOXINE TETANIQUE

1°) Elaboration et obtention de la toxine

Le bacille tétanique, placé dans un milieu favorable (124), élabore une exotoxine diffusible très active. La libération de cette toxine est maximale pendant la phase exponentielle de croissance du germe mais n'est pas totale : il subsiste toujours une fraction de toxine endocellulaire (152).

De grandes quantités de toxine sont obtenues en fermenteurs, sur un milieu de culture et dans les conditions optimales établies par PREVOST & BOORSMA (124) et par BIZZINI (23).

La purification de la toxine est réalisée à partir des corps microbiens par action de solutions hypertoniques (126), (23). Un deuxième procédé utilise le filtrat de culture (23), il est plus aisé à mener et conduit à des produits ayant une meilleure activité spécifique.

On appelle anatoxine tétanique, la toxine modifiée par un traitement à la chaleur et au formol (127) ; celle-ci est utilisée pour la vaccination.

2°) Quelques caractéristiques de la toxine

La toxine tétanique est hydro-soluble, thermolabile (destruction à 65°C en 1 ou 2 heures); elle est altérée par la lumière, les bases et acides forts. Son activité spécifique est exprimée en unités de floculation (Lf/ml ou Lf/mg N₂ , 1 unité floculante sature 1 UI antitoxique).

La toxine tétanique est une holoprotéine dont la composition en acides aminés est connue (25). Sa masse moléculaire est de 150.000 environ et sa constante de sédimentation 6-7 S.

La toxine se présenterait sous la forme d'un dimère dont les monomères seraient assemblés par des forces non covalentes. Chaque monomère renfermerait 2 sous-unités de tailles différentes réunies par un pont disulfure (24).

Des études, portant sur les modifications des propriétés de la toxine par substitution de certains résidus d'acides aminés, ont permis d'établir l'intervention de la lysine et de la tyrosine dans l'activité de la toxine (24).

3°) Physiopathologie

C'est la toxine tétanique qui provoque la maladie et conditionne sa gravité.

A) Cheminement de la toxine

Le transport de la toxine élaborée se fait par voie veineuse, à partir du point d'infection jusqu'aux racines antérieures de la moëlle, ensuite la diffusion se fait probablement par voie sanguine. La toxine est mise en évidence dans tout l'organisme mais électivement au niveau du système nerveux central.

B) Fixation de la toxine

La toxine se fixe préférentiellement au niveau de la membrane synaptique par l'intermédiaire d'un récepteur spécifique qui est un ganglioside. La position, la quantité et l'intégrité de l'acide N-acétyl neuraminique faisant partie du ganglioside (115), déterminent, sans toutefois intervenir directement, la fixation de la toxine, permettant à celle-ci d'agir au niveau du tissu nerveux.

C) Mécanisme d'action

La toxine supprime l'inhibition des motoneurones (34).

Chez un sujet sain, la contraction d'un muscle est couplée avec l'inhibition de contraction du muscle antagoniste ; chez le tétanique, l'effet des motoneurones étant supprimé, les muscles agoniste et antagoniste peuvent être excités simultanément par un stimulus, même faible, d'où la contracture tétanique.

Il n'existe pas d'action pathogène directe de la toxine sur des organes tels que le coeur, le foie, le poumon ou le rein.

IV) ETUDE CLINIQUE

1°) Les symptômes

Ce sont essentiellement la contracture tétanique et les recrudescences paroxystiques.

- La période d'incubation : elle varie entre 4 jours et 2 semaines selon la nature, l'étendue et l'emplacement de la blessure. Le tétanos est d'autant plus grave que la période d'incubation est courte.

- La période d'invasion : le premier signe clinique de la maladie est caractérisé par des contractures des muscles masticateurs. Il se passe environ 7 jours entre le début clinique du tétanos et le premier paroxysme.

- La période d'état (64) : les contractures se généralisent et envahissent nuque, tronc et membres. Des recrudescences paroxystiques peuvent être provoquées par une excitation, même minime (bruits, examens, etc...) La paralysie des muscles respiratoires impose souvent la mise sous ventilation assistée.

2°) Evolution

Celle-ci dépend de l'intensité de l'intoxication, de la durée de la période d'incubation. L'âge et l'état du malade, en particulier le taux initial d'anticorps antitétaniques, importent également.

Le plus souvent, la guérison est observée au bout de 6 semaines ; cependant des complications cardiovasculaires, respiratoires ou thromboemboliques peuvent se manifester.

En règle générale, lorsqu'on est parvenu à maintenir le malade en vie au-delà de quatre semaines, celui-ci se rétablit sans séquelles quelque soit son âge.

3°) Traitement

Nous évoquerons principalement le traitement médical spécifique. Il est évidemment associé à une surveillance très poussée du malade ainsi qu'à un traitement médical général : antibiothérapie pour lutter contre le bacille tétanique, anticoagulants pour éviter les accidents vasculaires dus à la position couchée prolongée, administration de sédatifs pour supprimer les paroxysmes. L'alimentation se fait par voie parentérale ou, si le malade est trachéotomisé, par l'intermédiaire d'une sonde gastrique.

A) Traitement de la plaie

Le traitement spécifique commence par une désinfection minutieuse de la plaie après prélèvement, sur lequel est effectuée la recherche du bacille de NICOLAÏER.

B) Sérothérapie

Celle-ci assure une protection par immunisation passive. Elle est réalisée par l'injection de sérums riches en anticorps antitétaniques (Ac AT) d'origine équine ou mieux humaine.

C) Anatoxinothérapie curative

Actuellement, on vaccine le malade en 6 semaines. A la fin de sa maladie, l'immunisation active du sujet prend le relais de l'immunité passive due à la sérothérapie.

V) PREVENTION

Nous pouvons distinguer 2 types d'immunité :

- Active - par la vaccination.
- Passive pour obtenir une immunité immédiate en cas d'infection, par l'injection d'immunoglobulines équines ou humaines.

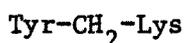
1°) Immunité active : vaccination

RAMON en 1923 (125), mit au point la préparation d'anatoxine permettant ainsi une vaccination inoffensive et efficace contre le tétanos.

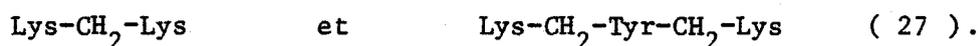
A) L'anatoxine tétanique

a) Obtention

L'anatoxine est obtenue en traitant la toxine tétanique par le formol et la chaleur (127). La toxicité disparaît mais pas le pouvoir antigénique. La détoxification par le formol est un processus irréversible. Le formol induit une modification de la molécule de toxine, en particulier, des réactions de condensation liant des résidus d'acides aminés par des ponts méthyléniques (liaison de type MANNICH) (25). Le composé principalement obtenu est :



mais on trouve également :



b) Mécanisme de la détoxification

La détoxification par le formol s'expliquerait par :

- 1- La modification des résidus de lysine, de tyrosine ou des 2 à la fois ; ces résidus seraient donc impliqués dans l'activité du site toxique.
- 2- Le masquage du site toxique par suite du verrouillage dû aux ponts méthyléniques.
- 3- Les deux mécanismes conjugués.

Les ponts méthyléniques peuvent être intracaténaux, intercaténaux ou intermoléculaires. Dans ce dernier cas, on obtient des édifices polymériques emprisonnant des molécules de nucléoprotéines ou d'autres produits présents dans le milieu, en particulier si la détoxification est pratiquée sur des préparations brutes ou semi-purifiées de toxine (151). Dans le cas de préparation du vaccin, la toxine utilisée doit être très pure afin d'éviter tous les phénomènes d'allergie.

c) Pouvoir immunogène de l'anatoxine (26)

Les études portant sur le pouvoir immunogène de l'anatoxine ont abouti aux conclusions suivantes :

1- La capacité à induire des anticorps neutralisants augmente avec le degré de pureté de l'anatoxine ; c'est à dire selon le nombre de polymères existants. Si une toxine est très pure, il ne se forme pas ou peu de polymères au cours du processus de détoxification.

2- Le pouvoir immunogène augmente d'autant plus que l'état moléculaire de l'anatoxine est plus proche de celui de la toxine native.

3- Il existe une forme monomérique de l'anatoxine pure dans le même état moléculaire que la toxine et ayant la même activité floculante spécifique. La persistance, dans l'anatoxine, de la configuration originelle de la molécule de toxine, constitue donc un élément important de la réponse anticorps.

B) Le vaccin

Actuellement, l'anatoxine brute a été remplacée pour la vaccination par l'anatoxine purifiée et adsorbée.

L'utilisation des anatoxines purifiées entraîne une diminution des réactions vaccinales mais également une baisse de pouvoir antigénique par la suppression d'antigènes accessoires se comportant comme des substances adjuvantes. Une autre explication serait que des altérations se produisent quand la purification est effectuée après la détoxification (127).

Dans le cas des jeunes enfants, il est intéressant d'avoir une anatoxine dont l'immunogénicité est renforcée par la présence de substances inoffensives stimulant l'activité des cellules immunocompétentes.

L'action des adjuvants est un phénomène immunologique général : ainsi au cours de l'immunisation d'un animal, les anticorps formés ont un titre plus élevé si l'animal présente un abcès ou une inflammation au point d'inoculation.

En ce qui concerne la vaccination humaine, la technique la plus efficace et la plus inoffensive est l'adsorption des antigènes sur des sels minéraux formant avec l'antigène un précipité insoluble. Ce précipité est retenu au point d'inoculation sous forme d'un "granulome à corps étranger" persistant plusieurs semaines. Le contact prolongé de l'antigène avec les cellules immunocompétentes aboutit à la formation régulière des anticorps avec un titre élevé.

Les premières préparations vaccinales ont fait appel à l'alun. Actuellement, ce sont surtout des dérivés minéraux, l'hydroxyde ou le phosphate d'aluminium qui sont utilisés (Tétavax-Mérieux : hydroxyde d'aluminium ; IPAD.T-Pasteur : phosphate de calcium).

C) La vaccination

La législation française a rendu obligatoire cette vaccination en 1940.

a) Protocole

Les vaccins antitétaniques adsorbés sont pratiqués en injection

sous-cutanée. Le schéma classique comporte 3 injections espacées d'un mois (il est possible de ne faire que 2 injections car la réponse immunitaire due à ces vaccins est très élevée) ; un an après la dernière injection, puis tous les 5 ans, des rappels assurent une immunité parfaite. Les réactions post-vaccinales sont bénignes : même les sujets allergiques peuvent se faire vacciner contre le tétanos sans aucun risque.

b) Seuil d'immunité

Une protection totale est assurée quand le taux sérique d'Ac AT est égal ou supérieur à 0,1 UI/ml (63). Il n'y a, cependant pas de parallélisme entre ce taux et l'immunité effective, selon la nature des anticorps et leur "avidité" pour la toxine. TURPIN (150) a remplacé ce seuil de 0,1 UI/ml par une zone de protection comprise entre 0,01 UI/ml et 0,1 UI/ml.

1 unité antitoxique internationale est l'activité spécifique de 0,309 mg du sérum étalon de COPENHAGUE desséché.

c) Réponse immunitaire humorale

L'immunité antitétanique dépend du type de vaccin, du nombre d'injections et de rappels, mais surtout de la capacité de réponse de chaque individu.

α) Taux d'anticorps

Selon HERZOG et GAIFFE (78), les Ac AT étant dosés par une technique au latex, le taux maximum d'Ac AT est atteint 3 à 4 semaines après la vaccination et persiste de façon variable entre 8 jours et 3 mois.

Environ 1 % des sujets vaccinés n'atteignent pas le taux protecteur de 0,1 UI/ml ; chez 5 % des mêmes personnes, la protection n'est plus assurée après 5 ans.

β) Rappels

Les injections de rappel entraînent l'apparition d'une réponse anamnésique mais si elles sont trop fréquentes, on observe un blocage du taux des Ac AT.

d) Qualité de la vaccination antitétanique

Elle est : -fonction de la gravité de la maladie
-inoffensive, surtout si l'anatoxine injectée est purifiée
selon la technique de BIZZINI, TURPIN et RAYNAUD (127) (151).

-efficace, durable

L'utilisation d'une anatoxine pure, l'injection de l'antigène en quantité suffisante associé à un adjuvant ainsi que l'espacement correct des injections, aboutissent aux meilleurs résultats.

La vaccination antitétanique induit la formation d'anticorps alors que la maladie n'est pas immunisante. La dose mortelle pour un homme correspond à 1/200^e de ml de toxine. Pour créer, avec la toxine, un état immunitaire comparable à celui provoqué par 1 ml d'anatoxine, il faudrait 200 doses mortelles de toxine (128).

2°) Immunité passive : Immunoglobulines

Par négligence et par manque d'information, la population française est mal protégée contre le tétanos. La sérothérapie qui, en cas de contamination, assure une couverture efficace, est devenue une pratique trop systématique. L'injection répétée d'anatoxine tétanique, en particulier au cheval ou à l'homme, permet d'obtenir des sérums hyperimmuns ou des solutions d'antitoxine purifiée et concentrée (140) utilisés pour la sérothérapie humaine.

A) Sérum hétérologue

L'utilisation de ce sérum peut donner lieu à des réactions allergiques (chocs anaphylactiques, phénomène d'Artus, etc...) dépendantes des anticorps circulants et de l'hypersensibilité retardée contre les protéines équine (140). L'inoculation est réalisée selon le procédé de BESREDKA : le sérum est injecté par voie sous-cutanée, par petites fractions et à intervalles réguliers (30 minutes environ) ; la moindre manifestation cutanée d'allergie entraîne l'arrêt de l'injection.

B) Intérêt des immunoglobulines humaines

Les immunoglobulines humaines sont largement supérieures aux sérums animaux. Elles suppriment le risque de réactions allergiques ; de plus la demie-vie de ces immunoglobulines est de 20 à 43 jours, donc beaucoup plus importante que celle des immunoglobulines hétérologues (qui va de quelques

heures à quelques jours). Actuellement, la dose utilisée est de 250 UI, en injection intramusculaire chez l'adulte ; par cette voie, 25 à 30 % des immunoglobulines injectées passent dans la circulation sanguine, le reste est détruit.

C) Rôle des centres de transfusion dans la production des immunoglobulines antitétaniques humaines (62).

Jusqu'en 1975, c'est essentiellement un problème de distribution qui s'est posé : la diffusion par les C.T.S. des immunoglobulines AT en pharmacie n'étant pas légalement possible. Une firme commerciale avait donc saisi le marché pharmaceutique, y diffusant des immunoglobulines AT provenant du commerce international de produits sanguins, dénoncé par l'O.M.S ; pour une faible part, ces immunoglobulines étaient produites à partir de prélèvements effectués sur des donneurs hyperimmunisés, ceci en infraction avec la législation :

- La loi du 21 juillet 1952 habilite seuls les C.T.S. à collecter, fractionner et distribuer le sang humain et ses dérivés (centres à but non lucratif)

- L'hyperimmunisation des donneurs en vue de la préparation d'immunoglobulines spécifiques ne peut être faite que dans les établissements de transfusion sanguine en vertu de la loi du 2 Août 1961.

- En 1966, le Conseil des Communautés Européennes élimine le sang humain et ses dérivés des dispositions concernant les spécialités pharmaceutiques.

A partir du 1er Janvier 1975, les C.T.S. purent distribuer les immunoglobulines dans le circuit pharmaceutique.

Le ministère de la Santé décida en 1976 de supprimer les centres de prélèvement non agréés et de mettre fin à la commercialisation des immunoglobulines spécifiques AT et anticoagulantes par des firmes privées. Finalement, depuis le 1er septembre 1977, les C.T.S. doivent fournir la totalité des immunoglobulines. Il a été nécessaire de mettre sur pied une organisation renforcée de la collecte des plasmas riches en anticorps antitétaniques.

D) Collecte des plasmas riches en Ac AT.

a) Dépistage systématique

Le dépistage systématique des Ac AT, effectué au C.T.S. de LILLE

par une technique d'électroimmunodiffusion, permet d'orienter vers le fractionnement, des sérums et plasmas riches en Ac AT (taux égal ou supérieur à 4 UI/ml), et de sélectionner les donneurs porteurs de ces anticorps pour les prélèvements par plasmaphérèse.

b) Campagne de vaccination

Des campagnes de vaccination, chez les donneurs de sang, sont également effectuées en vue de leur assurer une protection immunitaire contre le tétanos. Quand le taux d'Ac AT des sujets vaccinés est supérieur à 8 UI/ml, ces personnes sont conviées à des dons en plasmaphérèse permettant d'obtenir des quantités importantes de plasmas riches en anticorps antitétaniques.

c) Plasmaphérèse

La plasmaphérèse consiste en un prélèvement sélectif de plasma . Après prélèvement du sang, celui-ci est centrifugé pendant 10 minutes à 3000 t/mm. Pendant ce temps, le donneur reçoit du sérum physiologique. A la fin de la centrifugation, le plasma surnageant est décanté stérilement dans une poche de transfert par un procédé de presse. Les globules rouges sont réinjectés au donneur par autotransfusion. L'opération est renouvelée et 500 ml de plasma, en moyenne, sont ainsi prélevés à chaque séance.

Un examen médical rigoureux (hémogramme, urémie, glycémie, radiophotographie et électrocardiogramme) ainsi que le dosage des anticorps antitétaniques, sont effectués à chaque plasmaphérèse.

En 1978, 5644 plasmaphérèses ont été prélevées au C.R.T.S. de LILLE.

En 1979, 5988 plasmaphérèses antitétaniques ont été réalisées.

E) Préparation des immunoglobulines

A partir des plasmas sélectionnés, le Centre de Transfusion prépare selon la méthode classique de fractionnement de COHN (44), des immunoglobulines spécifiques. En fait, on obtient plutôt une préparation enrichie en anticorps, contenant, pour 100 ml, 16,5 grammes d'immunoglobulines dont quelques microgrammes seulement sont spécifiques. La concentration de l'activité anticorpale spécifique dépend de la quantité d'anticorps présente dans le plasma hyperimmun de départ. La technique de COHN permet de récupérer 40 à 50 % des anticorps contenus dans le plasma à fractionner. Sachant que la préparation thérapeutique doit contenir 125 UI/ml, seuls les plasmas ayant un titre

d'Ac AT égal ou supérieur à 4 UI/ml sont utilisés.

Dans le but d'employer les plasmas ou sérums dont le taux d'Ac AT est inférieur à la limite citée plus haut et d'obtenir une fraction d'anticorps monospécifiques, le C.T.S. de BORDEAUX a mis au point une méthode de préparation d'immunoglobulines antitétaniques par chromatographie d'affinité (121). Cependant, le passage du stade "laboratoire" à la production industrielle pose de nombreux problèmes.

VI) CONCLUSION

Le tétanos est une maladie infectieuse due à la pénétration dans l'organisme, par une plaie souvent minime, du bacille de NICOLAÏER. Ce bacille synthétise une toxine neurotrope dont nous avons décrit les effets.

En 1978, sur 400 cas de tétanos déclarés dont 5 dans le Nord, 200 furent mortels. Il est donc indispensable de prémunir la population contre cette maladie en développant la vaccination qui, jusqu'à présent, n'a pas été pratiquée de façon efficace.

Pour assurer une protection immunitaire immédiate, en cas d'infection, l'injection d'immunoglobulines antitétaniques humaines est recommandée. Les Centres de Transfusion produisent des préparations riches en anticorps anti-tétaniques ; il leur est donc nécessaire de sélectionner les prélèvements contenant un taux élevé de ces anticorps.

TECHNIQUES DE DÉPISTAGE ET DE DOSAGE DES
ANTICORPS ANTITÉTANIQUES

Les centres de transfusion sont soumis à des obligations de rapidité pour séparer et regrouper les plasmas spécifiques. Pour cela, ils doivent utiliser des techniques de dépistage et dosage des anticorps antitétaniques rapides, précises et reproductibles qui permettront de sélectionner les plasmas de titre intéressant, suivre l'évolution des plasmaphérèses, contrôler et titrer les plasmas en provenance d'autres centres ou les immunoglobulines spécifiques en cours de fabrication.

Ce chapitre traitera donc des différentes méthodes immunologiques adaptées au dépistage des Ac AT. Nous exposerons leur principe et brièvement la méthodologie. La technique d'électroimmunodiffusion utilisée au laboratoire est détaillée.

Il est important de préciser que dans toutes ces méthodes, il est indispensable d'introduire un témoin d'Ac AT à 4 UI/ml. En effet, nous avons déjà évoqué le problème de la préparation des immunoglobulines ; le rendement du fractionnement de COHN étant faible, pour obtenir des immunoglobulines à 125 UI/ml, les plasmas de départ doivent avoir un titre égal ou supérieur à 4 UI/ml.

I) TITRAGE DES AC AT IN VIVO CHEZ LA SOURIS

1°) Principe (81)

C'est une méthode de neutralisation de l'effet létal de la toxine tétanique standard de COPENHAGUE à 1000 Lf/ml (prise comme référence) par les Ac AT.

2°) Technique

Le sérum ou plasma à étudier est dilué du 1:10 au 1:100; 1 ml de cette dilution est ajoutée à 1 ml de toxine diluée au 1:65. Après 2 heures de contact à température ambiante, 1 ml de chaque mélange est injecté en intramusculaire à 2 souris de 18 à 20 g ; 4 jours plus tard, le nombre de souris mortes atteintes de tétanos est établi. Le titre du sérum étudié est calculé à partir de la dilution qui a protégé la souris.

Il faut procéder en deux temps : la première étape permet d'encadrer une valeur grossière du titre, la détermination précise étant réalisée dans un deuxième essai.

Cette technique est complexe ; elle nécessite de nombreuses dilutions, des animaux et les structures pour les accueillir, la manipulation de toxine. Le résultat n'est obtenu qu'après un délai de 4 jours.

Ce n'est donc pas une technique de routine mais la technique de référence inscrite à la pharmacopée, car elle mesure l'activité biologique réelle des Ac AT. Elle permet d'apprécier l'activité thérapeutique des immunoglobulines spécifiques.

Ce test est pratiqué pour le C.R.T.S. de LILLE à l'Institut Pasteur de GARCHES.

II) TITRAGE DES ANTICORPS ANTITETANIQUES IN VITRO

1°) Méthodes basées sur la précipitation en milieu gélosé

A) Méthode de MANCINI (96) adaptée par NETTER (112).

a) Principe (figure 1).

Les anticorps diffusent librement dans la gélose contenant de l'anatoxine tétanique : dans la zone d'équivalence de concentration des anticorps AT et de l'anatoxine se forme un anneau de précipitation. La surface délimitée par l'anneau ainsi formé est proportionnelle à la quantité d'Ac AT déposée. Il est donc possible de titrer un sérum, plasma ou une immunoglobuline par rapport à une gamme étalon.

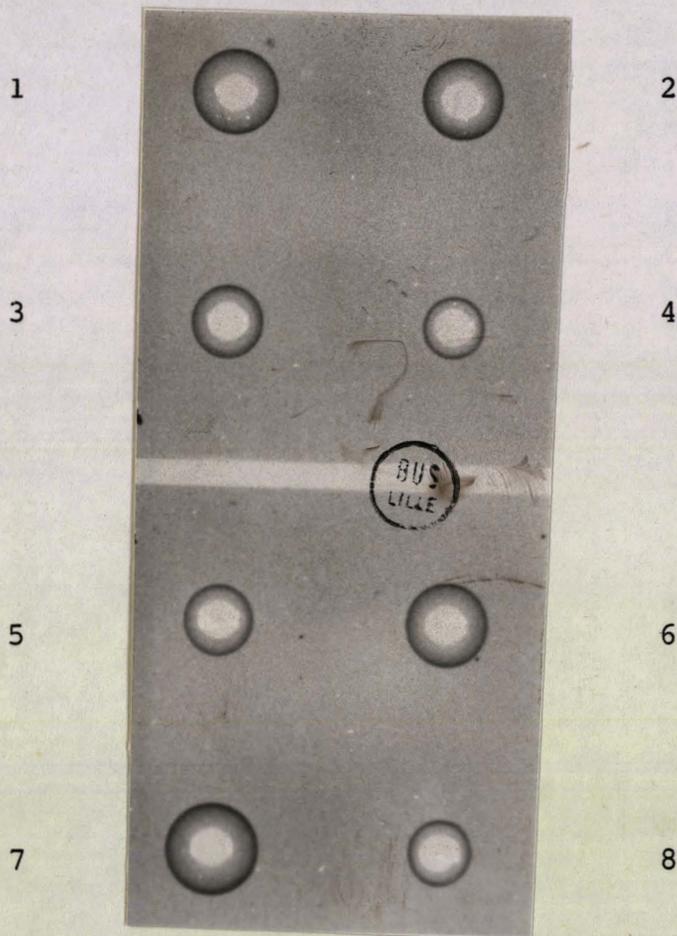
b) Technique.

Dans un gel d'agarose à 1 % (p/v) en tampon véronal à pH 8,6, on introduit 7 % (v/v) d'anatoxine tétanique diluée (à 30 Lf/ml pour le dosage des immunoglobulines, à 15 Lf/ml pour le titrage des sérums ou plasmas) ; ce gel est ensuite coulé sur des plaques de verre. Des puits sont pratiqués dans la gélose, dans lesquels 15 ul des dilutions d'immunoglobulines (ou de sérum étalon) et des échantillons étudiés sont déposés. Les lames sont ensuite entreposées en chambre humide pendant 30 à 48 heures.

La surface délimitée par les anneaux de précipitation est proportionnelle à la quantité d'Ac AT déposée dans le puits . Par mesure du diamètre des anneaux, une courbe étalon en fonction de la concentration d'Ac AT est établie ; le taux d'Ac AT en UI/ml est déterminé par interpolation sur la courbe.

Figure 1

TECHNIQUE D'IMMUNODIFFUSION SIMPLE (MANCINI (96,112))



puits 1, 2, 3, 4 : gamme étalon. Le diamètre des anneaux de précipitation est proportionnel à la concentration d'Ac AT. Une courbe $D^2 = f (\text{Ac AT})$ est tracée.

puits 5, 6, 7, 8 : échantillons à doser. Le taux d'Ac AT est déterminé par rapport à la courbe étalon.

c) Avantages et inconvénients.

Cette méthode est économique, simple et ne nécessite aucun appareillage. La sensibilité et la reproductibilité sont très bonnes, cependant le délai de 48 heures nécessaire à l'obtention des résultats fait que cette technique n'est pas utilisée en routine. De plus, la mesure du diamètre de l'anneau est entachée de subjectivité.

B) Méthode selon la technique de LAURELL (91) (100).

a) Principe (figure 2)

Sous l'influence d'un champ électrique, les anticorps migrent dans un gel contenant de l'anatoxine tétanique. La formation du complexe insoluble antigène-anticorps est visualisé sur la plaque sous forme d'un pic de précipitation. Par mesure de la hauteur du pic, on détermine, en fonction d'une gamme étalon, la concentration en Ac AT de l'échantillon étudié.

b) Technique.

Un gel d'agarose-agar à 1 % (p/v) en tampon véronal-lactate à pH 8,6 est mélangé avec de l'anatoxine à 1000 Lf/ml diluée de telle sorte qu'il y ait 0,6 à 0,85 Lf par ml de gélose. Celle-ci est coulée sur des plaques de verre ; 10 ul des dilutions de la gamme étalon (immunoglobuline ou sérum) et des échantillons à étudier sont déposés dans les puits pratiqués dans le gel. La migration dure deux heures, sous réfrigération, à raison de 150 mA par plaque. Les plaques sont ensuite lavées en eau physiologique et séchées une nuit sous papier absorbant.

Après coloration au bleu de Coomassie et décoloration, la hauteur des pics est mesurée. Le taux d'Ac AT en UI/ml des échantillons est déterminé par rapport à la courbe hauteur des pics en fonction de la concentration établie avec la référence. La réponse est linéaire jusqu'à 30 UI/ml environ.

c) Avantages et inconvénients.

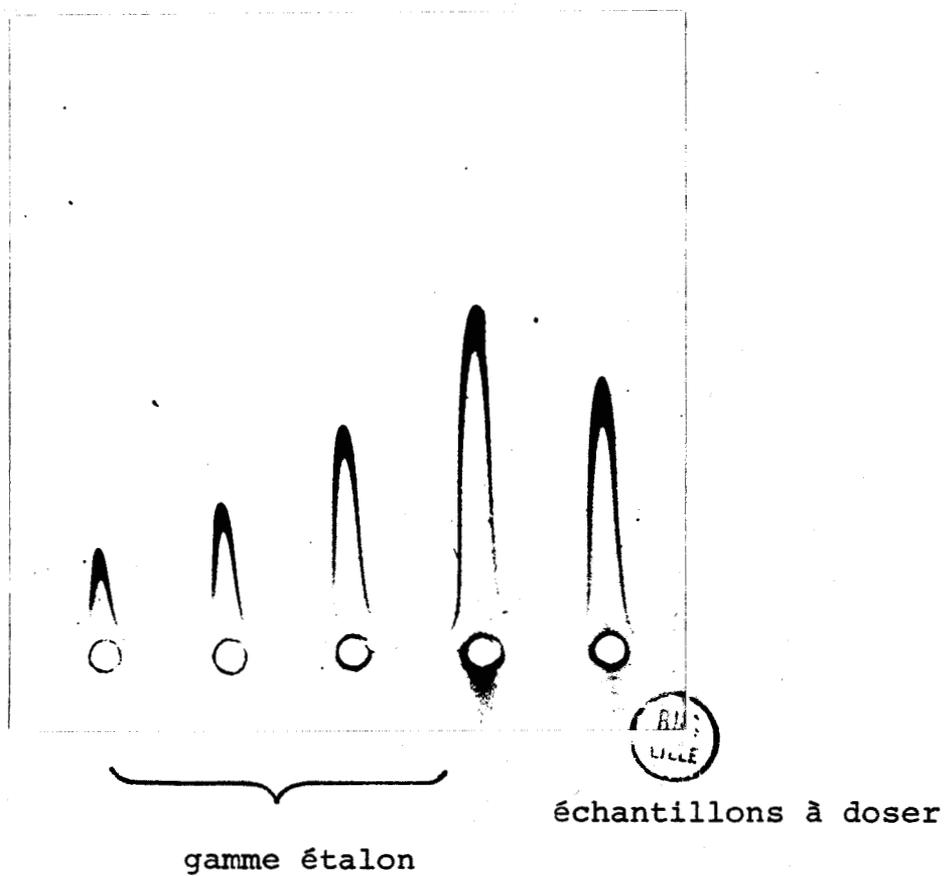
C'est une technique reproductible et peu onéreuse. La spécificité, fonction de la pureté de l'anatoxine employée, est bonne ; la sensibilité semble supérieure à celle du MANCINI (96,112).

La préparation du gel est méticuleuse. Pour titrer précisément, il est nécessaire de diluer l'échantillon pour se placer dans la zone de linéarité de la courbe.

La mesure de la hauteur du pic est subjective. Le délai d'obtention du résultat est de 24 heures.

Figure 2

TECHNIQUE D'ELECTROIMMUNODIFFUSION SIMPLE (LAURELL (91,100))



la courbe étalon $h = f(\overline{Ac AT})$ est tracée et on en déduit, par mesure de la hauteur du pic obtenu pour l'échantillon à doser, le taux d'Ac AT.

C) Electroimmunodiffusion (55) Figure 3

La méthode exposée ici est celle de ENTWISTLE et ELRIDGE (55) adaptée au laboratoire Australia du C.R.T.S. de LILLE pour le dépistage et le titrage des anticorps antitétaniques précipitants.

En 1979, 214.000 prélèvements ont ainsi été étudiés dont 18.800 (soit 9 %) ont montré des taux élevés égaux ou supérieurs à 4 UI/ml.

a) Principe.

Sous l'influence d'un champ électrique, les Ac AT et l'anatoxine migrent l'un vers l'autre dans la gélose. Dans la zone d'équivalence de concentration des deux substances, il se forme un complexe antigène-anticorps insoluble, visible sous forme d'un arc de précipitation. La distance entre cet arc et le puits où a été déposé l'échantillon permet d'apprécier le taux d'Ac AT contenu dans celui-ci par rapport à une gamme étalon.

b) Technique.

Sur des plaques de verre (14x18 cm), sont coulés 60 ml de gélose (Indubiose A 37, I.B.F.) à 1 % (p/v) en tampon véronal à pH 8,6 :

Diéthylmalonylurée sodée	10,3 g
Diéthylmalonylurée	1,84 g
Acétate de sodium	6,8 g
Azide de sodium	0,1 g
H ₂ O distillée	q.s.p. l l

ce tampon est également utilisé pour l'électrophorèse.

12 rangées de 20 puits de 4 mm de diamètre et distants de 8 mm bord à bord sont percées par une PERFODISTRIMATIC (APELAB). 25 ul des échantillons ainsi que de la gamme étalon (immunoglobuline étalon à 110 UI/ml, C.N.T.S. ; sérums à 4 et 8 UI/ml, Institut Pasteur) sont déposés dans les réservoirs situés à l'anode ; les puits situés à la cathode sont remplis d'anatoxine tétanique (1000 Lf/ml) diluée de manière à n'obtenir des arcs de précipitation que pour des taux d'Ac AT égaux ou supérieurs à 4 UI/ml. La migration est effectuée sous une intensité de 80 mA par plaque (100 V) pendant une heure.

La lecture des plaques se fait sur une boîte lumineuse à fond noir avec éclairage latéral.

Le taux approximatif d'Ac AT des échantillons est déterminé par comparaison de la distance entre puits et arcs de précipitation avec celle observée pour la gamme de référence.

Un dosage précis, notamment pour les immunoglobulines, peut être réalisé par dilution de celles-ci, du 1:10 au 1:40 en général. Le titre d'Ac AT est calculé en multipliant la dernière dilution positive par 4 UI/ml.

c) Avantages et inconvénients

Cette technique est rapide, peu coûteuse ; elle permet l'évaluation approximative du titre des sérums, plasmas ou immunoglobulines en fonction de la position des arcs de précipitation. L'avantage essentiel de cette méthode est qu'il n'y a pas d'effet de zone c'est-à-dire que des taux d'anticorps très faibles ou très élevés sont mis en évidence (2,5 à 170 UI/ml au moins). Il y a généralement une bonne correspondance avec les tests effectués sur souris, on note parfois des discordances pour les plasmas titrant moins de 4 UI/ml.

Comme pour les techniques précédemment citées, l'inconvénient majeur réside dans la subjectivité d'interprétation des résultats. D'autre part, pour déterminer le titre exact des immunoglobulines AT, de nombreuses dilutions doivent être préparées.

L'étalonnage du lot d'anatoxine est également un gros problème du fait même de la difficulté de lecture. Nous avons indiqué plus haut que la limite de détection en E.I.D. était fixée au laboratoire à 4 UI/ml

2°) Méthodes basées sur l'agglutination

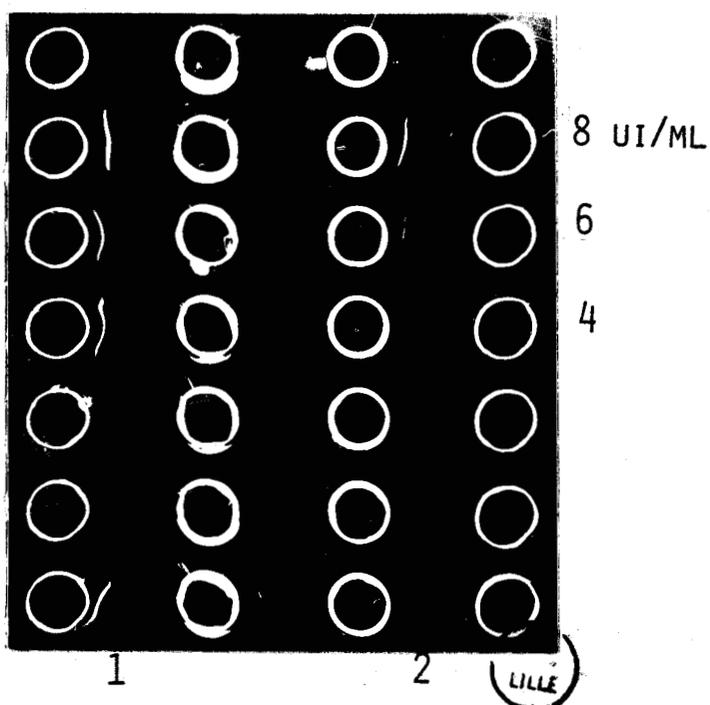
A) Principe général

Quand on met en présence un antigène fixé sur une particule et les anticorps correspondants, on observe la formation d'agrégats de plus en plus importants, en fonction de la concentration en anticorps, alors que le liquide surnageant est de plus en plus clair. Ceci est la conséquence d'une agglutination que l'on visualise facilement.

L'agglutination passive directe est utilisée pour le dépistage des Ac AT : l'anatoxine tétanique est fixée à la surface de particules, latex ou hématies, par adsorption simple ou par des procédés chimiques (action de l'acide tannique ou du glutaraldéhyde, diazotation). Quand les anticorps correspondants sont mis en présence de la suspension, la formation du complexe antigène-anticorps aboutit à l'élaboration d'un réseau de particules ; s'il n'y a pas d'Ac AT dans l'échantillon, le milieu reste homogène (particules non agrégées).

Figure 3

ELECTROIMMUNODIFFUSION DOUBLE (55)



colonne 1 : échantillons à doser. Par appréciation de la position de l'arc, le taux d'Ac AT est estimé.

colonne 2 : gamme étalon. Plus le taux d'Ac AT est élevé, plus l'arc est éloigné du puits (ici témoins à 8, 6 et 4 UI/ml).

B) Méthode au latex

ALEXANDER et MONGRIEFF (2,3) décrivent le test au latex qui est adapté par JOUJA (80) en microméthode.

HERZOG, GAIFFE, TURPIN et BIZZINI (79,46)²⁶ mettent au point une réaction sur plaque.

Des dilutions successives de raison 2 du sérum à étudier sont mélangées à volume égal avec la suspension de latex sensibilisé avec de l'anatoxine. L'ensemble est laissé en contact 3 heures à 37°C.

Dans le cas d'un résultat positif, les particules sont agglutinées au fond des godets ; le résultat est considéré comme négatif lorsque le contenu des godets reste homogène donc trouble.

Le titre agglutinant du sérum est le taux de la dernière dilution présentant une agglutination nette.

Cette technique est simple et reproductible mais ne permet pas d'obtenir directement le taux en UI/ml par rapport à un étalon mais après conversion à l'aide d'une table de correspondance.

C) Méthodes d'hémagglutination passive directe (figure 4).

a) Principe.

La technique de préparation du réactif (identique en technique manuelle et automatique) est dérivée de celle de NELSON (111). Des hématies humaines, de groupe 0 , sont revêtues d'anatoxine tétanique purissime par un agent couplant : le chlorure de chrome. Les Ac AT contenus dans l'échantillon à étudier se combinent avec l'anatoxine fixée sur les hématies - celles-ci sont donc reliées entre elles et forment des agglutinats en quantité plus ou moins importante selon la concentration d'Ac AT du sérum.

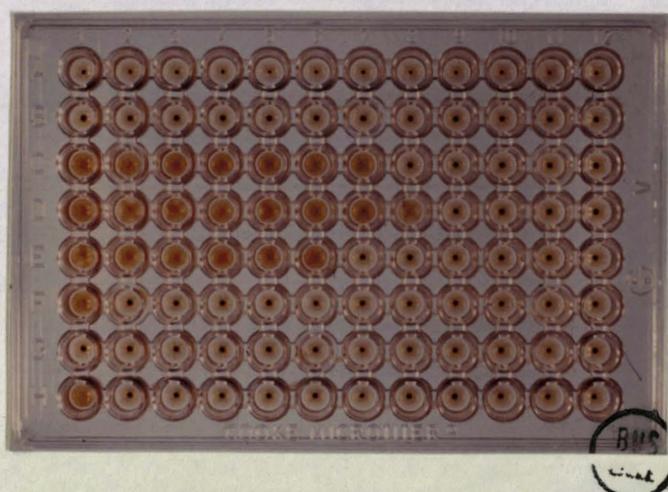
b) Techniques. (20) (51)

Différentes techniques dérivant du principe exposé ci-dessus ont été mises au point. Les variations essentielles résidant dans le choix des hématies humaines ou de cobaye, les processus d'automatisation et les dilutions des réactifs, nous ne les décrirons pas.

Toutes les techniques d'agglutination sont sujettes à l'effet de zone, la plupart ne peuvent être utilisées sur plasmas et nécessitent une ou plusieurs dilutions. Des réactions faussement positives, dues à des interférences avec le facteur rhumatoïde (Ig M anti Ig G) par exemple, sont observées.

Figure 4

HEMAGGLUTINATION PASSIVE DIRECTE



2 1

1 : témoin négatif

2 : témoin positif à 4 UI/ml

3°) Techniques nouvelles

A) Immunonéphélométrie.

a) Principe (48) (49) (130) (142)

Un complexe antigène-anticorps en phase liquide, traversé par un rayon lumineux, disperse une quantité de lumière proportionnelle à sa concentration. La source lumineuse est constituée par un rayon laser émettant un faisceau de lumière cohérente monochromatique très étroit et de haute intensité. La mesure de la dispersion de la lumière est effectuée sous un angle optimum de 31°8. Ces deux éléments : source lumineuse et angle de mesure assurent à la méthode une extrême sensibilité. La lecture s'effectue sur un écran à affichage digital directement gradué en pourcentage R.L.S (Ratio Light Scattering)

b) Applications.

Le C.T.S. de BORDEAUX (135) a fait quelques essais de mise au point qui se sont avérés peu concluants. Les causes des difficultés rencontrées sont variées :

- Les sérums chyleux ne permettent pas la moindre mesure
- Il faut utiliser des volumes de 25 à 50 µl de sérum non dilué ce qui entraîne une élévation de R.L.S. du témoin blanc sérum et des différences dosages moins témoins peu significatives.

- La forte concentration en PEG 6000 (2,5 %) permettant la réaction anatoxine - Ac AT provoque la floculation d'immunoglobulines non spécifiques. Dans ces conditions, l'étude a été abandonnée momentanément.

B) Radioimmunologie

La radioimmunologie s'est considérablement développée depuis les premiers essais de YALOW et BERSON en 1959 (172). D'abord utilisée pour le dosage de substances en très faibles quantités, telles que les hormones, elle s'est étendue, depuis 20 ans, à de nombreuses disciplines.

Ce sont des techniques en phase solide (41) (42) qui ont été utilisées pour le dosage des Ac AT. (21) (72) (146)

a) Techniques compétitives.

Cette méthode est basée sur la compétition entre les Ac AT solubles d'un échantillon et les Ac AT insolubilisés sur une phase solide pour la toxine tétanique marquée à l'iode I¹²⁵.

Dans un premier temps, les Ac AT furent insolubilisés par liaison covalente à la bromoacétylcellulose (72) (131).

La technique fut améliorée en fixant les Ac AT sur des tubes en polyéthylène (41)(42)(21).

La figure 5 montre les différentes étapes pour les deux variantes possibles.

b) Techniques non compétitives dites "en sandwich" (46) (167)

α) Principe

Le principe de ces méthodes est schématisé dans la figure 6. L'anatoxine tétanique est fixée sur une surface plastique (42). Les Ac AT mis en présence de cette phase solide, se lient, proportionnellement à leur concentration, à l'anatoxine fixée sur le polystyrène. Après incubation, la phase solide est lavée et mise en contact avec une protéine (anatoxine, IgG de lapin anti IgG humaine, etc...) marquée à l'iode I^{125} , qui se lie aux anticorps. Après un nouveau lavage, la radioactivité fixée sur la phase solide est mesurée à l'aide d'un compteur de rayonnement gamma.

Dans ces conditions, il est possible de doser les Ac AT par rapport à une gamme étalon.

β) Applications

- Technique du C.N.T.S.

DROUET (50) a mis au point une technique où la phase solide est constituée par une bille. Les Ac AT fixés sont mis en évidence par l'anatoxine tétanique marquée à l' I^{125} (67).

- Technique du C.T.S. de LILLE (104) (105)

L'anatoxine est fixée sur une plaque plastique dont les cupules sont facilement découpées lors du comptage. Pour mettre en évidence les Ac AT, on utilise de la protéine A marquée à l'iode I^{125} . Ce constituant membranaire de *St.aureus* possède la propriété de se fixer électivement sur le fragment Fc des immunoglobulines de classe IgG.

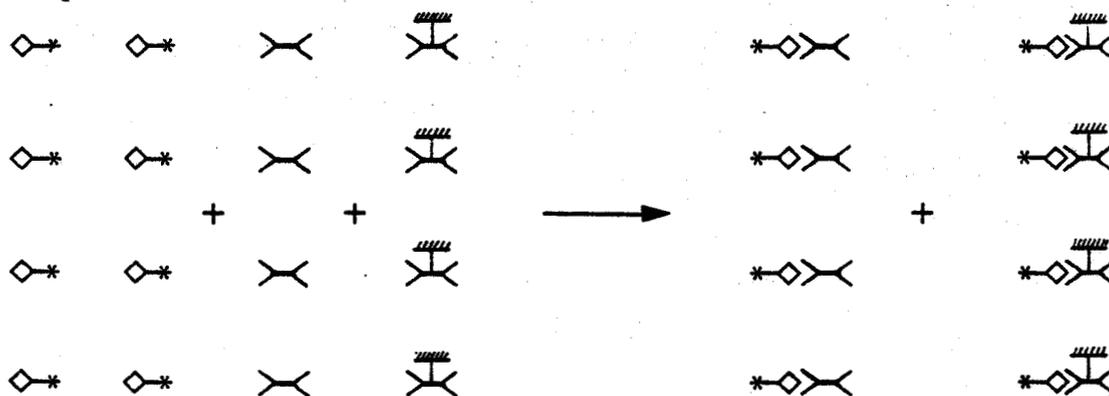
Ces techniques sont très sensibles (10^{-3} UI/ml) et précises, elles sont semi-automatisables.

Les critères d'objectivité des résultats, de reproductibilité et de sensibilité sont respectés ; la correspondance avec le test souris est bonne. Cependant, l'équipement coûteux et l'utilisation, strictement réglementée, des radioéléments, font de ces techniques un domaine réservé à quelques centres importants.

Figure 5

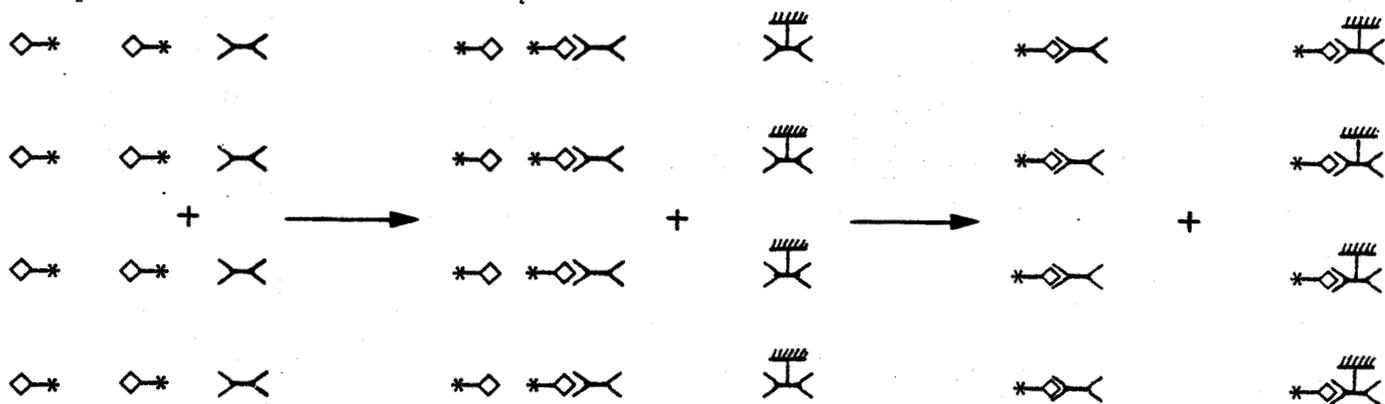
DOSAGE DES ANTICORPS ANTITETANQUES
PAR METHODE RADIOIMMUNOLOGIQUE COMPETITIVE

Compétition



mesure de la radioactivité de l'une et/ou l'autre phases

Compétition avec saturation séquentielle



mesure de la radioactivité de l'une et/ou l'autre phases

-  toxine tétanique marquée à l'iode I¹²⁵
-  anticorps antitétaniques standard ou échantillon à doser
-  anticorps antitétaniques insolubilisés sur - bromoacétylcellulose ()
- tube polyéthylène ()



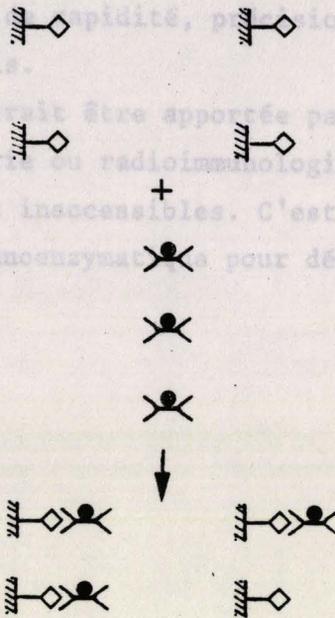
III) CONCLUSION

Figure 6

DOSAGE DES ANTICORPS ANTITÉTANQUES
PAR METHODES RADIOIMMUNOLOGIQUES NON COMPETITIVES

anatoxine tétanique
insolubilisée
sur : .sepharose 4 B
.bille ou cupule
plastique

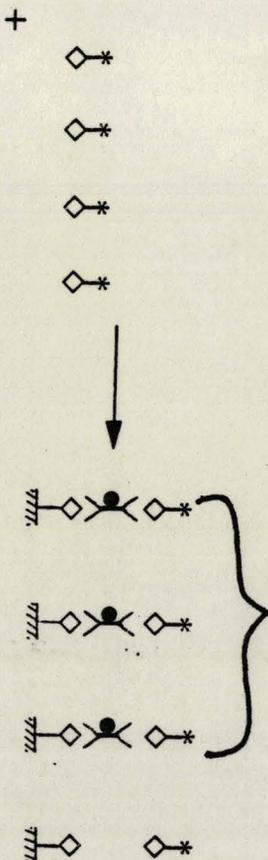
Anticorps antitétaniques



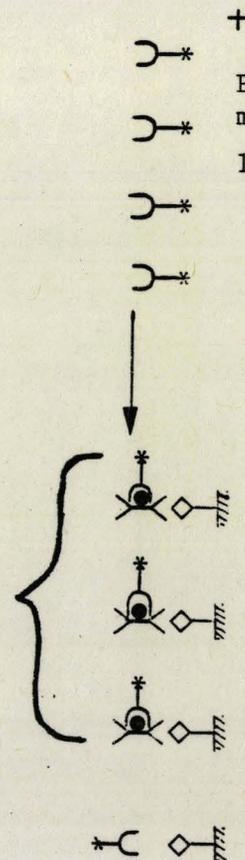
méthode "sandwich"

méthode indirecte

anatoxine
marquée à
l'iode I¹²⁵



Protéine A
marquée à
l'iode I¹²⁵



mesure de la radioactivité

BUS
LILLE

L'IMMUNOENZYMOLOGIE

La législation concernant l'utilisation des substances radioactives et le coût élevé du matériel nécessaire, limitent l'emploi des techniques radioisotopiques à quelques centres importants.

Il n'est donc pas possible de développer dans tous les C.T.S. une méthode radioimmunologique de dépistage et de dosage des Ac AT.

Les techniques immunoenzymatiques sont basées sur les mêmes principes que la radioimmunologie. L'immunoenzymologie réunit les avantages de celle-ci, sans en avoir les inconvénients : les réactifs marqués avec un enzyme sont aisés à préparer, se conservent facilement ; l'amplification par action de l'enzyme permet d'accéder à des sensibilités et des spécificités voisines ou identiques à celles des méthodes radioimmunologiques, et elle donne des résultats objectifs.

Dans ce chapitre, nous exposerons, après l'historique, les principes des différentes techniques immunoenzymatiques et les applications de l'immunoenzymologie dans différents domaines de la biologie. Nous aborderons ensuite les premiers essais d'adaptation aux dépistage et dosage des anticorps anti-tétaniques. Ceci nous permettra d'introduire et de justifier le choix de la méthode que nous avons mise au point.

I) HISTORIQUE

C'est dans le domaine de l'histochimie que l'immunoenzymologie fut utilisée pour la première fois.

En 1950, COONS et KAPLAN (45) mettaient au point la technique d'immunofluorescence pour localiser des constituants cellulaires. De nombreuses méthodes immunocytologiques ont été développées depuis, elles ont toutes un point commun : une substance marqueur liée à un anticorps et visible en microscopie optique ou électronique (voire les deux).

De très nombreux marqueurs ont été employés :

- substances fluorescentes (45), surtout en microscopie optique
- substances radioactives utilisées par BERENBAUM en 1959 (22)
- la ferritine, utilisée par SINGER (141) surtout pour des études ultrastructurales.

- des métaux lourds, utilisés en 1961 par PEPE (117).

Mais aucun de ces marqueurs n'est pleinement satisfaisant.

L'immunofluorescence est une technique longue et difficilement automatisable, l'utilisation des isotopes radioactifs est coûteuse et régie par une

législation sévère. La masse moléculaire importante de la ferritine (747000 daltons) gêne la pénétration du complexe anticorps-ferritine dans les tissus. Les enzymes ont donc été envisagés comme marqueur.

Les études de STRAUS en 1964 (148) puis celles de GRAHAM et KARNOVSKY en 1966 (65) préconisent la peroxydase de raifort (horse radish peroxydase : HRP ; E.C.1.11.1.7) comme traceur.

En 1966, NAKANE et PIERCE (109) marquent les anticorps avec la HRP par l'intermédiaire du p p' difluoro- m m' dinitrophényle sulfone (FNPS).

Simultanément, une autre équipe : AVRAMEAS et URIEL (14), utilise également un conjugué anticorps-HRP, le couplage étant réalisé à l'aide de carbodiimides hydrosolubles.

Ces conjugués sont utilisés pour localiser des constituants en histochimie (14) (109) ou pour doser des protéines en immuno-diffusion (14).

Un progrès très important est dû aux travaux d'AVRAMEAS qui en 1968 (6) et 1969 (7), emploie le glutaraldéhyde comme agent bifonctionnel de couplage entre protéine et enzyme. La méthode de couplage est, par la suite, améliorée par AVRAMEAS et TERNYNCK (13) en 1971.

En 1971, l'immunoenzymologie prend un essor considérable. Jusque là cantonnée à la localisation des constituants cellulaires et à l'étude de la synthèse des anticorps (8) (144), l'immunoenzymologie est appliquée, à partir de cette date, au dosage quantitatif des déterminants membranaires des cellules lymphoïdes (9) mais aussi à l'analyse quantitative des liquides biologiques et humoraux.

La méthodologie développée pour la mise en place de ces techniques est comparable à celle utilisée pour la radioimmunologie (102). Ainsi, AVRAMEAS et GUILBERT (10), ENGVALL et PERLMANN (53) et VAN WEEMEN et SCHUURS (153) mettent en compétition l'antigène à doser et le même antigène couplé à un enzyme pour la liaison avec l'anticorps homologue, fixé sur une phase solide (constitué, en l'occurrence de cellulose activée au CNBr). Au cours de ces essais, des concentrations de l'ordre de 1 à 100 ng/ml de protéines ont été déterminées.

En 1972, ENGVALL et PERLMANN (155) utilisent pour le premier dosage d'anticorps le principe de fixation des protéines sur tubes de polystyrène, mis au point par CATT et TREGGAR en 1967 (42), pour la radioimmunologie. VAN WEEMEN et SCHUURS (154) réalisent des dosages d'haptènes.

Toutes les techniques immunoenzymatiques dont nous avons parlé se déroulent en phase hétérogène, c'est-à-dire qu'il y a une étape de séparation du conjugué lié d'avec le conjugué resté libre.

En 1972, RUBINSTEIN et coll. (134) mettent au point une technique dite "en phase homogène", car elle ne nécessite pas de séparation.

En 1973, les méthodes de dosage se fondant sur un mode de réaction non compétitif se développent (19) (98).

NAKANE et KAWAOI étudient, en 1974, une nouvelle méthode de couplage basée sur l'oxydation périodique de la copule glucidique de certains enzymes et permettant de les lier à des protéines (108).

La même année, VOLLER (158) remplace les tubes en polystyrène habituellement employés comme support, par des plaques de microtitration COOKE de même nature chimique. Cette innovation ouvre de larges perspectives d'utilisation pour la technique immunoenzymatique qui peut ainsi être pratiquée à plus grande échelle et automatisée facilement.

A l'heure actuelle, les méthodes immunoenzymatiques sont largement employées dans de nombreux domaines.(voir appendice).

II) DOSAGES IMMUNOENZYMATIQUES

Ils sont tous basés sur l'utilisation d'un complexe obtenu par liaison d'un antigène ou anticorps avec un enzyme qui permettra le dosage en fin de réaction.

Ceci n'est possible que si ce conjugué conserve ses activités immunologique et enzymatique et, dans le cadre des techniques fondées sur la compétition, s'il garde la même constante d'affinité que la protéine à doser.

Ces techniques peuvent être classées en fonction de critères très divers, toutefois nous avons essentiellement retenu l'existence ou non d'une étape de séparation conjugué lié / conjugué libre, ce qui nous permet de différencier les techniques en phase homogène des techniques en phase hétérogène. De nombreuses dénominations ont été attribuées à ce deuxième type de méthodes (phase hétérogène) :

E.I.A. : Enzyme immunoassay

E.L.A. : Enzyme labelled assay

C.E.L.I.A. : Competitive enzyme linked immunoassay

E.L.I.S.A. : Enzyme linked immunosorbent assay

Ce dernier terme est, peut-être, le plus approprié car il identifie phases homogène et hétérogène en même temps qu'il différencie ces techniques de celles employées pour les réactions de coloration en microscopie.

Dans un premier temps, les différents principes de réaction seront envisagés. Nous verrons ensuite les problèmes de méthodologie concernant chaque étape de ces techniques : (préparation de la phase solide, du conjugué, etc...).

1°) Schémas réactionnels

Le principe de la réaction immunoenzymatique utilisant de nombreuses variantes techniques en fonction du type de dosage à effectuer, il nous a semblé plus clair d'exposer séparément les techniques les plus utilisées en les regroupant dans un cadre arbitraire dépendant du principe de la réaction immunologique.

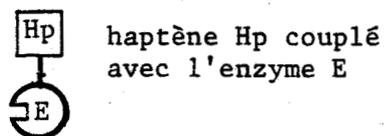
A) Dosage immunoenzymatique en phase homogène (figure 7)

a) Principe

RUBINSTEIN (134) utilisa cette méthode pour le dosage de la morphine. La morphine, couplée au lysozyme, est incubée avec des anticorps

Figure 7

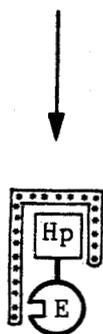
DOSAGE EN PHASE HOMOGENE POUR L'HAPTENE



échantillon négatif

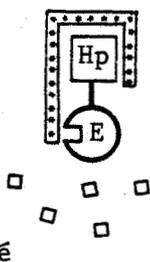
+ échantillon à doser

+ Ac anti-Hp



activité de l'enzyme
inhibée

+ substrat

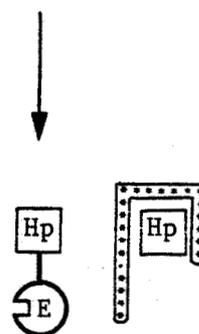


substrat
non dégradé

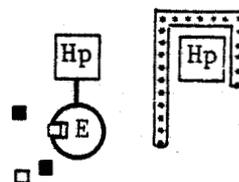
□ substrat

■ produit chromophore

échantillon positif



activité de l'enzyme
préservée



■ produit chromophore
obtenu par dégradation
du substrat



- La fixation de l'anticorps (dirigé contre l'haptène) sur le complexe doit induire une inhibition de l'activité enzymatique la plus importante possible.

- L'anticorps anti-haptène ne doit pas modifier l'activité de l'enzyme lorsque l'haptène n'est pas couplé avec celui-ci.

Récemment, une technique en phase homogène utilisable pour les protéines de n'importe quelle taille a été développée (61). Des protéines sont couplées à la β -galactosidase d'E.coli. La fixation d'Ac dirigés contre ces protéines sur le conjugué entraîne une inhibition de 95 % de l'activité de l'enzyme, si le substrat chromogénique utilisé est de taille importante ; l'inhibition n'est pas observée pour des substrats de faible taille (ceci donne à penser que l'inhibition serait d'origine stérique). Cette technique a permis de détecter des quantités d'IgG humaines de l'ordre de 0,25 à 4,0 nMoles.

La sensibilité est identique à celle des techniques développées pour des haptènes.

B) Dosage immunoenzymatique en phase hétérogène.

a) Dosage des antigènes

α) Par compétition (figure 8)

L'antigène à doser est mélangé avec l'antigène couplé à l'enzyme, ils entrent alors en compétition pour la fixation sur une faible quantité d'anticorps. Toutes les molécules d'anticorps sont liées à des molécules d'antigène. L'antigène lié (couplé ou non à l'enzyme) est ensuite séparé de l'antigène libre (couplé ou non à l'enzyme).

* Si la réaction a lieu en milieu liquide, les méthodes employées seront : la précipitation par le polyéthylène glycol ou le sulfate d'ammonium, la méthode du double anticorps (pour l'Ag lié), ou les séparations sur charbon actif ou résines échangeuses d'ions (pour l'Ag libre). Toutes ces techniques sont couramment employées en radioimmunologie.

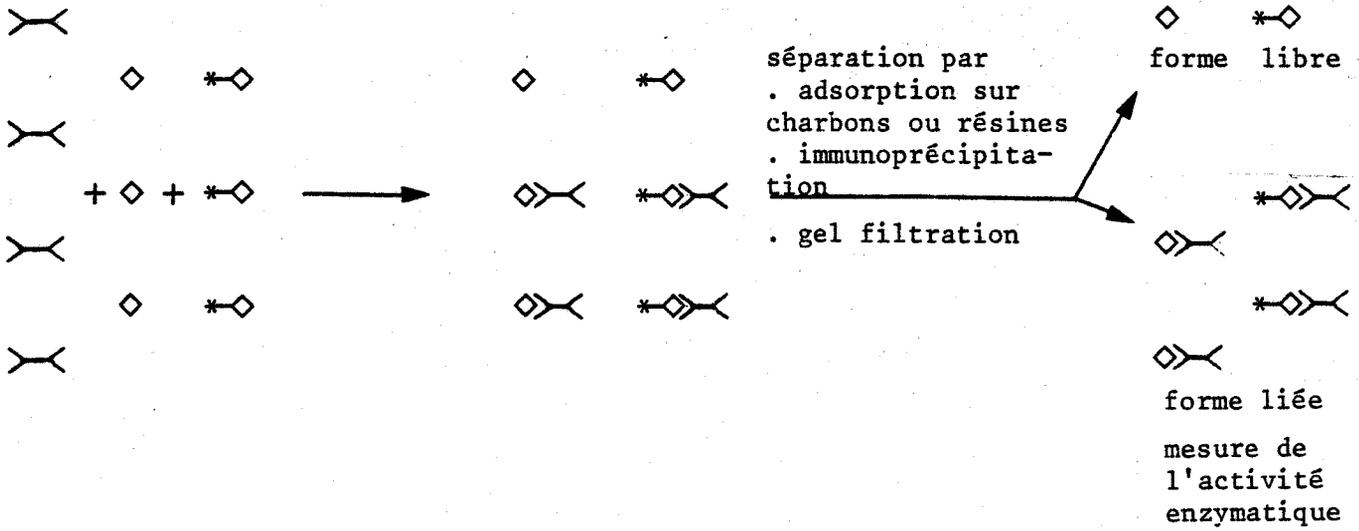
* Si la réaction a lieu en phase solide, c'est-à-dire si l'anticorps est fixé sur cellulose ou sur plastique, la séparation s'effectue par simple lavage suivi de centrifugations si on utilise la cellulose. L'activité enzymatique est ensuite déterminée par addition d'un substrat dont la dégradation aboutit à un produit coloré, le plus souvent, ce qui permet une lecture au spectrophotomètre ou visuelle.

L'activité enzymatique sera d'autant moins importante qu'il y aura plus d'antigène dans l'échantillon à doser (figures 8a et 8b).

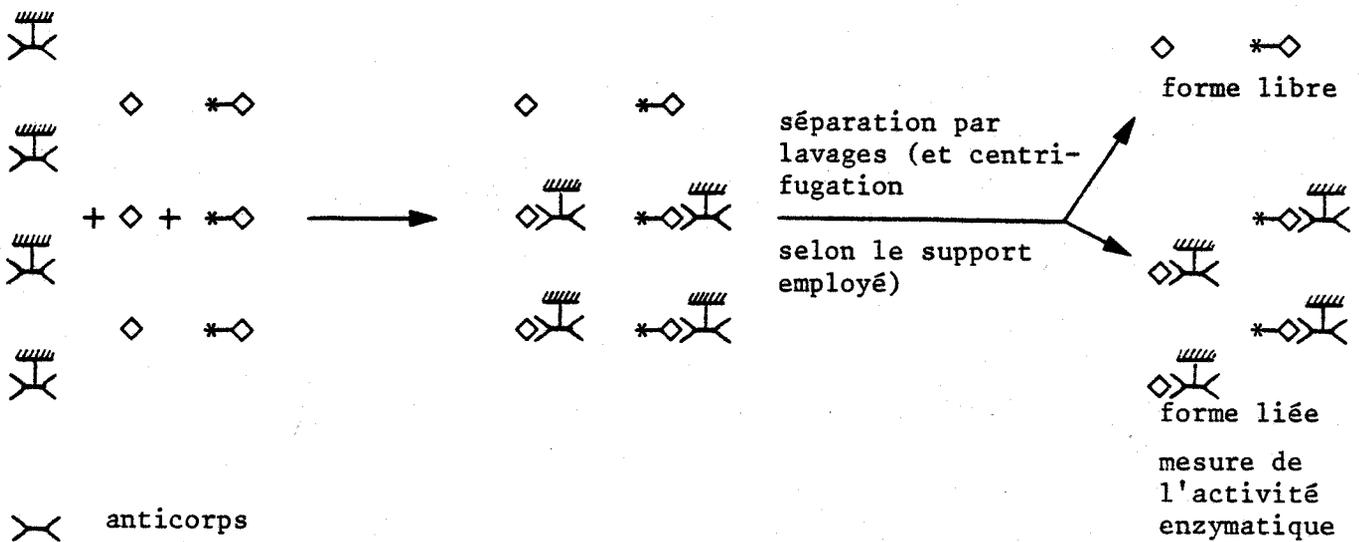
Figure 8

DOSAGE DES ANTIGENES PAR METHODES COMPETITIVES

a) en milieu liquide



b) en phase solide



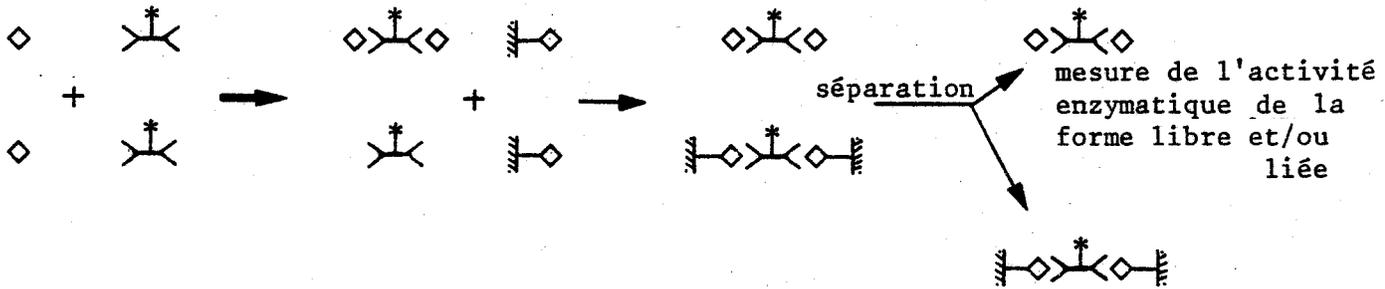
-  anticorps
-  anticorps insolubilisé sur support solide
-  antigène
-  conjugué antigène-enzyme



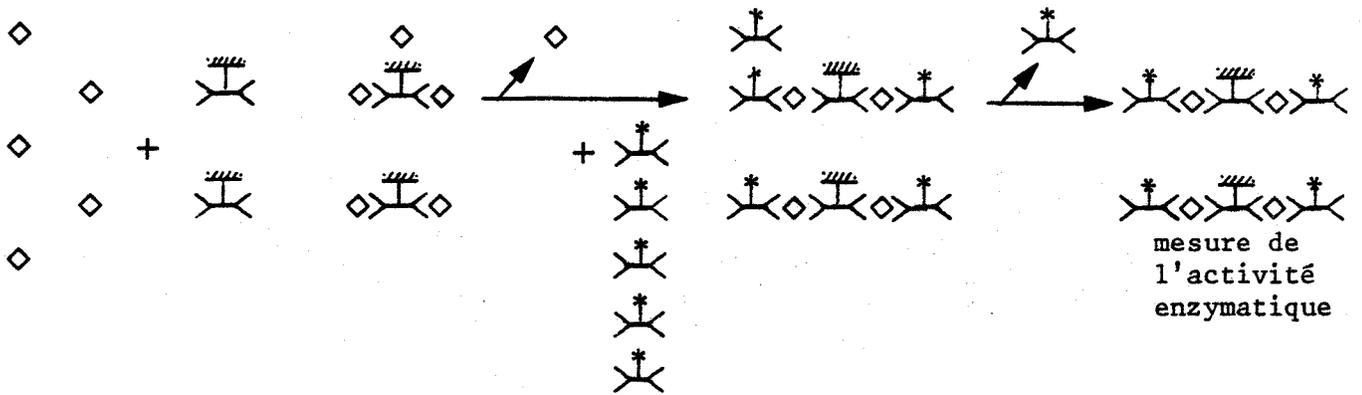
Figure 9

DOSAGE DES ANTIGENES PAR METHODES NON COMPETITIVES

a) Méthode immunoenzymométrique



b) Méthode sandwich



- ◇ antigène
- ▨ antigène insolubilisé sur support solide
- ▧ anticorps insolubilisé sur support solide
- Y* conjugué anticorps-enzyme



β) Méthodes non compétitives (figure 9)

* Méthode immunoenzymométrique (en milieu liquide).

Le principe est le même que celui du dosage radioimmunométrique : l'anticorps couplé à l'enzyme est ajouté en excès à l'antigène correspondant à doser de telle sorte que celui-ci soit totalement utilisé.

Après incubation, des particules solides (cellulose, sépharose 4 B, etc...) sur lesquelles ont été fixées par covalence des molécules d'antigène, sont ajoutées en excès. Celles-ci fixent donc le conjugué Ac-enzyme n'ayant pas réagi et sont éliminées par centrifugation. L'activité enzymatique est mesurée dans le surnageant. Elle est d'autant plus importante que l'antigène était présent en grande quantité dans l'échantillon étudié.

* Méthode double anticorps dite "sandwich" (en phase solide). Cette technique, inspirée de la méthode radioimmunologique décrite par WIDE (167), n'est applicable que pour les antigènes possédant au moins 2 sites de fixation des anticorps. La substance à doser est incubée avec un excès d'anticorps insolubilisé sur une phase solide. Toutes les molécules d'antigène se fixent. Le même anticorps, couplé à l'enzyme est ensuite ajouté en excès également ; il vient se fixer sur le deuxième site de l'antigène. L'excès de conjugué anticorps-enzyme est éliminé par lavage et le dosage enzymatique permet de déterminer la quantité de conjugué lié à la phase solide, donc le taux d'anticorps.

Toutes ces méthodes permettent de doser des antigènes avec une sensibilité à peu près identique à celle des dosages radioimmunologiques.

b) Dosage des anticorps (figure 10)

α) Par compétition (figure 10a)

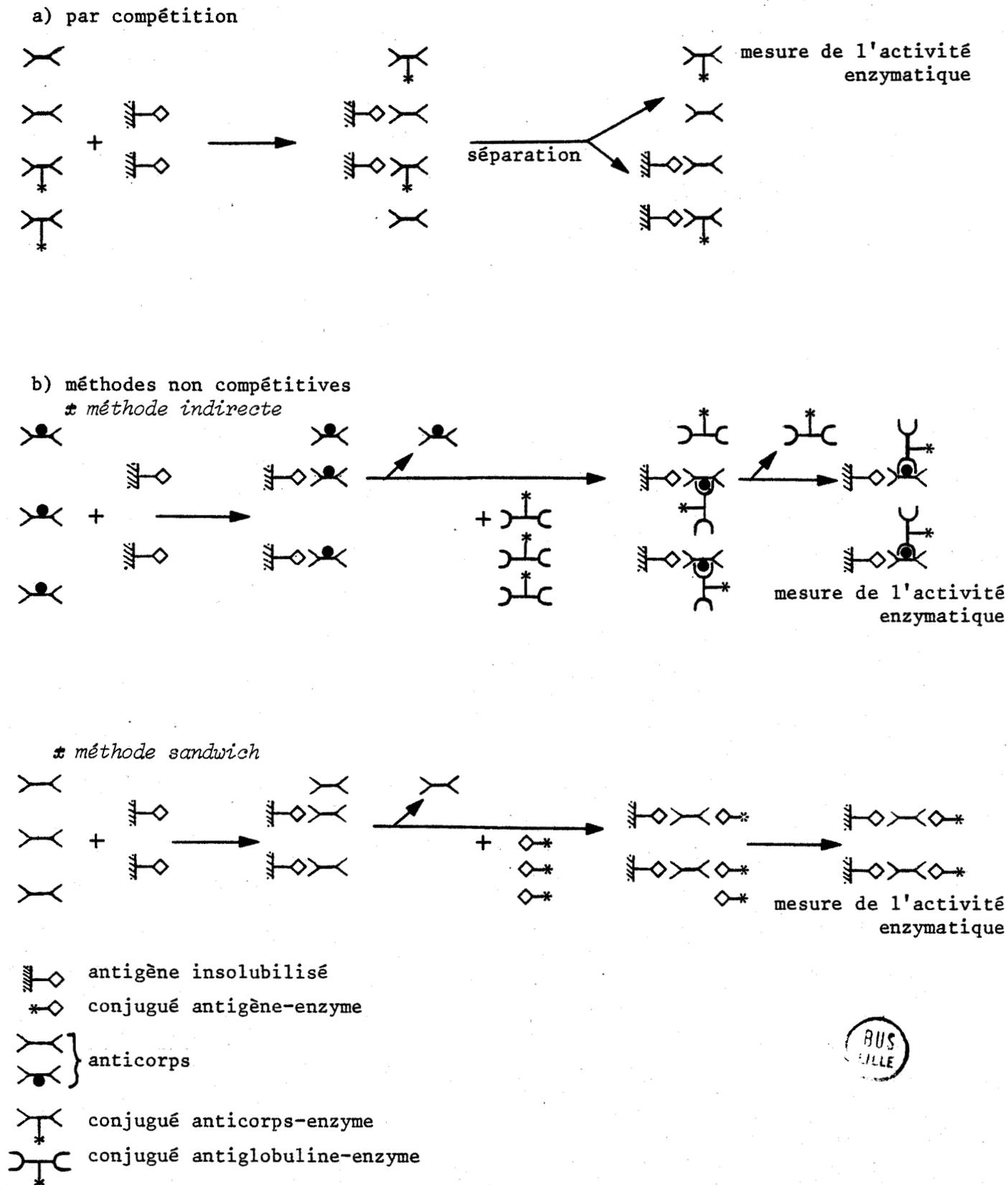
L'anticorps à doser est mélangé à une quantité connue du même anticorps marqué par un enzyme. Les deux anticorps entrent en compétition pour la fixation sur les molécules d'antigène correspondant insolubilisé. Après séparation et élimination de la phase solide, l'activité enzymatique est dosée dans le surnageant. L'activité est inversement proportionnelle à la quantité d'anticorps contenue dans l'échantillon à étudier.

β) Méthodes non compétitives (figures 10b et 10c)

* Avec anti-globuline marquée (figure 10b) dite méthode indirecte : L'antigène est insolubilisé sur une phase solide. Le sérum à étudier est mis en présence de cet antigène et les anticorps homologues se fixent par l'intermédiaire de l'antigène sur cette phase solide. Un lavage permet

Figure 10

DOSAGE DES ANTICORPS



d'éliminer le sérum et les composants qui n'ont pas réagi. Une anti-globuline, c'est-à-dire des anticorps (de lapin, mouton, etc...) anti Ig humaines, couplée à un enzyme est ajoutée et se fixe sur toute molécule d'anticorps liée à la phase solide. Par lavage, l'excès d'anti-globuline est éliminée et le substrat est finalement introduit. La dégradation du substrat par l'enzyme en un produit coloré permet de quantifier le conjugué fixé et, par là même, le taux d'anticorps de l'échantillon. Selon l'antiglobuline utilisée (anti IgG ou anti IgM), il est possible de différencier la classe d'Ig étudiée.

* Avec l'antigène marqué (figure 10c).

L'antigène est fixé sur une phase solide, l'anticorps à doser est ajouté et se fixe à la phase solide par réaction avec l'antigène. L'excès de réactif est éliminé par lavage, puis le même antigène, marqué par un enzyme, est ajouté. Il se fixe sur le site anticorps resté libre. Il suffit, après lavage, d'ajouter le substrat de l'enzyme pour pouvoir déterminer la quantité d'Ac introduite au départ.

Ce sont les techniques les plus couramment utilisées qui ont été exposées ici. De nombreuses variantes en ont été tirées (BELANGER (18)).

2°) Réactifs nécessaires à la réalisation de dosages immunoenzymatiques

Nous ne décrivons ici que les principaux réactifs utilisés dans les techniques en phase hétérogène, ceux employés au cours des techniques en phase homogène ayant déjà été cités :

- Les réactifs de séparation du conjugué lié/ libre.

* En milieu liquide : ils ont été décrits dans la technique de dosage compétitif des antigènes.

* En phase solide : anticorps ou antigène insolubilisé (immunoadsorbants)

- Obtention du conjugué par couplage d'un antigène ou d'un anticorps avec l'enzyme.

- Substrat de l'enzyme.

A) L'immunoadsorbant.

L'immunoadsorbant peut se définir comme un matériel insoluble dont certains constituants possèdent la propriété de pouvoir se combiner spécifiquement à des protéines. Il peut être obtenu par fixation chimique irréversible ou adsorption physique d'anticorps ou d'antigènes, sans qu'il y ait perte d'activité biologique, sur une matrice insoluble ou par polymérisation des

anticorps ou antigènes à l'aide de réactifs chimiques bifonctionnels.

Les immunoadsorbants ont été utilisés comme phase solide pour séparer les composés libres et liés dans les techniques radioimmunologiques et immunoenzymatiques.

a) Gels

Dans la première technique développée par ENGVALL (53) et VAN WEEMEN (153), les anticorps anti-HCG étaient couplés, soit à une m-aminobenzyl-oxyméthylcellulose selon le procédé de CAMPBELL et WELIKY (37) - soit à une cellulose microcristalline activée au CNBr (bromure de cyanogène) selon les techniques décrites par AXEN et PORATH (15) ou WIDE (166) (168). Il est également possible d'insolubiliser une protéine (antigène ou anticorps) sur du sépharose 4 B activé au CNBr ; ce type de phase solide a été utilisé par KATO et al.(83) (84) et STREEFKER et al. (149). On peut aussi lier des protéines à du Séphadex ou à de la cellulose microcristalline traités par oxydation périodique (57) (169). Les fonctions aldéhydes apparaissant sur le support traité réagissent avec les groupements aminés libres de la protéine. MAIOLINI et al.(95) ont utilisé comme phase solide un immunoadsorbant obtenu en polymérisant l' α -foetoprotéine semi-purifiée par addition de glutaraldéhyde selon la technique d'AVRAMEAS et TERNYNCK (12). Le glutaraldéhyde possède deux groupements aldéhydiques actifs qui réagissent avec les groupements aminés des protéines (surtout ϵ -aminés de la lysine) établissant ainsi des liaisons covalentes. La formation de polymères conduit à l'apparition d'un réseau de protéines insolubles formant gel. L'insolubilisation d'une protéine est quantitative aux alentours de son point isoélectrique ; en général, pour éviter une trop grande perte d'activité biologique, la réaction s'effectue à pH 5.0 (dans le cas de l'AFP (95) elle a été réalisée à pH 7.0).

Tous ces immunoadsorbants sont préparés facilement, cependant leur utilisation comme phase solide dans les techniques immunoenzymatiques nécessite des centrifugations au cours des étapes de lavage et de séparation. Une amélioration a été apportée avec la mise au point par GUESDON et AVRAMEAS (69), de billes composées d'un mélange d'agarose et de polyacrylamide et rendues magnétiques par l'inclusion, au coeur du gel, de $FeSO_4$. Sur ces billes, commercialisées par IBF sous le nom de MAGNOGEL 44, il est possible de fixer un antigène ou un anticorps suivant les protocoles mis au point pour les gels d'agarose (122) ou de polyacrylamide (165).

GUESDON l'a utilisé comme support solide dans le dosage immunoenzymatique des IgE (70).

b) Solides

CATT et TREGGAR (42) avaient développé, pour la radioimmunologie, l'utilisation de tubes plastiques recouverts d'antigène ou d'anticorps comme phase solide. ENGVALL et PERLMANN (54) reprirèrent ce principe au profit de l'immunoenzymologie. En effet, un grand nombre de molécules sont susceptibles de s'adsorber sur les plastiques : glycoprotéines (75), lipoprotéines (60), DNA (52) (68) (119) mais aussi polysaccharides bactériens, seuls (38) ou liés à la poly-L-Lysine (66). On ne connaît rien du mécanisme de cette fixation mais la nature chimique de la matière plastique utilisée (polyvinyles, polystyrènes, etc...) semble jouer un rôle essentiel dans ce processus (43). De plus on observe quelquefois une différence de capacité d'adsorption des protéines entre différents lots de fabrication de plastique. Après les tubes, VOLLER et al. (158) utilisèrent des plaques de microtitration qui conviennent particulièrement aux études à grande échelle et permettent une économie de réactifs.

HAMAGUCHI (74) puis KATO (86) employèrent des morceaux de silicone ou des tiges de verre comme support (73). Des disques de papier plastifié (40) et même des parcelles de verre (163) furent également utilisés dans des méthodes mises au point pour le dépistage de l'Ag HBs (antigène associé à l'hépatite virale de type B).

Actuellement, le support solide le plus couramment employé est la plaque de microtitration (COOKE).

Il existe différents systèmes d'incubation pour recouvrir les parois plastiques avec un antigène ou un anticorps. Le système de CATT et TREGGAR est le plus fréquemment appliqué.

L'antigène ou l'anticorps est solubilisé dans un tampon carbonate - bicarbonate à pH 9.6 , cette solution est déposée dans le tube ou la cupule à sensibiliser et laissée en contact à des températures et pendant des périodes variables selon la protéine.

Un certain nombre de travaux décrivent un autre système (143) (68) (60) (99) (92) (74) (86) : le tampon dans lequel la protéine à fixer est mise en solution est à un pH proche de la neutralité pH 7.2 - 7.4 (eau physiologique tamponnée par des ions phosphates ou tampon PBS). Les

paramètres de temps d'incubation, température et concentration en protéine sont à déterminer en fonction du système antigène-anticorps utilisé.

Selon la technique développée par la suite, les préparations d'antigènes ou d'anticorps seront partiellement ou totalement purifiées, ceci pour améliorer la spécificité des réactions immunologiques mises en jeu. Les tubes ou plaques sensibilisés sont faciles et rapides d'emploi et permettent l'automatisation. Cependant, leur usage présente deux inconvénients majeurs :

- Les substances sont simplement adsorbées physiquement, il peut donc se produire des pertes de matériel adsorbé au cours des incubations et lavages répétés. Pour pallier ce handicap, BOENISCH (28) traite les plaques au glutaraldéhyde avant adsorption de la ferritine. SOHL-AKERLUND et al. (143), après avoir sensibilisé des plaques de microtitration dans le but de doser des IgA, fixent la protéine adsorbée par addition de glutaraldéhyde. Ces méthodes ne seront pas fréquemment reprises.

- La capacité d'adsorption est limitée et ceci d'autant plus qu'on travaille en microméthode (plaques COOKE). Par contre, les étapes de séparation sont simplifiées par l'utilisation de tels supports puisqu'elles se font par lavage.

A l'heure actuelle, les recherches se poursuivent pour trouver de nouveaux supports plastiques (116) et définir les facteurs influençant l'adsorption des protéines (106) (82). La plupart des techniques immunoenzymatiques sont réalisées en tubes (macrométhodes) ou sur plaques de microtitration (microméthodes), ainsi l'automatisation est plus aisée à mettre en oeuvre.

B) Le conjugué

Différents facteurs interviennent dans la préparation d'un conjugué protéine-enzyme. Celui-ci doit conserver son immunoréactivité tout en ayant une activité spécifique importante.

a) L'enzyme :

Le choix de l'enzyme doit être effectué en fonction d'un certain nombre de critères :

L'enzyme doit avoir un haut degré de pureté et l'activité spécifique la plus importante possible, cette activité ne doit pas, ou peu, être réduite après le couplage avec l'antigène (ou l'anticorps). Il faut d'autre part, que l'enzyme soit stable à température du laboratoire, de même que le conjugué

obtenu après couplage. Ce complexe protéine-enzyme doit être soluble et se conserver facilement. L'enzyme ne doit, ni être sensible à des effecteurs, ni être présent dans le milieu à doser.

La mise en évidence de l'activité enzymatique doit être simple, rapide et sensible. Les enzymes dont l'activité donne naissance à un produit coloré sont utilisés préférentiellement.

Il n'existe pas d'enzymes idéaux de ce point de vue, un certain nombre pourtant, remplissent suffisamment de conditions pour pouvoir être utilisé : la phosphatase alcaline (8), la peroxydase de raifort (53), la glucose oxydase (94) et la β -D galactosidase (85) ; actuellement, le marquage des protéines est principalement réalisé à l'aide des deux premiers.

b) La protéine

La molécule marquée par l'enzyme peut être un antigène ou un anticorps. Comme pour la préparation de la phase solide, une purification plus ou moins poussée de ces substances est nécessaire pour éliminer les interactions non spécifiques pouvant se manifester au cours de toute réaction immunologique. Les antigènes étant de nature très variable (surtout les haptènes), les méthodes de purification leur sont propres et leur énumération en serait fastidieuse. Des principes classiques peuvent être mis en jeu pour obtenir un haut degré de pureté : chromatographies de gel-filtration, d'échange d'ions ou en couche mince - précipitations au sulfate d'ammonium ou éthanoliques - extraction par des solvants et même ultracentrifugation ou chromatographie d'affinité. Les anticorps possèdent une structure commune quelle que soit l'espèce productrice ce qui permet un schéma de préparation identique. Le degré de pureté du matériel à marquer dépend de l'essai à réaliser. Dans la plupart des cas, il suffit d'utiliser la fraction d'immunoglobulines totale obtenue par précipitation saline ou par chromatographie d'échange d'ions. Cependant l'utilisation d'anticorps spécifiques ou de la fraction F(ab) des immunoglobulines permet de diminuer l'intensité de la coloration de fond (dûe aux réactions non spécifiques) et d'utiliser le conjugué à des dilutions plus importantes.

Les anticorps spécifiques d'un antigène sont obtenus par chromatographie d'affinité (46). Un immunoabsorbant sur lequel a été greffé un antigène, fixe tous les anticorps spécifiques de cet antigène tout en adsorbant le moins possible d'anticorps non spécifiques. Les anticorps fixés réversiblement et ainsi isolés de l'antisérum sont dissociés du support sous l'influence d'une variation de pH ou par des agents dissociants tels que : KCN, urée, chlorhydrate de guanidine, etc...

Les techniques classiques de préparation des immunoabsorbants ont déjà été évoquées dans le paragraphe 2° concernant la phase solide. L'antigène peut être couplé à la cellulose ou au sépharose, à des billes de polyacrylamide ou de verre ; il peut être insolubilisé par polymérisation au moyen de réactifs bifonctionnels.

Le fragment F(ab) des immunoglobulines est obtenu par action de la papaïne (123) sur les Ig totales.

Quelle que soit la technique de purification choisie, il est préférable d'employer au départ un sérum hyperimmun contenant un taux élevé d'anticorps spécifiques.

c) Réaction de couplage

La nature très variable des antigènes implique l'utilisation de méthodes de couplage spécifiques à chacun d'eux. Certaines techniques de couplage font intervenir uniquement les parties protéiques de l'anticorps et de l'enzyme par l'intermédiaire d'agents bifonctionnels comme le glutaraldéhyde ; d'autres techniques utilisent la copule glucidique de l'enzyme si elle existe. Les premiers couplages furent réalisés avec des agents bifonctionnels comme le 4,4' difluoro 3,3' dinitro diphénylsulfone (107) (110) qui donne de bons résultats. Depuis, de très nombreux agents couplants ont été essayés : carbodiimides (14), chlorure de l'acide cyanurique (11), orthodiansidine-bisdiazotée (6).

Il existe actuellement 3 modes principaux de couplage chimique : deux d'entre eux font appel à un agent bifonctionnel, dimaléimide ou glutaraldéhyde, le troisième met en jeu l'oxydation périodique de la copule glucidique de la H.R.P. . Un dernier procédé de couplage fait intervenir la liaison immunologique, il permet d'obtenir le complexe peroxydase-anti peroxydase.

α) Couplage par le N,N' orthophenylène-dimaléimide

Cette procédure a été utilisée par KATO et al. (83) ; par l'intermédiaire de la dimaléimide il s'établit un pont entre les groupements SH - libres de l'enzyme et de l'anticorps. Si les groupements SH - sont bloqués, on emploie l'ester benzoïque de la N hydroxy-maléimido-succinimide qui réagit avec les groupements NH₂ . Les conjugués obtenus ont permis de réaliser les essais les plus sensibles en immunoenzymologie (dosage de 0.03 fM d'IgG humaines) (74). Récemment, CASTRO et MONJI (39) ont mis au point la synthèse d'un nouveau dérivé maléimidé de la thyroxine qui permet le couplage

thyroxine- β galactosidase par l'intermédiaire des groupements -SH de l'enzyme.

3) Couplage par le glutaraldéhyde

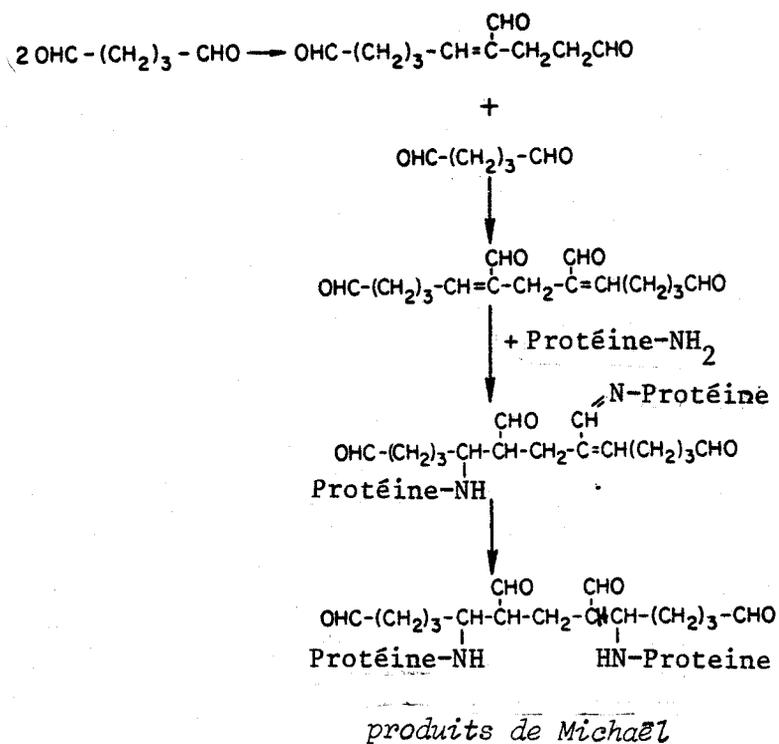
En 1969, AVRAMEAS (7) décrit le couplage d'un enzyme avec une protéine par l'intermédiaire du glutaraldéhyde. Le glutaraldéhyde réagit principalement avec les groupements aminés libres (58), particulièrement le groupement ϵ -aminé de la lysine (33) (129), par formation de bases de Schiff, encore que d'autres mécanismes aient été proposés (129) (cf. figure 11). En effet, la structure du réactif en solution peut être différente de celle d'un aldéhyde, en particulier par polymérisation. Les structures reproduites (figure 12) sont proposées.

Le protocole en 1 temps décrit par AVRAMEAS (7) consiste à mélanger l'anticorps et l'enzyme à coupler et à y ajouter le glutaraldéhyde goutte à goutte. Le conjugué obtenu après dialyse et centrifugation est conservé à + 4° C. Ce conjugué anticorps-enzyme est composé d'une population très hétérogène de complexes, mais il ne contient pas d'anticorps libres. Le rapport molaire moyen anticorps/enzyme est compris entre 1 et 2. Les activités immunologiques et enzymatiques sont intactes. Le plus souvent, les groupements aminés libres ne participent pas à l'activité catalytique de l'enzyme ni à l'activité anticorps ; leur intervention dans les réactions de pontage ne modifie donc pas l'immunoréactivité du conjugué. Les résultats obtenus avec ce conjugué sont parfaitement reproductibles (53) (153).

La technique a été améliorée en 1971 par AVRAMEAS et TERNYNCK (13). La peroxydase seule ne peut être insolubilisée, même par un excès de glutaraldéhyde (12) : cet enzyme possède peu de résidus de lysine (164) et la plupart d'entre eux présentent probablement un blocage de leur groupement ϵ -aminé (114). Quand le glutaraldéhyde est ajouté en excès à la peroxydase, un seul des deux groupements aldéhydes réagit avec l'enzyme, le dérivé obtenu prend une configuration telle que le groupement actif libre ne peut interagir avec une nouvelle molécule de peroxydase et réagit avec les groupements aminés de la protéine ajoutée par la suite. La peroxydase est dissoute dans un tampon à pH neutre et un excès de glutaraldéhyde est ajouté. La peroxydase activée réagit ensuite à pH 9,5 avec la solution d'anticorps. On obtient une population homogène de complexes dont le rapport molaire anticorps / enzyme est de 1. De plus la peroxydase est stabilisée par le traitement au glutaraldéhyde. Les études de BOORSMA et KALSBECK (31) donnent de nombreuses informations sur la nature des complexes obtenus par la méthode en 2 temps : à titre indicatif le fait d'avoir éliminer la peroxydase en excès, multiplie l'activité de ce conjugué par 10 (156).

Figure 11

MECANISME PROBABLE DE REACTION DU GLUTARALDEHYDE AVEC UNE PROTEINE,
POSTULE PAR RICHARD ET KNOWLES (129)



MECANISME PROBABLE DE REACTION DU GLUTARALDEHYDE AVEC UNE PROTEINE
PAR L'INTERMEDIAIRE D'UNE BASE DE SCHIFF

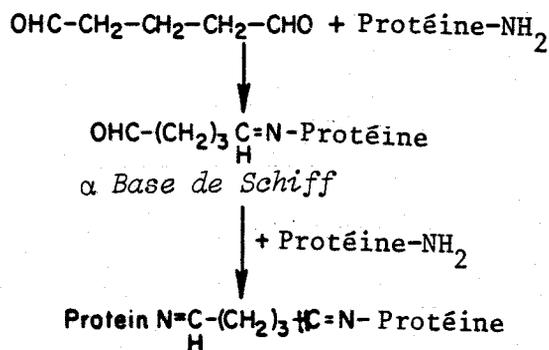
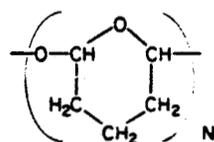
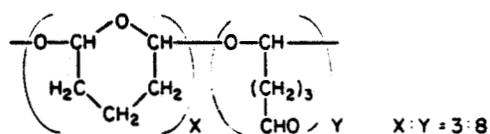
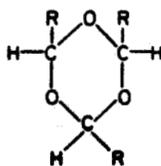
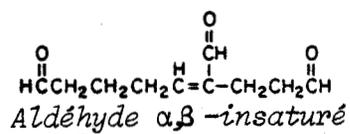


Figure 12

QUELQUES STRUCTURES POSSIBLES DU GLUTARALDEHYDE POLYMERISE



Tétrahydropyranne



Paraldéhyde



γ) Couplage par oxydation périodique

Cette méthode a été décrite par NAKANE et KAWAOI en 1974 (108). La HRP II est une glycoprotéine contenant environ 18 % de glucides (132); cette fraction glucidique n'intervient pas dans l'activité enzymatique, il est donc possible de l'oxyder par action du periodate de sodium sans perte d'activité enzymatique, particulièrement si tous les groupements α et ε aminés et hydroxyliques sont bloqués par le fluorodinitrobenzène avant oxydation, ceci pour éviter la polymérisation (138). Les fonctions aldéhydes ainsi formées réagissent avec les groupements α ou ε aminés des protéines mises en présence. Les résultats obtenus semblent satisfaisants, cependant, certains auteurs ont mis en évidence une variation sensible du pourcentage de glucides suivant les préparations de peroxydase, ce qui expliquerait les difficultés de reproductibilité (160).

δ) Méthodes récentes

Deux nouvelles méthodes ont été expérimentées en 1978. L'une conduit à la formation d'un pont disulfure inter-moléculaire entre une protéine X thiolée et une protéine Y contenant des liaisons disulfuriques réactives (87). L'autre méthode permet d'obtenir un monoconjugué anticorps-enzyme : l'enzyme (invertase) est fixé sur succinylconcanavaleine A sépharose 6 B ; les anticorps sont ensuite couplés à cet enzyme par l'intermédiaire du glutaraldéhyde. Le conjugué anticorps-enzyme est élué du gel par l'α-méthyl mannoside (120). Le recul n'est pas suffisant pour juger de l'efficacité réelle de ces deux techniques de couplage.

Le dernier mode de couplage est immunologique, il est surtout utilisé en histochimie pour laquelle il a été mis au point par STERNBERGER et al. (145). YORDE a employé ce type de conjugué dans la technique C.E.L.I.A. (173).

Il est assez délicat de séparer, après couplage, les anticorps libres résiduels des anticorps impliqués dans le conjugué ; en effet, les différences de charge et de masse moléculaire sont faibles. Différents milieux de gel-filtration ont donc été étudiés par BOORSMA et STREEFKERK (31) ; le gel de polyacrylamide agarose (ultrogel Ac A-44) est plus efficace que le séphadex G-200 mais la séparation n'est jamais complète. Un travail récent (4) décrit un procédé de purification basé sur la différence d'affinité de l'anticorps libre (2 à 3 % de glucides) et du complexe anticorps-HRP (la HRP contient 18 % de glucides) pour la concanavaleine A. Par un tel procédé, le rapport IgG non conjuguées / IgG conjuguées passe de 2 à 0.1. Il serait possible en répétant l'opération d'enrichir une préparation d'anticorps marqués à la peroxydase.

Une revue générale très complète des modes de couplages a été réalisée par VAN WEEMEN et SCHUURS (157).

C) Le substrat

Une fois l'enzyme fixé sur le système à mettre en évidence, son activité est révélée par un substrat spécifique. Celui-ci doit être peu coûteux et maniable ; il sera de préférence chromogénique mais KATO (83) utilisa, avec succès, un substrat fluorogénique.

Le para-nitro phénylphosphate est idéal avec la phosphatase alcaline. Facilement utilisable, il est très soluble ; la réaction est stoppée aisément par addition de soude et le produit jaune obtenu est parfaitement stable.

La peroxydase catalyse la réaction de dégradation de l'eau oxygénée, ce qui permet l'oxydation d'un substrat secondaire par l'oxygène natif libéré. La diaminobenzidine (DAB) et l'acide 5 aminosalicylique (5 AS) donnent des produits partiellement insolubles ; ceci n'est pas gênant en histochimie ou dans le cas de lectures non quantitatives (visuelles). Actuellement l'ortho-phénylène diamine (O.P.D.) est le substrat le plus satisfaisant avec la HRP (171), son oxydation aboutit à la formation d'un produit très soluble de couleur orange. Particulièrement employée lorsqu'une lecture spectrophotométrique est nécessaire, l'OPD présente deux inconvénients : instabilité à la lumière et propriétés mutagènes. L'orthotolidine a également donné de très bons résultats (103).

Avant la mise en oeuvre du dosage immunoenzymatique lui-même, il est nécessaire de définir les concentrations optimales des réactifs précédemment décrits ainsi que les temps et température d'incubation.

3°) Expression des résultats

Il est possible de déterminer un résultat qualitatif par simple lecture visuelle. La possibilité de détermination objective du résultat par lecture spectrophotométrique de la densité optique, ne doit pas être négligée. De nombreux appareils peuvent effectuer une mesure de densité optique sur des volumes de 300 µl ou moins.

Il y a de multiples possibilités d'expression des résultats dépendant en outre du type de technique immunoenzymatique utilisé.

1 - Positif-négatif. Tous les échantillons donnant une D.O. inférieure ou supérieure à une D.O. limite prédéterminée sont considérés comme positifs.

2 - Détermination d'un titre. Les échantillons sont étudiés à différentes dilutions. Le titre est la réciproque de la dernière dilution produisant une D.O. supérieure ou inférieure à celle des témoins négatifs.

3 - Rapport des D.O. Le rapport D.O. de l'échantillon/D.O. des témoins négatifs doit être inférieur ou supérieur à un rapport prédéterminé pour que l'échantillon soit considéré comme positif.

4 - Etablissement d'une courbe étalon. Il est toujours possible d'introduire dans l'essai une série d'échantillons de concentration connue ; la concentration des échantillons étudiés est déterminée par rapport à la courbe de référence obtenue.

4°) Avantages et inconvénients des techniques immunoenzymatiques

Le handicap des techniques immunoenzymatiques réside dans la nécessité d'une étape supplémentaire pour révéler et mesurer l'activité de l'enzyme ; ceci prolonge évidemment la durée de manipulation. Cependant cet inconvénient est minime par rapport à ceux présentés par la radioimmunologie. Nous avons rassemblé dans le tableau I les différents critères permettant de comparer ces deux méthodes.

La technique immunoenzymatique sur support solide présente de nombreux avantages sur les autres méthodes immunoenzymatiques. Toutes les manipulations s'effectuent dans le même tube, ce qui évite les pertes au cours de la réaction et facilite les opérations de lavage. Les résultats sont obtenus en moins de 24 h généralement. Il n'est pas nécessaire de purifier parfaitement l'antigène que l'on ne peut pas toujours obtenir en grandes quantités ; de même, la préparation d'anticorps par précipitation au sulfate d'ammonium et chromatographie sur DEAE cellulose est suffisante si l'antisérum est spécifique. La coloration finale est développée à partir de la phase solide, donc la plupart des facteurs d'interférences non spécifiques, comme la coloration du sérum, sont éliminés.

Les possibilités des techniques immunoenzymatiques sont nombreuses. Déjà utilisées pour le dépistage systématique de l'antigène HBs (171) ou pour le dosage d'anticorps, en particulier dans le cas des maladies parasitaires, ces techniques semblent promises à un bel avenir.

Nous avons donc entrepris, d'appliquer les possibilités de cet outil au dépistage de masse et au dosage des anticorps antitétaniques.

TABLEAU I

COMPARAISON DES TECHNIQUES RADIOIMMUNOLOGIQUES (RI)
ET IMMUNOENZYMOLOGIQUES (IE)

CRITERES	IE	RI
sensibilité	* élevée pour des substances de masse moléculaire élevée * pour des petites molécules la fixation d'un enzyme de masse moléculaire élevée peut influencer la réaction	élevée quelque soit la masse moléculaire de la substance dosée.
spécificité	dépend de la pureté des réactifs	dépend de la pureté des réactifs
reproductibilité	correcte si lecture au spectrophotomètre	correcte si l'activité mesurée est suffisante
résultats	objectifs si lecture au spectrophotomètre	objectifs
préparation de l'antigène	peut être complexe	peut être complexe
conjugué	préparation simple mais standardisation à réaliser	préparation bien standardisée
mise en oeuvre	facile mais une étape supplémentaire	difficile
automatisation	possible	possible
coût par test	faible	élevé
1/2 vie des réactifs	longue	courte
risques pour la santé du personnel	aucun	les manipulations de réactifs marqués sont peu dangereuses mais le marquage nécessite des techniques spécialisées
matériel	courant dans un laboratoire	coûteux et installations agréées



III) APPLICATION AU DOSAGE DES ANTICORPS ANTITETANIQUES (Ac AT)

Nous avons rassemblé dans le tableau II les principales caractéristiques des quelques études réalisées pour le dosage des Ac AT. Aucune ne s'adapte parfaitement au dépistage et dosage de routine des Ac AT. La sépharose 4B utilisée comme phase solide par le C.T.S. de BORDEAUX est peu pratique ; il nécessite des centrifugations du matériel après chaque lavage. Les tubes ou plaques de microtitration sont plus maniables et permettent plus facilement une semi-automatisation de la méthode. La nécessité de diluer de façon importante (en général au 1:200) les échantillons étudiés est alors un handicap pour automatiser la technique. Enfin, les délais d'obtention des résultats sont dans la plupart des cas incompatibles avec les exigences de rapidité dans un centre de transfusion.

Nous avons donc repris les deux principes utilisés : techniques indirecte et sandwich, en revoyant les principaux paramètres, dans le but de mettre au point une technique immunoenzymatique répondant aux critères suivants :

- rapidité (1 heure au maximum)
- automatisation aisée

tout en ayant la sensibilité et la précision requises.

Ceci justifie l'emploi de plaques de microtitration à fond plat comme support solide ; de plus, pour faciliter l'automatisation, nous avons cherché à utiliser les échantillons étudiés purs ou à une dilution très peu importante.

Dans ces conditions, nous avons été amenés à trouver un mode de fixation de l'antigène sur la phase solide ayant un meilleur rendement que celui des techniques classiquement employées.

TABLEAU II

CARACTERISTIQUES COMPAREES DES TECHNIQUES EMPLOYEES POUR LE
DOSAGE DES ANTICORPS ANTITETANIQUE

ANNEE	Réf.	AUTEURS	PRINCIPE	PHASE SOLIDE	CONJUGUE	DILUTION DE L'ECH.	TEMPS D'OBTENTION DU RESULTAT
1976	(159)	VOLLER	Technique indirecte	plaques de micro-titration	IgG mouton anti IgG humaines-phosphatase alcaline	1:200	24 h ou 4 h 30
1977	(161)	VOLLER					
1976	(71)	HABERMANN	Technique sandwich compétitive	tubes plastiques	toxine-HRP	non ind. gamme étalon entre 0.2 et 0.0063 UI/ml	3 h 3 - 4 h
1977	(147)	STIFFLER & ROSENBERG	Technique indirecte	tubes plastiques	IgG mouton anti IgG humaines-phosphatase alcaline	1:200 1:1000 1:5000	48 h
1977	(135)	C.T.S. BORDEAUX	Technique sandwich	sépharose 4B anatoxine	toxine-HRP	1:20	24 h
1979	(162)	VOS et al.	Technique indirecte	plaques de micro-titration	IgG mouton anti IgG ou IgM de rat - peroxydase de raifort	dilutions de raison 2	3 - 4 h



TRAVAUX PERSONNELS

MATERIEL ET METHODES

*** TECHNIQUES IMMUNOENZYMATIQUES RÉALISÉES**

1°) Leurs principes (fig 13)

L'anatoxine tétanique est adsorbée sur un support solide en polystyrène. L'échantillon étudié est déposé dans la cupule "sensibilisée" et les anticorps antitétaniques (Ac AT) se fixent sur l'anatoxine. Ceux-ci sont ensuite mis en évidence à l'aide d'un conjugué :

- soit IgG de mouton anti-IgG humaines couplées à la peroxydase de raifort (Ac - E) pour la technique indirecte.

- soit anatoxine tétanique - peroxydase de raifort (An - E) pour la technique sandwich.

Ce conjugué vient se fixer sur le complexe antigène-anticorps déjà formé, par l'intermédiaire du fragment F_c des IgG ou du deuxième site spécifique des Ac AT selon la technique envisagée.

L'enzyme, ainsi fixé sur la phase solide, est ensuite révélé par addition du substrat chromogène spécifique dont la transformation fournit un produit chromophore. L'intensité de la coloration est proportionnelle au taux d'Ac AT contenus dans l'échantillon.

2°) La méthodologie (35,54)

La détermination des conditions optimales d'adsorption de l'anatoxine tétanique fait l'objet d'une partie de ce travail. En règle générale, une solution d'anatoxine est déposée puis laissée en contact avec les godets d'une plaque de microtitration (M 129B); en fin d'incubation, les plaques sont lavées et utilisées immédiatement ou stockées à + 4° C.

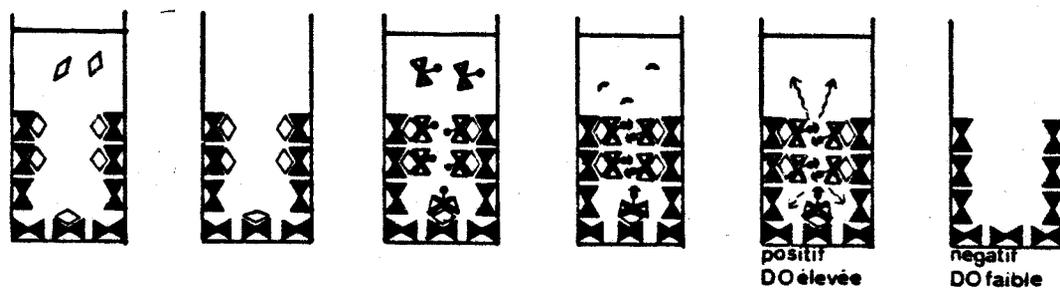
Les incubations ultérieures de l'échantillon à doser puis du conjugué sont effectuées à 37° C en prenant soin de recouvrir les plaques pour éviter une évaporation excessive; toutes les dilutions sont réalisées en tampon PBS-Tween pH 7,4 et étudiées en double sur un aliquot de 100 μ l. Un témoin tampon est incorporé de la même façon sur chaque plaque. L'étalon de référence est de même nature que les échantillons étudiés (immunoglobulines, sérums ou plasmas).

Les cupules "sensibilisées" sont lavées, avant utilisation ainsi qu'après les diverses incubations, 3 fois par 0,3 ml de tampon PBS-Tween pH 7,4 préparé comme suit :

solution A : NaH_2PO_4	0,01 M
NaCl	0,15 M

Figure 13

Principe



- ⌘ Anatoxine tétanique
- ◇ Anticorps antitétaniques
- ⌘ Anti IgG - Peroxydase
ou anatoxine - peroxydase
- ∧ Substrat
- ~~~~~ Coloration

solution B : Na_2HPO_4 0,01 M
NaCl 0,15 M

Le pH est ajusté à 7,4 en mélangeant A et B. Le Tween 20 est ensuite ajouté à une concentration finale de 0,05 % (v/v) ; tous les produits sont de qualité RP NORMAPUR (PROLABO).

La révélation enzymatique se fait par addition de la solution de substrat dont la composition (171) est la suivante :

4 mg d'orthophénylène diamine (MERCK) pour 10 ml
2 μl d' H_2O_2 à 30 volumes

de tampon phosphate-citrate à pH 5 obtenu par mélange de 98,6 volumes d'acide citrique 0,1 M et 101,4 volumes de phosphate disodique 0,2 M (99). Cette solution doit être préparée extemporanément ; la réaction a lieu à température ambiante, en évitant l'exposition à une lumière trop intense. Après 2 minutes de contact, l'action de l'enzyme est stoppée par adjonction d'acide sulfurique 4N.

La densité optique (D.O.) du contenu des cupules est mesurée à 492 nm sur un spectrophotomètre PERKIN-ELMER 550 équipé d'une microcuve à circulation. Le zéro de l'appareil est réglé sur un témoin blanc constitué par la solution de substrat et d'acide sulfurique dans des proportions identiques à celles utilisées dans la réaction.

Les courbes D.O. = f (Ac AT) sont établies après avoir soustrait la D.O. moyenne du témoin tampon de celle obtenue pour les échantillons.

Différents paramètres : temps d'incubation, dilution des échantillons, dilutions de travail des conjugués font l'objet d'une étude ultérieure.

* PRÉPARATION DES RÉACTIFS

1) ADSORPTION DE L'ANATOXINE TETANIQUE SUR LE SUPPORT SOLIDE

1°) Comparaison de l'adsorption de l'anatoxine tétanique sur le support plastique par séchage (89) et par contact (42,159,161)

L'étape d'adsorption de l'anatoxine a été étudiée isolément pour éviter qu'un paramètre, intervenant dans le déroulement ultérieur de la technique immunoenzymologique, soit mal choisi et qu'il ne soit donc pas possible de juger de l'efficacité réelle du procédé d'adsorption.

Grâce à un traceur radioactif, nous allons comparer la technique de fixation classique qui se fait par simple contact à pH 9,6 (42) et une méthode préconisant le séchage des protéines à pH 7,4 (89).

A) Principe

Soit une substance A marquée à l'iode I¹²⁵ ; son activité spécifique S peut s'exprimer comme :

$$S = \frac{r_o}{m_o} \quad \text{où} \quad \begin{array}{l} r_o = \text{radioactivité} \\ m_o = \text{masse de A} \end{array}$$

Si l'on mélange une quantité très faible m_o de A marquée à une quantité très importante de substance A froide, on obtient l'équation suivante :

$$s = \frac{r_o}{M + m_o} \quad \text{où} \quad \begin{array}{l} s = \text{activité spécifique du mélange} \\ \text{inférieure à S} \\ M = \text{masse de A froide} \end{array}$$

m_o étant très petit par rapport à M, on peut écrire :

$$s = \frac{r_o}{M}$$

Après adsorption de ce mélange sur un support solide, l'activité spécifique s fixée sur la phase solide, est égale à : $s = \frac{r'_o}{M'}$

$$\text{On peut donc en déduire : } \frac{r_o}{M} = \frac{r'_o}{M'}$$

$$\text{donc } M' = \frac{r'_o}{r_o} \times M$$

Connaissant la radioactivité r_o et la masse M déposées, il est possible de déterminer M' , masse de A fixée par mesure de la radioactivité r'_o fixée.

Nous avons appliqué ce principe de la manière suivante : une quantité constante, très faible, d'anatoxine tétanique marquée à l'iode I¹²⁵ est ajoutée à des dilutions de raison 2 d'anatoxine froide ; on peut considérer que les molécules d'anatoxine marquées par le radioisotope se comportent comme l'ensemble des molécules présentes. La radioactivité déposée au début de l'expérimentation est déterminée par comptage et les taux de protéines froides introduites sont

établis par dosage selon la méthode de LOWRY (93) avec le réactif de FOLIN-CIOCALTEU (MERCK). Après adsorption de l'anatoxine et lavages, la radio-activité fixée sur le plastique est mesurée. Le pourcentage d'adsorption de l'anatoxine est calculé comme suit :

$$\% \text{ d'adsorption} = \frac{\overline{\text{cpm mesurés}} - \overline{\text{BF}}}{\overline{\text{cpm déposés}} - \overline{\text{BF}}} \times 100$$

où cpm : coups par minute

$\overline{\text{cpm mesurés}}$: moyenne des cpm après adsorption et lavages

$\overline{\text{cpm déposés}}$: moyenne des cpm après le dépôt

$\overline{\text{BF}}$: moyenne des bruits de fond de l'appareil

Le taux de protéines fixé est déduit de ce pourcentage d'adsorption.

B) Protocole

Pour permettre les comptages, nous avons dû employer des cupules individuelles (M 179, DYNATECH) de même composition chimique que les plaques M 129 B.

Des dilutions, de raison 2, d'anatoxine tétanique sont réalisées en tampon PBS pH 7,4 ou en tampon carbonate - bicarbonate pH 9,6 (Na_2CO_3 0,015 M, NaHCO_3 0,035 M, NaN_3 0,2 % (p/v)) (161). Une quantité constante (30 μl) de traceur constitué par de l'anatoxine marquée (1 $\mu\text{Ci/ml}$, 40 $\mu\text{g/ml}$; C.N.T.S.), correspondant à 3000 cpm environ, est mélangée avec 1,47 ml de chacune des dilutions. Pour chaque tampon et dilution d'anatoxine, 10 cupules sont sensibilisées par 100 μl de solution. Les incubations sont de une nuit à 37° C pour les dilutions en tampon PBS et de 3 heures en chambre humide (161) pour celles effectuées en tampon carbonate-bicarbonate. Les cupules sont ensuite lavées.

Les comptages sont réalisés, après le dépôt des différentes solutions d'anatoxine et après chaque lavage, pendant une minute sur un compteur de rayonnements gamma NE 1600 (NUCLEAR-ENTREPRISES).

2°) Etude de l'adsorption par séchage à pH 7,4

Nous avons choisi, comme support, la plaque de microtitration en polystyrène à fond plat (M 129 B ; DYNATECH) car elle est commode d'emploi et se prête aisément à l'automatisation.

En fonction des résultats obtenus, nous avons opté pour le procédé d'adsorption par séchage. Nous allons en étudier différents paramètres : concentration de l'anatoxine, temps d'incubation et adjuvants de fixation.

A) Principe

Les plaques sont mises en contact avec une solution d'anatoxine tétanique dans différentes conditions d'incubation : durée, traitement préalable des plaques par l'acide chlorhydrique, fixation de l'antigène adsorbé par le glutaraldéhyde ou l'éthanol. Ces supports sensibilisés sont ensuite utilisés, dans les mêmes conditions opératoires. Les courbes de densité optique obtenues en fin de réaction immunoenzymatique, selon le protocole décrit plus haut, sont comparées.

B) Etude des différents paramètres

a) temps d'incubation, fixation par le glutaraldéhyde, concentration d'antigène

Les incubations ont été réalisées dans les conditions suivantes :

Ⓐ une nuit à 37° C ce qui entraîne le séchage complet de la solution (90).

Ⓑ une nuit à 37° C (90) puis fixation pendant 1 heure à la même température avec 50 µl d'une solution de glutaraldéhyde (MERCK) à 0,03 % en tampon PBS (139)

Ⓒ trois heures à 37° C (32).

L'anatoxine semi purifiée à 1000 Lf/ml (Institut Pasteur) est diluée au 1:4 ou au 1:32 (soit 973 et 122 µg de protéines/ml) dans les cas Ⓐ et Ⓑ, uniquement au 1:4 pour Ⓒ en tampon PBS pH 7,4. Ces solutions sont réparties à raison de 50 µl dans chaque cupule.

Ces supports "sensibilisés" sont utilisés, dans les conditions opératoires suivantes :

- gamme d'Ac AT obtenue par dilution de raison 2 d'une immunoglobuline antitétanique ; incubation de 2 heures.
- conjugué Ac - E (IgG de mouton anti IgG humaines - peroxydase ; Institut Pasteur) dilué au 1:100 ; incubation d'une heure.
- révélation enzymatique: 100 µl de substrat puis 200 µl d'H₂SO₄ 4N.

b) adjuvants de fixation

Nous avons comparé les résultats obtenus pour les trois procédés d'adsorption suivants :

- Ⓐ voir p 61.
- Ⓓ une nuit à 37° C puis fixation des protéines adsorbées pendant 10 minutes à température ambiante, avec 0,1 ml d'éthanol absolu (R.P. NORMAPUR, PROLABO) par cupule (139) ; les plaques sont ensuite lavées et séchées sous flux d'air.
- Ⓔ Les cupules sont préalablement traitées par 100 µl d'HCl (R.P. NORMAPUR, PROLABO) pendant 30 minutes à température de la pièce dans le but de faire apparaître sur le plastique de nouveaux sites de fixation (139) ; après 3 lavages, l'anatoxine est déposée et séchée une nuit à 37° C.

Dans tous les cas, l'anatoxine diluée au 1:8 (soit 486 µg de protéines/ml) est répartie à raison de 100 µl par cupule.

La comparaison a été effectuée dans les conditions décrites ci-dessous :

- gamme réalisée par dilution de raison 2 d'un sérum titré chez la souris ; incubation d'une heure.
- conjugué Ac - E dilué au 1:100 ; incubation d'1 heure
- révélation enzymatique: 200 µl de substrat puis 150 µl d'H₂SO₄ 4N.

II) COUPLAGE DE L'ANATOXINE TETANIQUE AVEC LA PEROXYDASE DE RAIFORT

1°) Principe

Nous avons appliqué la technique en 2 temps d'AVRAMEAS et TERNYNCK (13) dont le principe a déjà été exposé dans le chapitre "immunoenzymologie".

La peroxydase de raifort est mise en contact avec une solution de glutaraldéhyde à pH 6,8. L'excès de glutaraldéhyde est éliminé et l'enzyme "activé" est mélangé avec la solution de protéines à pH basique. Il s'établit donc un pontage entre les groupements amines de l'enzyme et des protéines par l'intermédiaire du glutaraldéhyde. Les groupements aldéhydiques résiduels libres sont bloqués par addition de lysine. La préparation est ensuite conservée à + 4° C.

2°) Protocole (figure 14)

20 mg de peroxydase de raifort (EC 1.11.1.7. ; Grade I, RZ 3, BOEHRINGER) sont dissous dans 0,4 ml d'une solution de glutaraldéhyde (MERCK) à 1 % en tampon phosphate de potassium 0,1 M pH 6,8. Après incubation, 18 heures à température ambiante, la solution est dialysée plusieurs fois contre 500 ml d'eau physiologique (NaCl 9 ‰ (p/v)). A l'enzyme ainsi "activé", sont ensuite ajoutés 4,5 ml d'anatoxine tétanique (soit 25 mg de protéines), préalablement dialysée contre de l'eau physiologique, et 1,3 ml de tampon carbonate - bicarbonate pH 9,5 ; le mélange est laissé 24 heures à + 4° C. 0,5 ml d'une solution de lysine 0,2 M (MERCK) sont ajoutés et l'ensemble est à nouveau incubé, pendant 2 heures, à + 4° C. La solution est ensuite dialysée plusieurs fois contre 2 l de tampon PBS à pH 7,4.

Il est nécessaire de laisser la solution de conjugué se stabiliser une semaine à + 4° C avant utilisation.

<p>✕ ETUDE DE DIFFÉRENTS PARAMÈTRES INTERVENANT DANS LA RÉACTION IMMUNOENZYMATIQUE</p>
--

Les conditions optimales pour chaque paramètre sont déterminées par l'établissement d'une courbe $DO = f((Ac AT))$ après étude d'une gamme de concentration d'Ac AT. Seront gardés constants, les deux paramètres suivants :

- l'adsorption de l'anatoxine, réalisée par séchage à 37°C
- la révélation enzymatique, effectuée avec 200 µl de substrat et l'arrêt de la réaction par 150 µl d' H_2SO_4 4N.

Pour la technique sandwich, l'étude de certains paramètres a été écourtée à la vue des résultats obtenus pour la technique indirecte.

figure 14

PREPARATION DU CONJUGUÉ
ANATOXINE TETANIQUE-PEROXYDASE DE RAIFORT

20 mg de peroxydase dans 0,4 ml de tampon phosphate 0,1 M

pH 6,8 contenant 1 % de glutaraldéhyde

18 h à t° laboratoire

dialyse contre NaCl 0,15 M

Péroxydase "activée"

+ 4,5 ml d'anatoxine tétanique semi-purifiée (1000 Lf/ml)

dialysée contre NaCl 0,15 M

+ 1,3 ml de tampon carbonate-bicarbonate 0,5 M pH 9,5

24 h à + 4° C

+ 0,5 ml de lysine 0,2 M

2 h à + 4° C

Conjugué anatoxine-enzyme
dialysé contre PBS pH 7,4 à + 4° C

1°) Etude des temps d'incubation

A) Technique immunoenzymatique indirecte

a) influence du temps d'incubation du conjugué

Nous avons comparé les résultats obtenus avec les temps d'incubation suivants :

échantillon	2 h	2 h
conjugué	2 h	1 h

pour les conditions opératoires :

- adsorption de l'anatoxine diluée au 1:8* (486 µg de protéines/ml).
- conjugué Ac - E dilué au 1:100

b) Etude de différents couples de temps d'incubation

L'amélioration des résultats obtenue en 3 heures d'incubation nous a conduit à étudier des temps d'incubation moindres : 3 h, 2 h, 1 h, 1/2 h.

Différents couples de temps ont été choisis pour cette étude :

échantillon	2 h	1 h	1/2 h	1/4 h
conjugué	1 h	1 h	1/2 h	1/4 h

L'anatoxine est diluée au 1:32* (soit 175 µg de protéines/ml)

B) Technique sandwich

Nous avons étudié les couples de temps ci-dessous

échantillon	1 h	1/2 h	1/4 h
conjugué	1 h	1/2 h	1/4 h

Dans les mêmes conditions opératoires que précédemment ; nous utiliserons ici le conjugué anatoxine - enzyme (An - E), préparé au laboratoire, à la dilution 1:50 .

* les lots d'anatoxine employés sont différents

2°) Détermination de la dilution de travail des conjugués

A) Technique indirecte

Les temps d'incubation adoptés sont de 1/4 d'heure.

Le conjugué Ac - E est étudié aux dilutions suivantes :

1:100, 1:300, 1:500, 1:1000.

B) Technique sandwich

Les dilutions suivantes 1:25, 1:50, 1:100, 1:200 du conjugué An - E, que nous avons préparé, sont étudiées avec des temps d'incubation de 1/2 heure.

3°) Etude simultanée de 2 paramètres : concentration de l'anatoxine tétanique adsorbée sur le support plastique, dilution de travail des échantillons

A) Principe

Nous avons cherché à déterminer ici les conditions optimales de concentration d'anatoxine adsorbée et de dilution des échantillons étudiées.

Dans ce but, nous avons employé la technique du "damier" qui consiste à étudier un sérum à différentes dilutions pour chaque concentration d'antigène. Ainsi, le couple concentration d'anatoxine - dilution des sérums produisant, en fin de la réaction immunoenzymatique, le plus grand écart de D.O. entre 2 sérums de référence (titrant 15 et 5 UI/ml chez la souris) a été choisi pour le dépistage de masse des anticorps antitétaniques.

B) Technique indirecte

L'anatoxine tétanique, utilisée pour l'adsorption sur les plaques, a été préparée par dilution successive de 2 en 2 du 1:4 au 1:128. Les sérums sont étudiés purs ainsi qu'aux dilutions 1:5, 1:10, 1:15, 1:20 et 1:50. Le conjugué Ac - E est dilué au 1:300.

C) Technique sandwich

Pour des dilutions d'anatoxine identiques à celles employées dans le paragraphe précédent, les sérums ont été utilisés purs et aux dilutions 1:2, 1:5, 1:10, 1:50. Le conjugué est dilué au 1:50.

4°) Influence de la concentration du substrat

Une gamme d'Ac AT préparée par dilution du sérum étalon à 15 UI/ml est étudiée selon la technique sandwich dans les conditions déjà indiquées. La réaction enzymatique est réalisée avec deux solutions de substrat :

S_1 = substrat préparé comme suit :
2 μ l d' H_2O_2 à 30 volumes } dans 10 ml de tampon phosphate-citrate
4 mg d'orthophénylène diamine } à pH

S_2 = 0,4 ml d' H_2O_2 à 30 volumes } dans 10 ml de ce même tampon
8 mg d'orthophénylène diamine } (C.T.S. Bordeaux)

à raison de 200 μ l par cupule. La réaction est stoppée par addition de 150 μ l d' H_2SO_4 4N après 4 minutes de réaction au lieu de 2.

*** DÉPISTAGE ET DOSAGE DES ANTICORPS ANTITÉTANQUES**

1°) Protocole

Les études décrites jusqu'ici nous ont permis de déterminer les conditions optimales de réaction et d'établir un mode opératoire pour le dépistage et le dosage des anticorps antitétaniques dans les sérums et plasmas. Celui-ci est schématisé dans le tableau III; pour une même dilution d'anatoxine adsorbée, les échantillons sont dilués au 1:10 et le conjugué Ac - E au 1:300, dans la technique indirecte, alors que les sérums ou plasmas sont étudiés purs avec le conjugué An - E dilué au 1:50, dans la technique sandwich.

A chaque changement de lot d'anatoxine ou de conjugué, il est indispensable de revoir les conditions optimales d'utilisation.

TABLEAU III

PROTOCOLES DES DEPISTAGE ET DOSAGE DES
AC AT PAR METHODES IMMUNOENZYMATIQUES

	Technique indirecte	Technique sandwich
adsorption de l'anatoxine	Anatoxine diluée au 1:32 (175 µg de protéines/ml) séchée une nuit à 37° C	
incubation avec les échantillons	. temps 1/4 heure . échantillon 10 µl plus 90 µl de tampon par cupule	. temps 1/2 heure . échantillon pur
incubation avec le conjugué	. temps 1/4 heure . dilution du conjugué 1:300	. temps 1/2 heure . dilution 1:50
révélation enzymatique	200 µl de substrat 2 minutes puis 150 µl d'H ₂ SO ₄ 4N	



2°) Dépistage et dosage des anticorps antitétaniques

Nous avons effectué la recherche des anticorps antitétaniques par la technique immunoenzymatique sandwich, sur 1100 sérums provenant de donneurs de sang dans le cadre du dépistage systématique de ces anticorps et sur 80 mélanges de plasmas provenant de sujets déjà sélectionnés ayant fait l'objet de prélèvements standards ou en plasmaphèreses ; 361 sérums ont été étudiés par la technique immunoenzymatique indirecte.

Parallèlement, la technique d'électroimmunodiffusion (E.I.D), dérivée de celle décrite par ENTWISTLE et ELRIDGE (55), utilisée habituellement au laboratoire (voir p. 20) a été réalisée sur ces mêmes échantillons.

Le taux des anticorps antitétaniques a été déterminé par rapport à des étalons de référence de même nature que les échantillons à doser : un sérum titré en électroimmuno-diffusion et contrôlé par la technique de neutralisation de la toxine chez la souris* à 15 UI/ml et un plasma titré à 20 UI/ml en E.I.D. Celui-ci nous a permis d'éviter une sous-estimation du titre des plasmas du fait de leur dilution par l'anticoagulant.

Les échantillons pour lesquels une discordance de résultat a été observée ont été étudiés une deuxième fois par les 2 techniques, cette seconde détermination a été seule prise en compte.

3°) Reproductibilité

Nous avons introduit à plusieurs reprises, dans un même essai et dans des essais différents, le même échantillon. Les coefficients de variation (C.V) intra et inter-essai ont été calculés en utilisant la formule suivante :

$$CV = \frac{\overline{M}}{\sigma} \times 100$$

où C.V. = coefficient de variaton

\overline{M} = moyenne des valeurs obtenues

σ = écart type

* à l'Institut Pasteur de GARCHES.

RESULTATS

I) ETUDE DE L'ADSORPTION DE L'ANATOXINE TETANIQUE SUR LE SUPPORT SOLIDE

1° Comparaison de l'adsorption de l'anatoxine tétanique sur support plastique par séchage et par contact

Les résultats de cette étude sont rassemblés dans le tableau IV: les pourcentages d'adsorption obtenus à pH 7,4 par séchage sont très supérieurs à ceux déterminés avec le système classique à pH 9,6.

Des conclusions analogues à celles de HERRMANN et COLLINS (76) et PESCE et al. (118), concernant l'adsorption des protéines, peuvent être tirées de cette étude : le rendement de fixation est fonction de la concentration de protéines déposées sur le support. Cependant PESCE (118) fixe au maximum 5 µg de protéine (albumine de rat ou IgG de lapin) ; le procédé de séchage complet à pH 7,4 permet d'adsorber des quantités importantes d'anatoxine tétanique. On peut penser que ce processus d'adsorption est applicable à toute protéine dans la mesure de sa résistance thermique à 37°C.

Le tableau V montre le pourcentage de radioactivité totale éliminée à chaque lavage : très élevé au premier lavage, il diminue progressivement à chaque étape. A partir du quatrième lavage, il n'y a plus de radioactivité éliminée.

On peut considérer ces résultats comme similaires à ceux qui auraient été obtenus sur des plaques M 129 B, la composition chimique et les traitements subis étant identiques.

2° Adsorption par séchage à pH 7,4

Les résultats obtenus sont rassemblés dans la figure 15.

A) Influence du temps d'incubation et de la fixation par le glutaraldéhyde

Rappelons que trois procédés d'adsorption ont été expérimentés :

- Ⓐ une nuit à 37° C ce qui entraîne le séchage complet de la solution de protéines sur le godet en plastique.
- Ⓑ une nuit à 37° C puis fixation par le glutaraldéhyde
- Ⓒ trois heures à 37° C

TABLEAU IV

TAUX D'ADSORPTION DE L'ANATOXINE TETANIQUE
APRES 3 LAVAGES PAR SECHAGE ET PAR CONTACT

ANATOXINE		PBS pH 7,4 une nuit à 37° C (séchage)		CARBONATE pH 9,6 3 heures en chambre humide (contact)	
dilution	taux de protéines (en µg/ml) déposé	pourcentage de fixation	µg protéines fixées par cupule	pourcentage de fixation	µg protéines fixées par cupule
1:4	135	47,87	60,82	0,09	0,11
1:8	66	44,19	27,45	0,11	0,07
1:16	34	36,43	11,66	0,18	0,06
1:32	17,4	23,76	3,89	0,14	0,023
1:64	9,9	18,99	1,77	0,31	0,02
1:128	3,5	14,96	0,49	0,41	0,01



TABLEAU V

POURCENTAGE DE RADIO-ACTIVITE ELIMINEE A CHAQUE LAVAGE

ANATOXINE	TAMPON PBS pH 7,4			TAMPON CARBONATE pH 9,6		
	1° lavage	2° lavage	3° lavage	1° lavage	2° lavage	3° lavage
1:4	18,06	26,53	7,54	99,59	0,31	0,01
1:8	35,24	17,09	3,48	99,51	0,23	0,15
1:16	47,52	13,64	2,41	99,15	≈ B F	≈ B F
1:32	61,41	13,10	1,73	98,95	0,82	0,09
1:64	66,21	10,37	4,43	98,48	1,29	≈ B F
1:128	71,01	10,84	3,19	98,16	1,15	0,28



La figure 15 confirme le fait, déjà établi, que la fixation des protéines sur le plastique est proportionnelle au temps d'incubation. La courbe (C) montre qu'il existe une relation directe entre le taux d'Ac AT et l'intensité de la coloration obtenue en fin de réaction, cependant la pente de la courbe est trop faible pour permettre une détermination précise, avec une bonne sensibilité, de ce taux. Nous avons donc, d'emblée, éliminé ce processus d'adsorption, bien que la limite de détection soit atteinte à 4,5 UI/ml.

Avec les procédés (A) et (B), la proportionalité entre taux d'Ac AT et densité optique existe jusqu'à 90 et 45 UI/ml respectivement. Il est possible de mesurer des variations de 0,7 UI/ml sur la courbe A et de 1,3 UI/ml sur la courbe B pour une variation de D.O de 0,02.

Plusieurs causes, éventuellement simultanées, peuvent être à l'origine des effets de zone observés au-delà de 90 et 45 UI/ml :

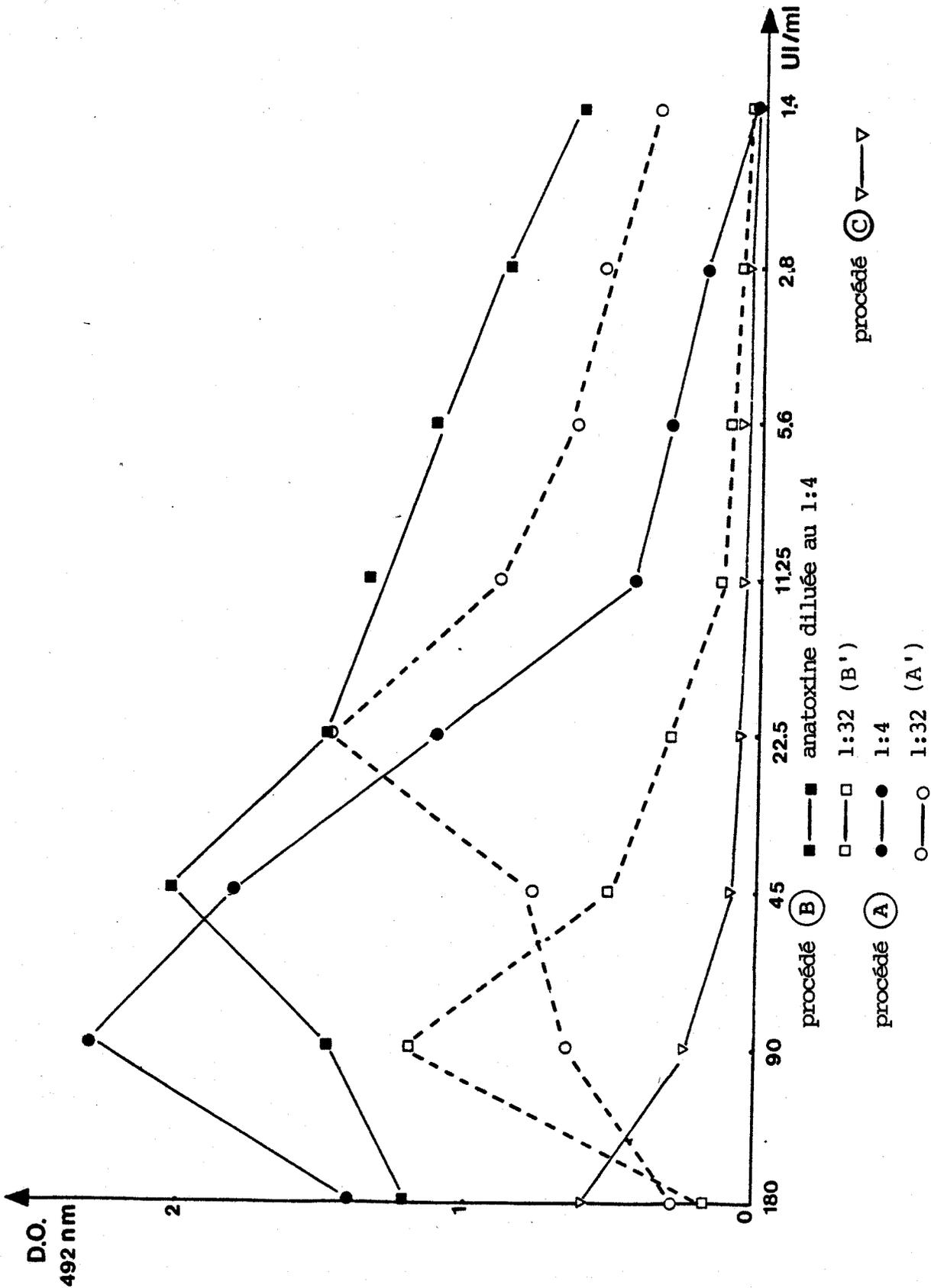
- La réaction immunoenzymatique comporte deux étapes mettant en jeu une réaction antigène-anticorps ; celle-ci est régie par des mécanismes complexes impliquant l'affinité des anticorps ainsi que les concentrations relatives des 2 molécules. Dans le cas présent, l'effet de zone observé peut être dû à un excès d'Ac AT par rapport aux sites antigéniques disponibles sur le support créant une saturation de la phase solide voire même une dissociation du complexe Ag-Ac, ou à un excès d'antiglobuline couplée à l'enzyme, ce qui entraîne alors une dissociation des immuns complexes formés.
- La révélation de l'enzyme fixé est affectée par un facteur limitant soit que la concentration de substrat fourni à l'enzyme est insuffisante, ce qui induit l'apparition d'un plateau de densité optique, soit que le produit de transformation du substrat inhibe l'enzyme à forte concentration.
- La possibilité d'inhibition stérique, à chaque étape de la technique, ne doit pas être écartée.

Nous chercherons donc, au cours des essais de mise au point des deux variantes immunoenzymatiques, à atténuer les effets de ces divers facteurs.

B) Influence de la concentration d'anatoxine

Nous avons réuni dans la figure 15 les résultats obtenus après adsorption d'anatoxine tétanique par les procédés (A) et (B) aux dilutions

ETUDE DE L'ADSORPTION A PH 7,4 INFLUENCE DU TEMPS D'INCUBATION, DE LA CONCENTRATION D'ANATOXINE



1:4 (A et B) et 1:32 (A' et B'). Dans le cas où l'adsorption est suivie d'une fixation par le glutaraldéhyde (B et B'), la figure confirme l'existence d'une relation directe entre quantité d'anatoxine adsorbée et quantité d'Ac AT fixée sur celle-ci puisque la baisse de concentration d'anatoxine s'accompagne d'une diminution des valeurs de D.O. Le déplacement de l'effet de zone vers les fortes concentrations d'Ac AT, quand la quantité d'antigène déposée diminue, implique que la concentration du conjugué est insuffisante.

A l'inverse, c'est la saturation de la phase solide par les anticorps AT en excès qui est à l'origine de l'effet de zone, dans les cas A et A', puisque celui-ci se déplace vers les faibles concentrations d'Ac parallèlement à la diminution de concentration d'anatoxine. Un autre facteur est mis en cause: une fois le point d'équivalence de concentration anatoxine adsorbée-anticorps antitétanique atteint, ici à 22,5 UI/ml pour A', les D.O. mesurées sont supérieures à celles obtenues avec une plus forte quantité d'anatoxine déposée; il semble logique d'invoquer ici l'inhibition stérique.

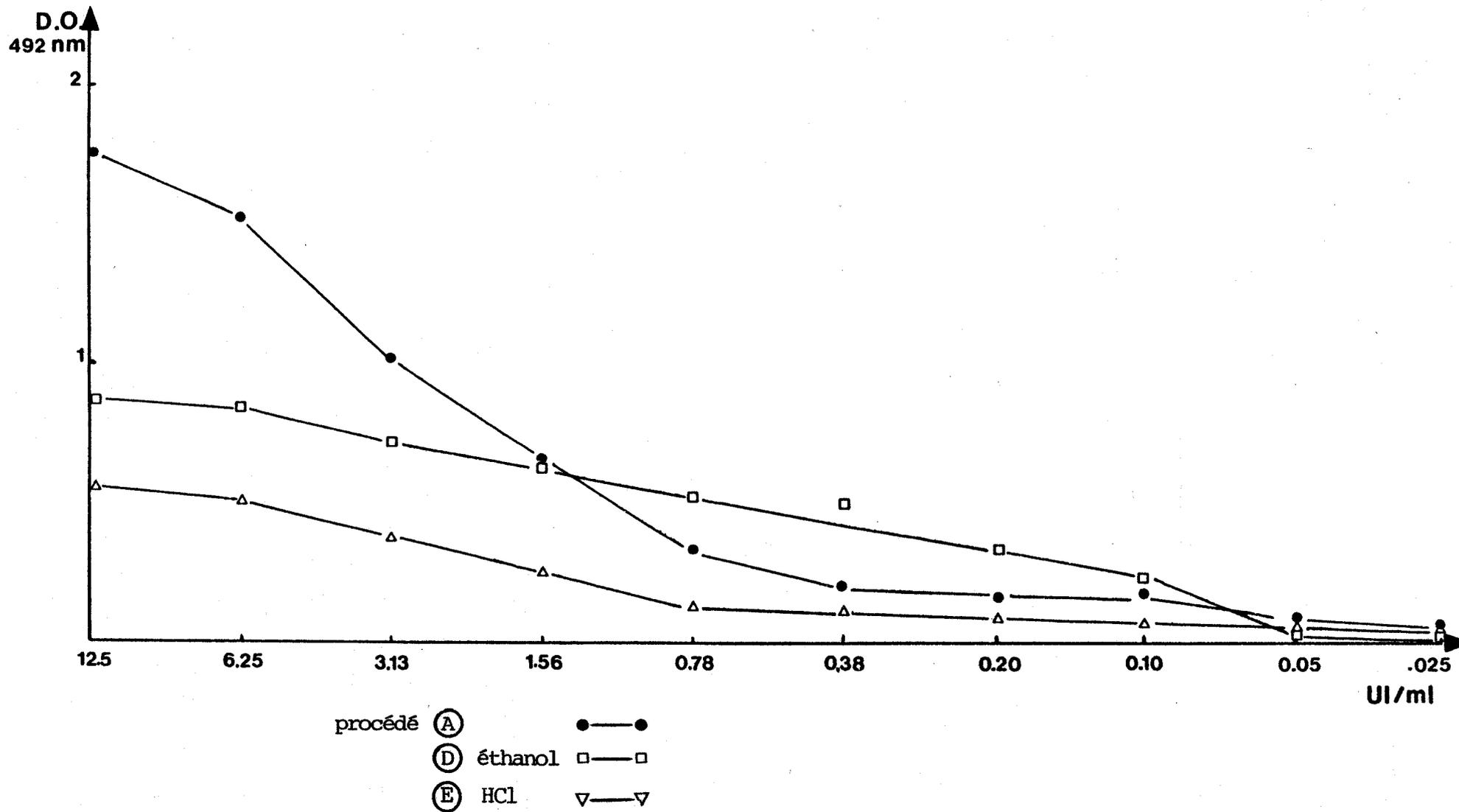
La légère amélioration de sensibilité (résultats non montrés) apportée par l'utilisation de 100 µl d'anatoxine diluée au 1:8 au lieu de 50 µl au 1:4 confirme le rôle des inhibitions par encombrement stérique. Le fait d'augmenter le volume du dépôt entraîne l'augmentation de la surface "sensibilisée"; le contact entre l'antigène adsorbé et les anticorps contenus dans les échantillons est donc facilité et le risque d'inhibition stérique diminué.

C) Essais d'amélioration de l'adsorption de l'anatoxine

Le traitement du support plastique par l'HCl (E) et la fixation des protéines par l'éthanol (D) n'améliorent apparemment pas l'adsorption de l'anatoxine tétanique sur le polystyrène. Dans les deux cas, un plafonnement des D.O. mesurées, est observé. Les pentes des courbes $DO = f(Ac AT)$ sont très inférieures à celle obtenue après adsorption par séchage à 37° C (A) (fig 16); deux éléments interviennent dans ces résultats. D'une part, la D.O. mesurée pour le témoin tampon est considérablement augmentée dans les deux cas, montrant ainsi l'existence d'un important phénomène d'adsorption non spécifique. Si le conjugué est fixé non spécifiquement sur le plastique, il semble évident que toutes les protéines sériques préalablement déposées ont également été adsorbées; dans le cas de la technique indirecte utilisée

Figure 16

ESSAIS D'AMELIORATION DE L'ADSORPTION DE L'ANATOXINE TETANIQUE



dans cette étude, toutes les IgG fixées spécifiquement ou non sont révélées. D'autre part, ces traitements font subir à l'anatoxine tétanique des modifications ou dénaturations telles que sa capacité de réaction avec les anticorps spécifiques est diminuée. Nous avons donc abandonné les procédés d'adsorption (D) et (E).

3° Conclusion

Le procédé d'adsorption de l'anatoxine tétanique par séchage à 37° C nous paraît le plus indiqué pour une technique de dépistage des anticorps antitétaniques. La fixation ultérieure des protéines adsorbées par le glutaraldéhyde n'apportant pas d'amélioration nette et cette étape supplémentaire allongeant le temps de mise en oeuvre de la technique, nous ne l'emploierons donc pas.

Dans la suite de notre étude, les conditions d'adsorption de l'anatoxine tétanique ont été définies, à partir des résultats précédents, comme suit :

L'anatoxine semi-purifiée à 1000 Lf/ml est diluée en tampon PBS à pH 7,4 et répartie à raison de 100 µl par cupule. Après séchage complet, une nuit à 37° C, la plaque est lavée 3 fois par 0,3 ml de tampon PBS-Tween. Les produits de lavages sont récupérés et concentrés dans une cellule AMICON 402 sur membrane DIAFLO PM 10 et utilisés à nouveau.

II) ETUDE DES DIFFERENTS PARAMETRES

1°) Temps d'incubation

A) Technique immunoenzymatique indirecte

a) influence du temps d'incubation du conjugué

La figure 17 a été établie à partir des valeurs obtenues dans les conditions décrites p65. Le temps de contact des échantillons étudiés avec la phase solide a été de 2 heures, seul le temps d'incubation avec le conjugué a varié : soit 2 heures soit 1 heure. L'effet de zone observé pour 4 heures d'incubation, au total, disparaît avec la réduction du temps de réaction avec le conjugué.

Différentes explications peuvent être envisagées :

- Les anticorps antitétaniques et l'anatoxine subissent sous l'effet de la température (37°C) une dénaturation telle que les différents complexes antigène-anticorps ne peuvent plus se former ou se dissocient.

- Au cours du temps, les anticorps AT se dissocient de l'anatoxine. Les IgG libres entrent alors en compétition avec les Ac AT adsorbés pour la réaction avec l'antiglobuline couplée à la peroxydase et/ou sont éliminées au lavage entraînant une diminution du rendement de la réaction.

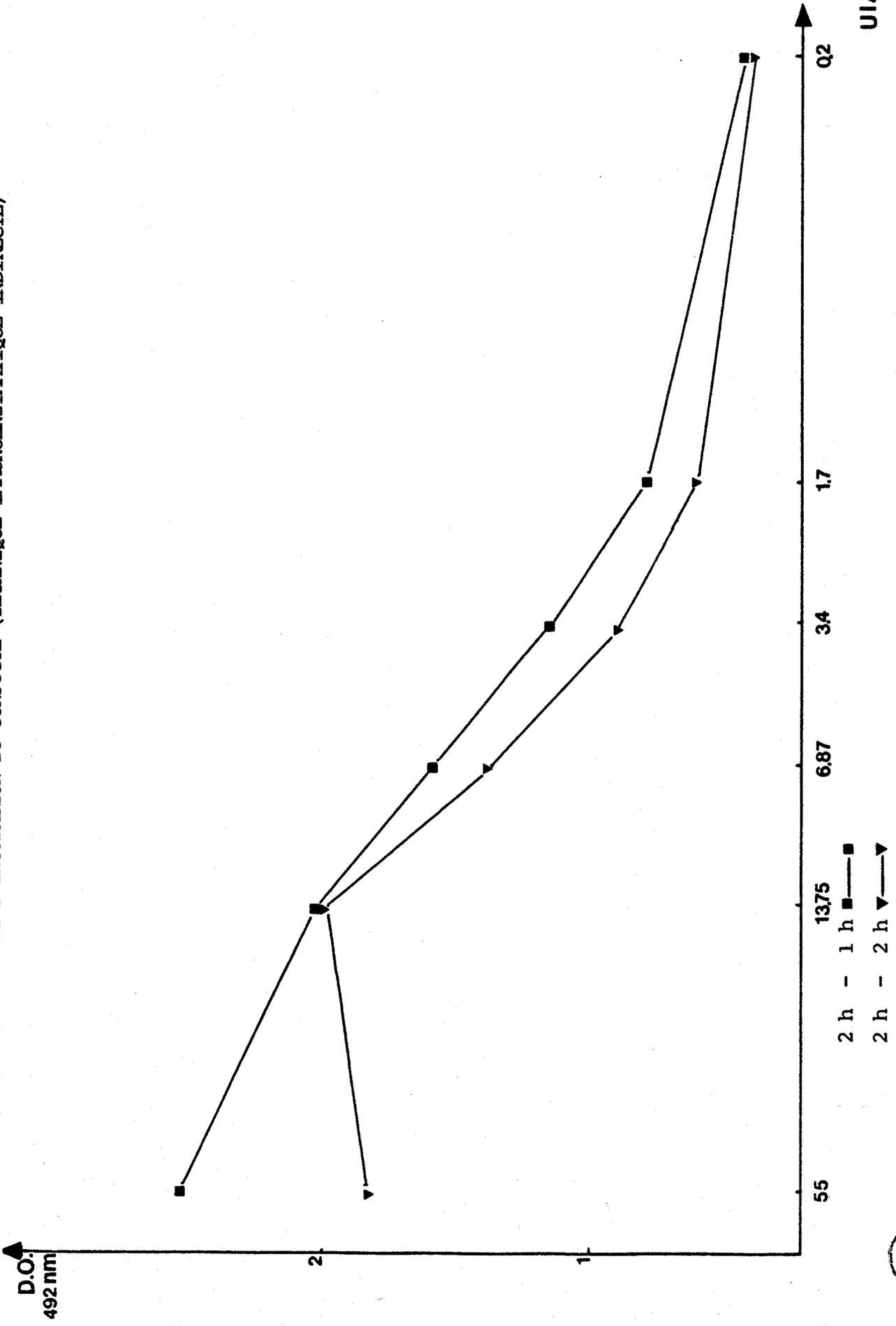
- Une inhibition par encombrement stérique peut également être envisagée.

b) étude de différents couples de temps d'incubation

Nous pouvons tirer de la figure 18, rassemblant les résultats de cette expérience, différentes conclusions :

- Si nous comparons les courbes obtenues pour les temps d'incubation 2 h - 1 h et 1 h - 1 h, nous constatons que la diminution du temps de réaction entre antigène adsorbé et anticorps à doser provoque le déplacement du phénomène de saturation : en 3 heures d'incubation, la zone linéaire de la courbe, utilisable pour un dosage, s'étend de 0,1 à 0,6 UI/ml, ensuite s'installe un plateau de saturation ; en 2 heures, la courbe possède une pente correcte, bien que plus faible que dans le cas précédent, jusqu'à 2 UI/ml. Ceci confirme

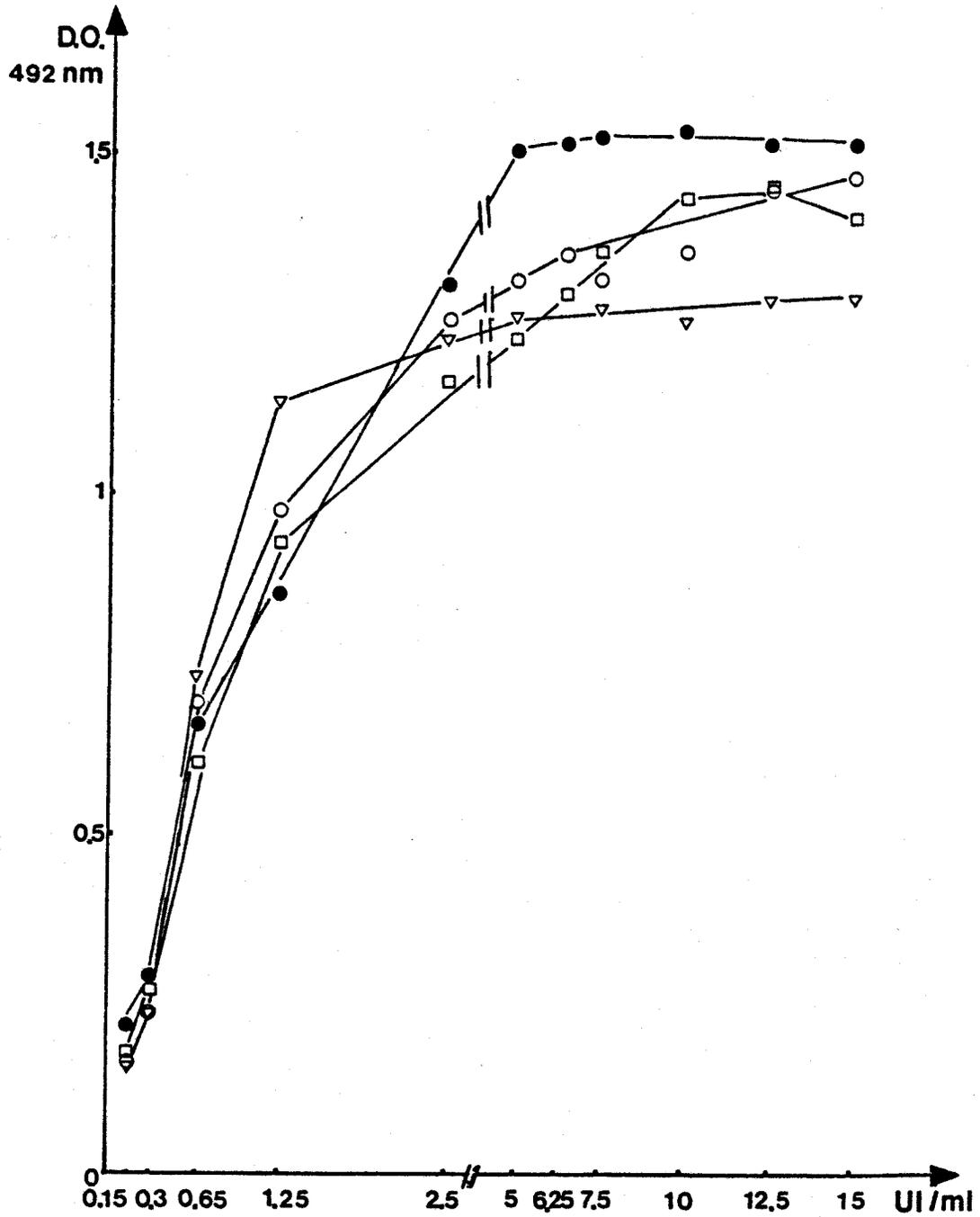
INFLUENCE DU TEMPS D'INCUBATION DU CONJUGUE (TECHNIQUE IMMUNOENZYMATIQUE INDIRECTE)



1375
2 h - 1 h ■
2 h - 2 h ▼



ETUDE DE DIFFERENTS COUPLES DE TEMPS D'INCUBATION (TECHNIQUE INDIRECTE)



- 1/4 h - 1/4 h ●—●
- 1/2 h - 1/2 h ○—○
- 1 h - 1 h □—□
- 2 h - 1 h ▽—▽



que le phénomène de saturation observé est dû, au moins en partie, à un excès d'Ac AT dans les échantillons étudiés par rapport à la capacité de fixation de l'antigène adsorbé. D'autre part, les valeurs de D.O. du plateau sont augmentées alors que la quantité d'Ac AT fixée en un temps moindre est forcément diminuée : l'influence des concentrations de conjugué et de substrat comme facteurs limitants n'est donc pas négligeable

- Le couple de temps 1/4 h 1/4 h nous fournit les meilleurs résultats, le phénomène de saturation ne se manifeste qu'au delà de 2,5 UI/ml. Entre 0,1 et 2,5 UI/ml, la pente de la courbe est moins forte que celles des courbes obtenues avec des temps d'incubation supérieurs mais elle reste encore nettement suffisante pour permettre un dosage avec une bonne sensibilité puisque une variation de D.O. de 0,01 correspond à 0,05 UI/ml. C'est en utilisant ces temps d'incubation que nous allons définir les dilutions de travail du conjugué Ac - E, des sérums et de l'anatoxine permettant d'atténuer au maximum l'effet de zone observé ici.

B) Technique immunoenzymatique "sandwich"

La figure 19 montre les courbes obtenues en étudiant une gamme de concentration d'Ac AT avec différents temps d'incubation des échantillons puis du conjugué.

La réduction du temps d'incubation total de 2 h (2 fois 1 heure) à 1 heure (2 fois 1/2 h) entraîne une augmentation des valeurs de D.O. mesurées en fin de réaction immunoenzymatique. Toutefois, une diminution trop importante de ces temps (2 fois 1/4 h) conduit à une coloration plus faible.

Les conditions expérimentales employées pour cet essai semblent bonnes puisqu'aucun phénomène de saturation n'est mis en évidence jusqu'à 15 UI/ml (sauf pour 2 heures d'incubation où l'effet de zone s'amorce entre 12 et 15 UI/ml). Nous encadrerons donc les valeurs des différents paramètres utilisées ici pour déterminer exactement les conditions optimales de réalisation de la technique.

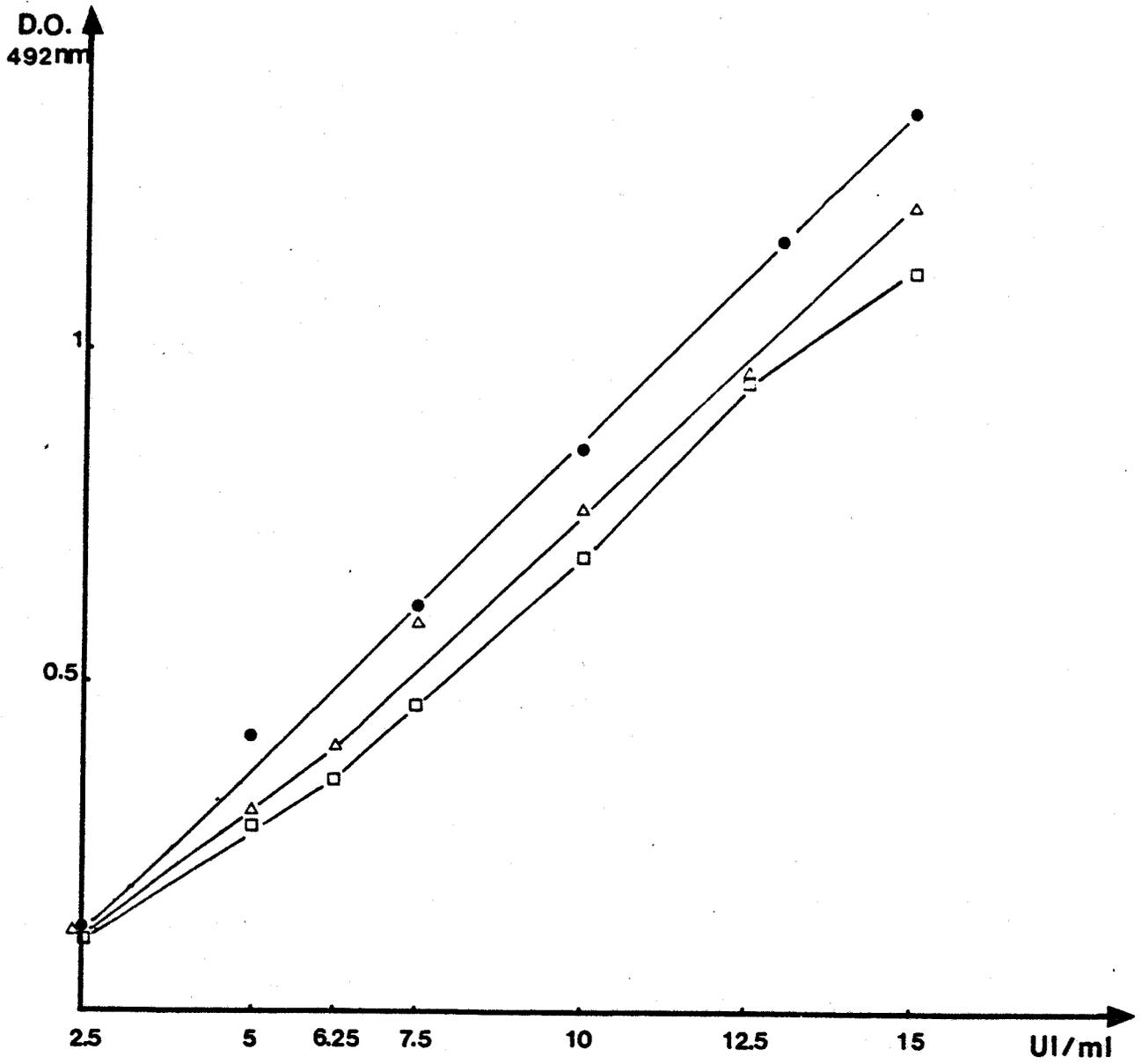
2°) Influence de la concentration du conjugué

A) Technique indirecte

Différentes courbes standards, préparées à partir du sérum étalon à 15 UI/ml, ont été établies par la technique immunoenzymatique indirecte,

Figure 19

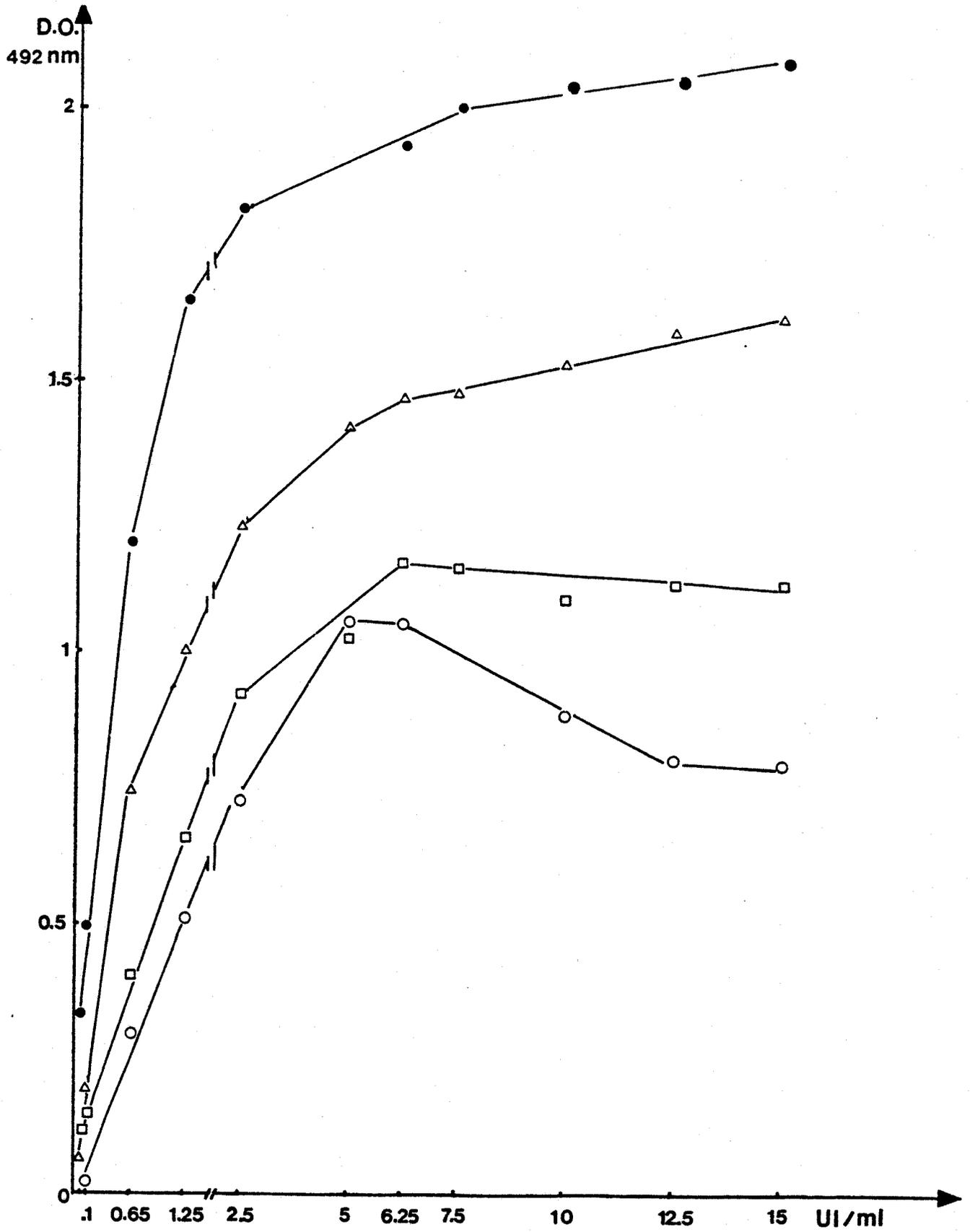
ETUDE DE DIFFERENTS COUPLES DE TEMPS D'INCUBATION (TECHNIQUE SANDWICH)



1/4 h - 1/4 h Δ — Δ
1/2 h - 1/2 h \bullet — \bullet
1 h - 1 h \square — \square



INFLUENCE DE LA CONCENTRATION DU CONJUGUE (TECHNIQUE INDIRECTE)



- △—△ conjugué dilué au 1:100
- 1:300
- 1:500
- 1:1000

le seul paramètre variable étant la concentration du conjugué, IgG de mouton anti IgG humaines couplées à la peroxydase de raifort, employé aux dilutions suivantes : 1:100, 1:300, 1:500, 1:1000, figure 20.

A forte concentration du conjugué (dilution 1:100), il est observé un effet de prozone dû à un excès de conjugué par rapport aux Ac AT fixés à l'antigène adsorbé sur le support plastique. Par opposition, avec les dilutions importantes 1:500, et 1:1000 du conjugué, les valeurs de D.O. diminuent ostensiblement et un effet de zone provoqué par un défaut de conjugué est observé.

Nous utiliserons donc le conjugué à la dilution intermédiaire 1:300. Cependant, les phénomènes de saturation dus aux facteurs limitants déjà cités : saturation des sites antigéniques par un excès d'Ac AT et défaut de conjugué ne sont pas éliminés ; des améliorations, par dilution des échantillons étudiés ou changement de concentration de l'anatoxine adsorbée, doivent donc être étudiées.

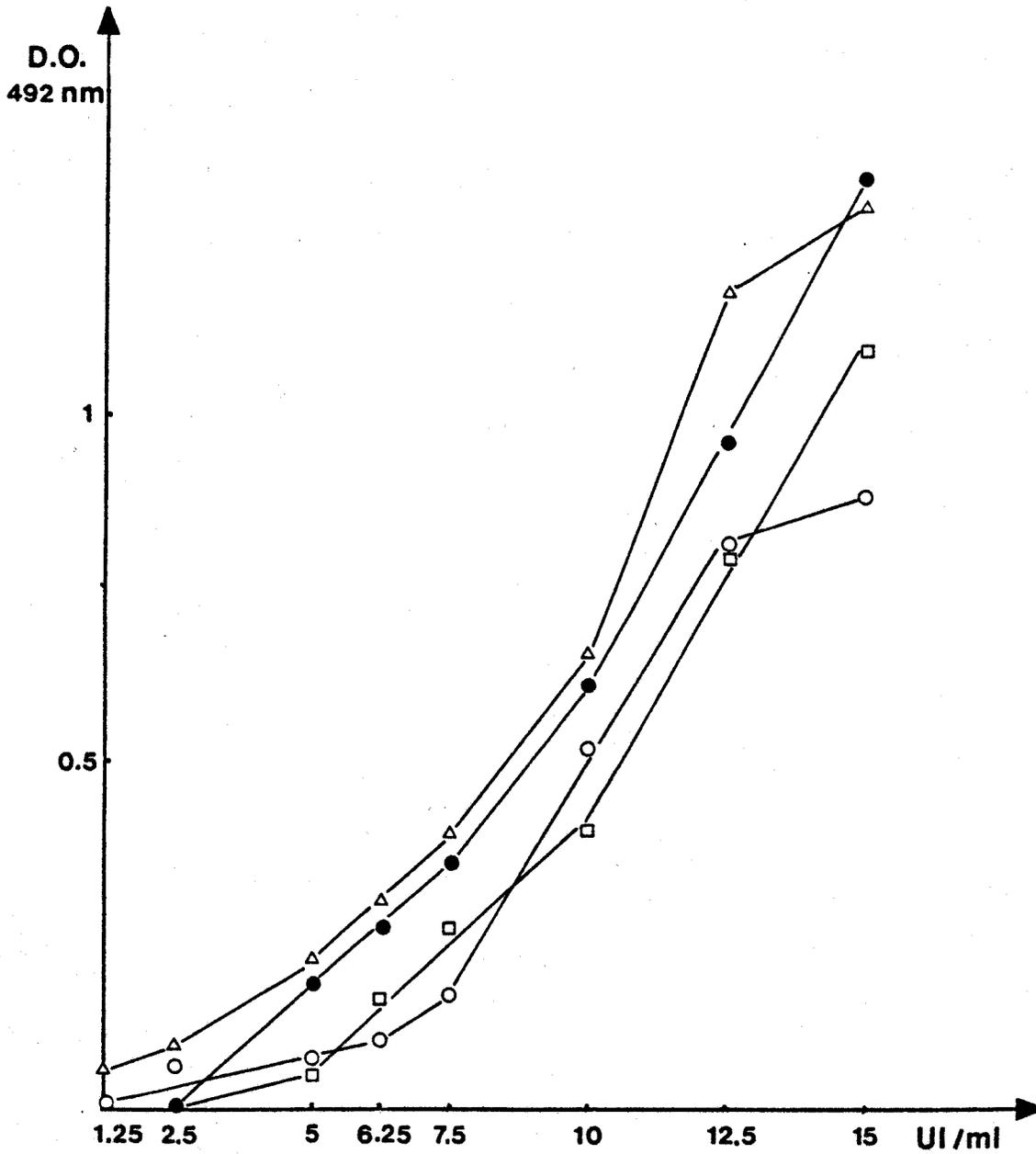
B) Technique "sandwich"

Une étude similaire a été réalisée, ici, pour déterminer la meilleure dilution de travail du conjugué anatoxine - peroxydase préparé au laboratoire. Les dilutions employées varient du 1:25 au 1:200. Nous pouvons conclure d'après la figure 21 que la dilution 1:50 est la meilleure ; en effet, avec une plus forte concentration de conjugué, un plateau est observé pour les taux d'Ac AT supérieurs à 12,5 UI/ml soit par défaut de substrat, soit par saturation de la phase solide, pour les dilutions 1:100 et 1:200 du conjugué, les valeurs de D.O. obtenues sont inférieures et il se produit même un effet de zone au delà de 12,5 UI/ml, par défaut de conjugué.

3°) Interdépendance des 2 paramètres : concentration d'anatoxine ; dilution des échantillons

Pour chaque variante de la technique, on a retenu comme optimales, les conditions expérimentales donnant la plus forte différence de D.O. entre les sérums à 5 et 15 UI/ml, considérés à la même dilution.

INFLUENCE DE LA CONCENTRATION DU CONJUGUE (TECHNIQUE SANDWICH)



Δ—Δ conjugué An - E dilué au 1:25
 ●—● 1:50
 □—□ 1:100
 ○—○ 1:200



A) Technique indirecte

Les résultats obtenus dans l'étude simultanée du taux d'anatoxine et de la dilution des sérums ont été représentés de deux façons différentes. La figure 22 montre les courbes de D.O. en fonction de la dilution des sérums titrant 5 et 15 UI/ml pour chaque dilution d'anatoxine tétanique adsorbée. L'augmentation des densités optiques est en relation directe avec la dilution d'anatoxine adsorbée ; à partir de la dilution d'anatoxine 1:64, un plateau est atteint. Simultanément, les courbes d'allure incurvée se redressent de plus en plus jusqu'à la linéarité presque parfaite pour les dilutions 1:32, 1:64 et 1:128. Ceci reflète l'évolution favorable dans les rapports de concentration antigène/anticorps, tout excès de l'un ou de l'autre se manifestant par un plateau. Il est ainsi possible de situer les conditions optimales de réaction comme suit : dilution d'anatoxine 1:32 , dilution du sérum 1:10; dilution d'anatoxine 1:64, dilution du sérum 1:15.

Pour déterminer exactement ces paramètres, nous avons représenté les mêmes résultats dans la figure 23 en portant, en ordonnées, les écarts de densité optique (Δ D.O.), pour une dilution donnée, des sérums titrant 5 et 15 UI/ml en fonction de la dilution d'anatoxine (en abscisse)..

Plusieurs possibilités de travail s'offrent à nous : la meilleure est remplie par le couple anatoxine au 1:64 et sérum au 1:15. La dilution 1:15 du sérum sous 100 μ l directement dans la cupule étant délicate, en pratique, nous avons préféré utiliser le sérum dilué au 1:10, avec l'anatoxine adsorbée à la dilution 1:32. Ce choix a d'ailleurs été confirmé par une meilleure reproductibilité des résultats.

B) Technique sandwich

La même étude a été effectuée mais les dilutions de sérum considérées sont p, 1:2, 1:5, 1:10 et 1:50.

Les courbes représentées sur la figure 24 montrent une évolution similaire à celle décrite pour la technique indirecte. D'après la figure 25, nous pouvons dire que les meilleures conditions de réaction sont réunies avec l'anatoxine diluée au 1:32 et le sérum utilisé pur.

Des résultats similaires ont été obtenus pour des temps d'incubation d'1/4 h ; cependant, les valeurs de D.O. et de Δ D.O. étant diminuées, nous avons opté pour des durées d'incubation d'1/2 heure.

Figure 22

INTERDEPENDANCE DES PARAMETRES : CONCENTRATION D'ANATOXINE, DILUTION DES SERUMS (TECHNIQUE INDIRECTE)

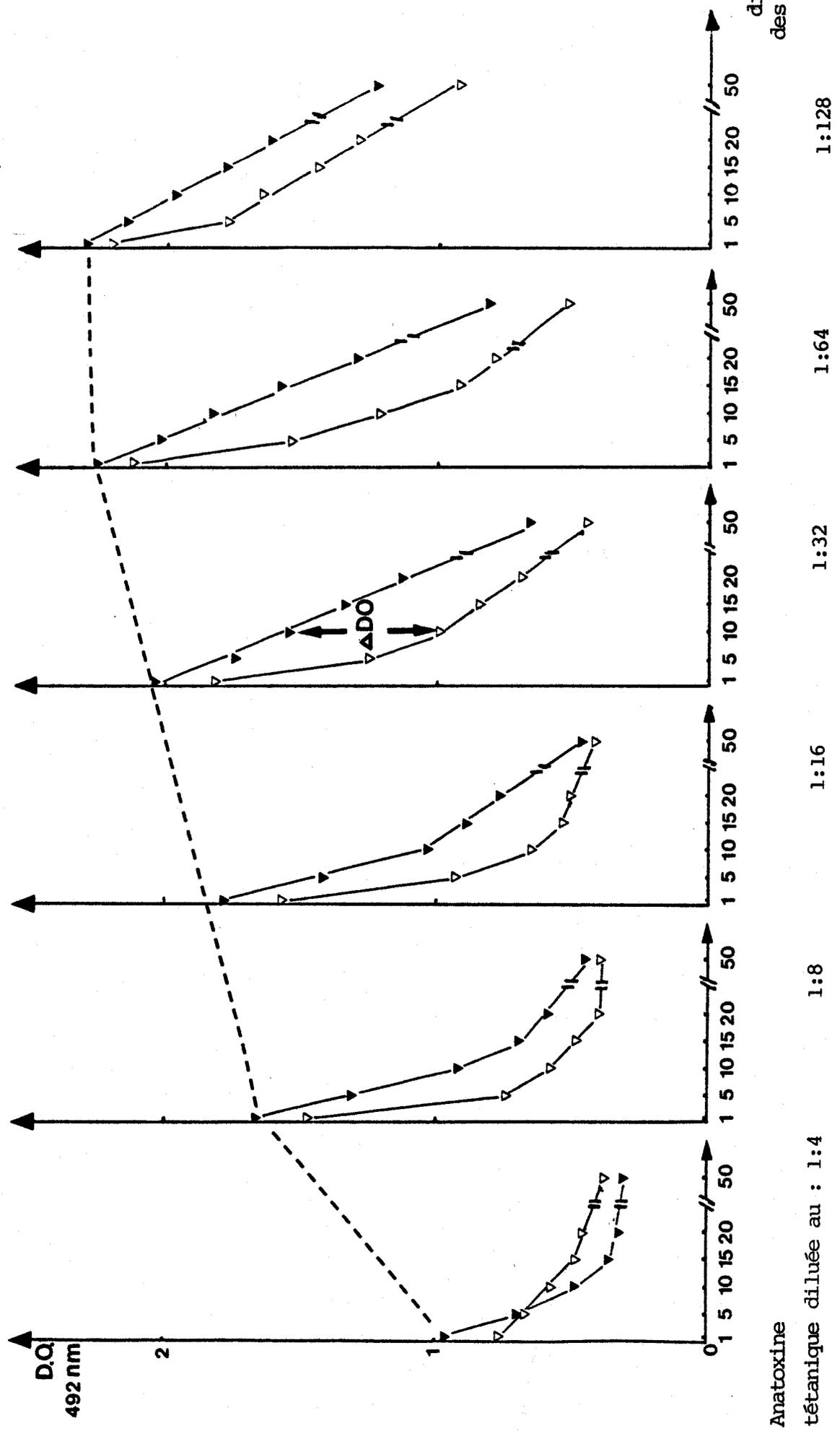


Figure 23

EVOLUTION DES ECARTS DE DO EN FONCTION DE LA DILUTION D'ANATOXINE, POUR UNE DILUTION DONNEE DES SERUMS

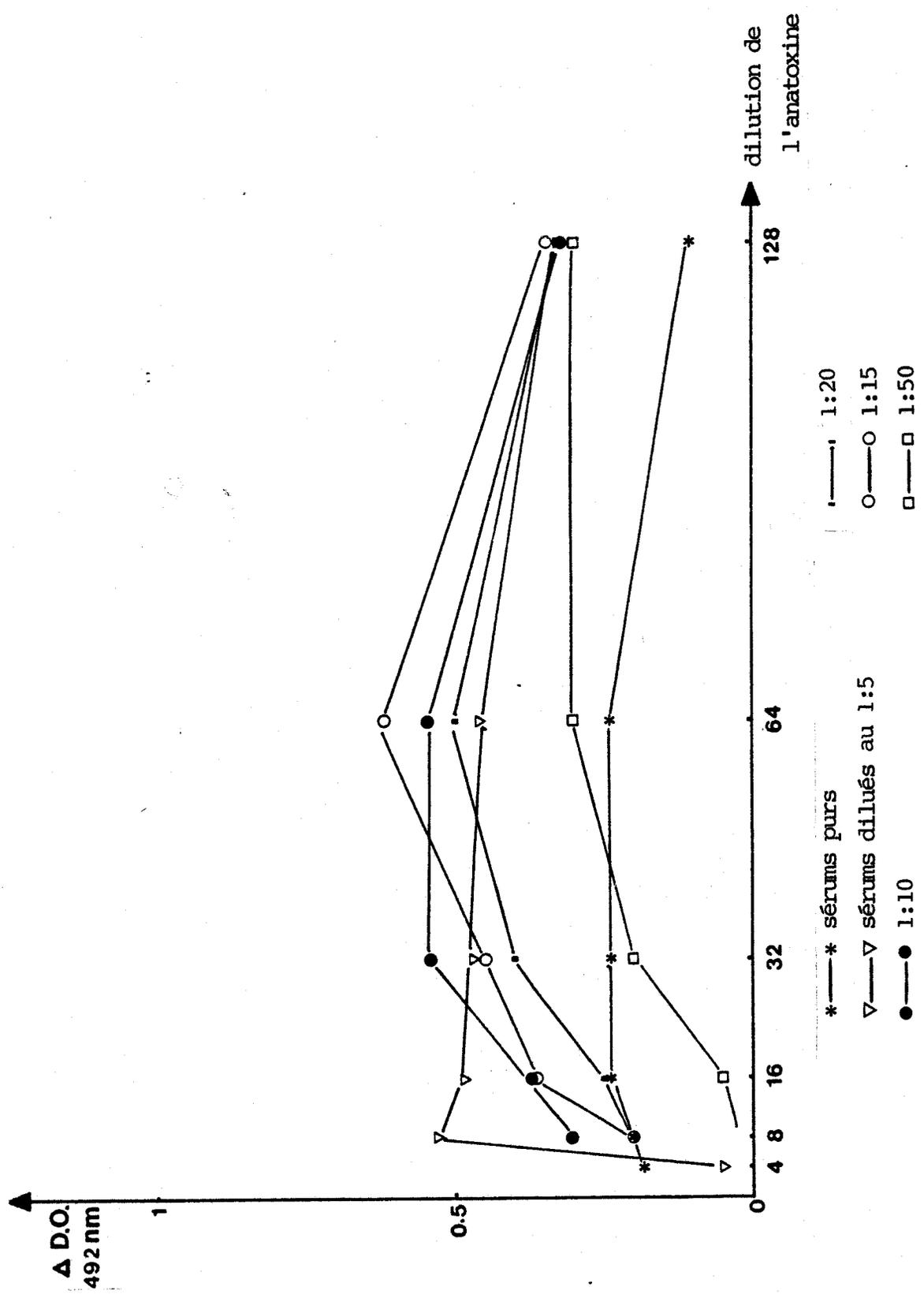
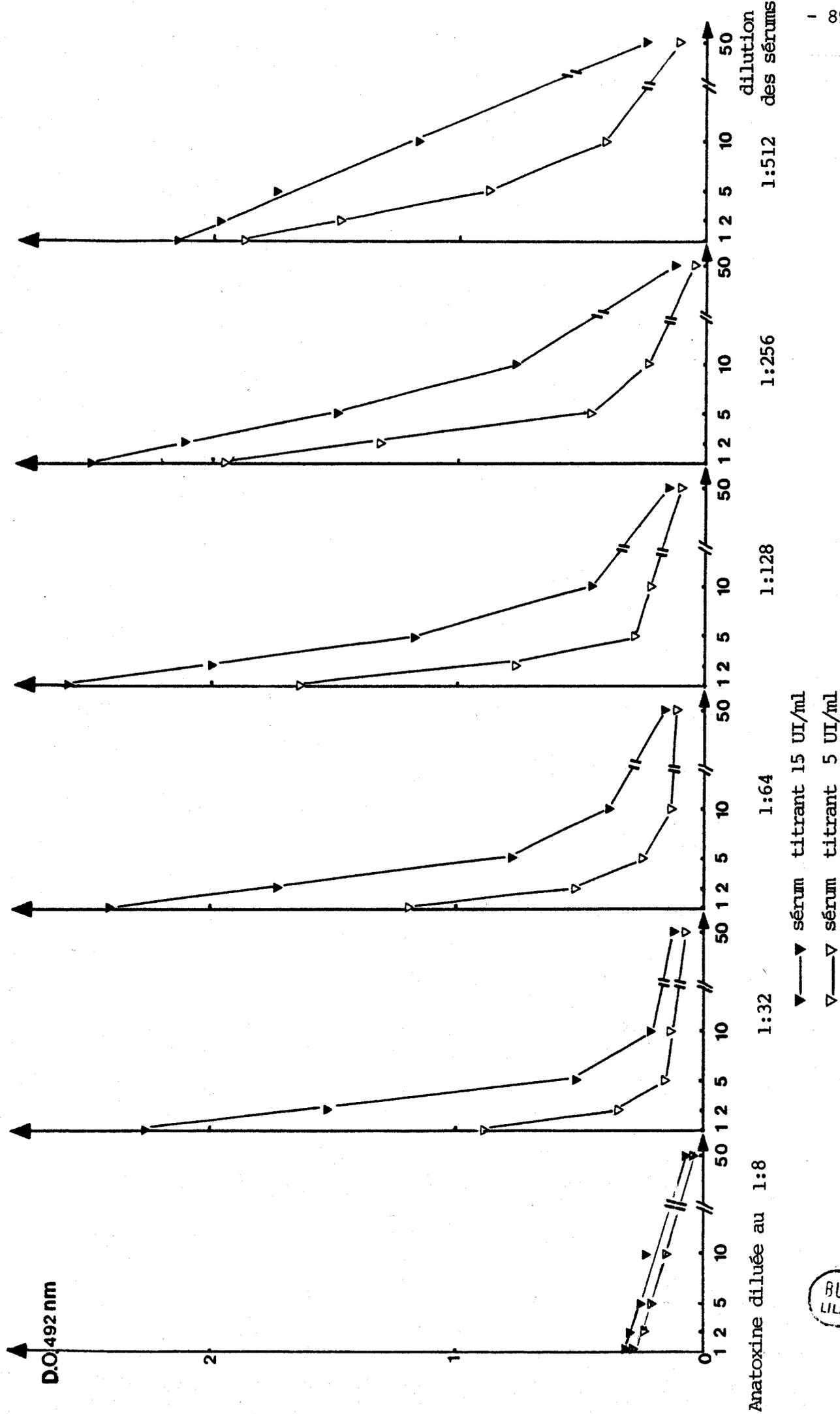
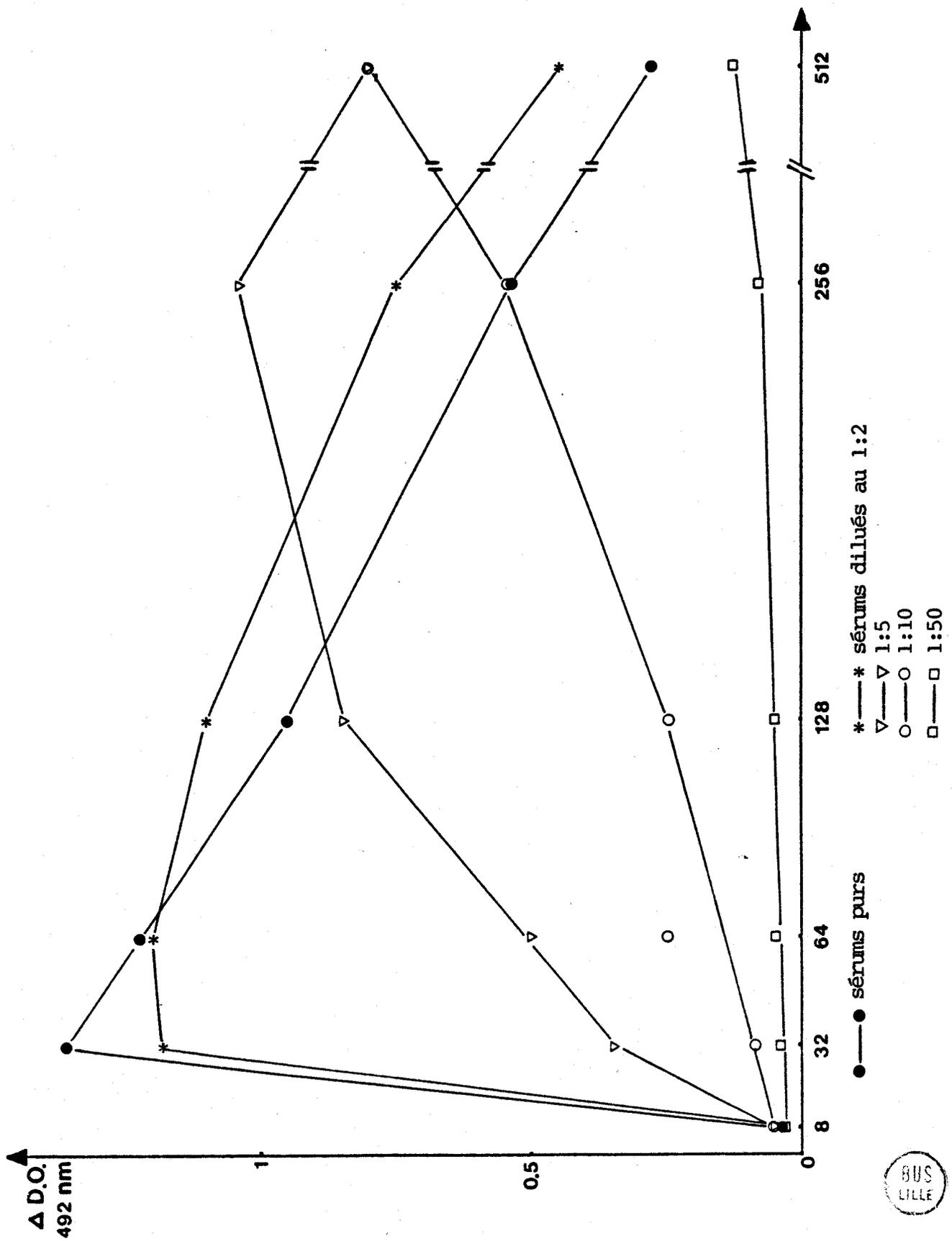


Figure 24

INTERDEPENDANCE DE LA CONCENTRATION D'ANATOXINE ET DE LA DILUTION DES SERUMS (TECHNIQUE SANDWICH)



EVOLUTION DES ECARTS DE DO EN FONCTION DE LA DILUTION DE L'ANATOXINE, POUR UNE DILUTION DONNEE DES SERUMS



4°) Influence de la concentration du substrat

Deux solutions de substrats différentes ont été utilisées pour révéler l'enzyme fixé en fin de réaction immunoenzymatique.

S₁ = 2 µl d'H₂O₂ à 30 volumes
4 mg d'orthophénylène diamine dans 10 ml de tampon

S₂ = 400 µl d'H₂O₂ à 30 volumes
8 mg d'orthophénylène diamine dans 10 ml de tampon

Les résultats de l'étude sont réunis dans la figure 26. L'augmentation de concentration du substrat (S₂) a entraîné l'allongement du temps nécessaire à l'apparition de la coloration, ce qui est un avantage certain pour une meilleure reproductibilité lors de la répartition des réactifs, mais ceci s'est accompagné d'une diminution des valeurs de D.O. obtenues. Il semble donc que ce paramètre nécessite, à lui seul, une étude plus approfondie.

5°) Conclusion

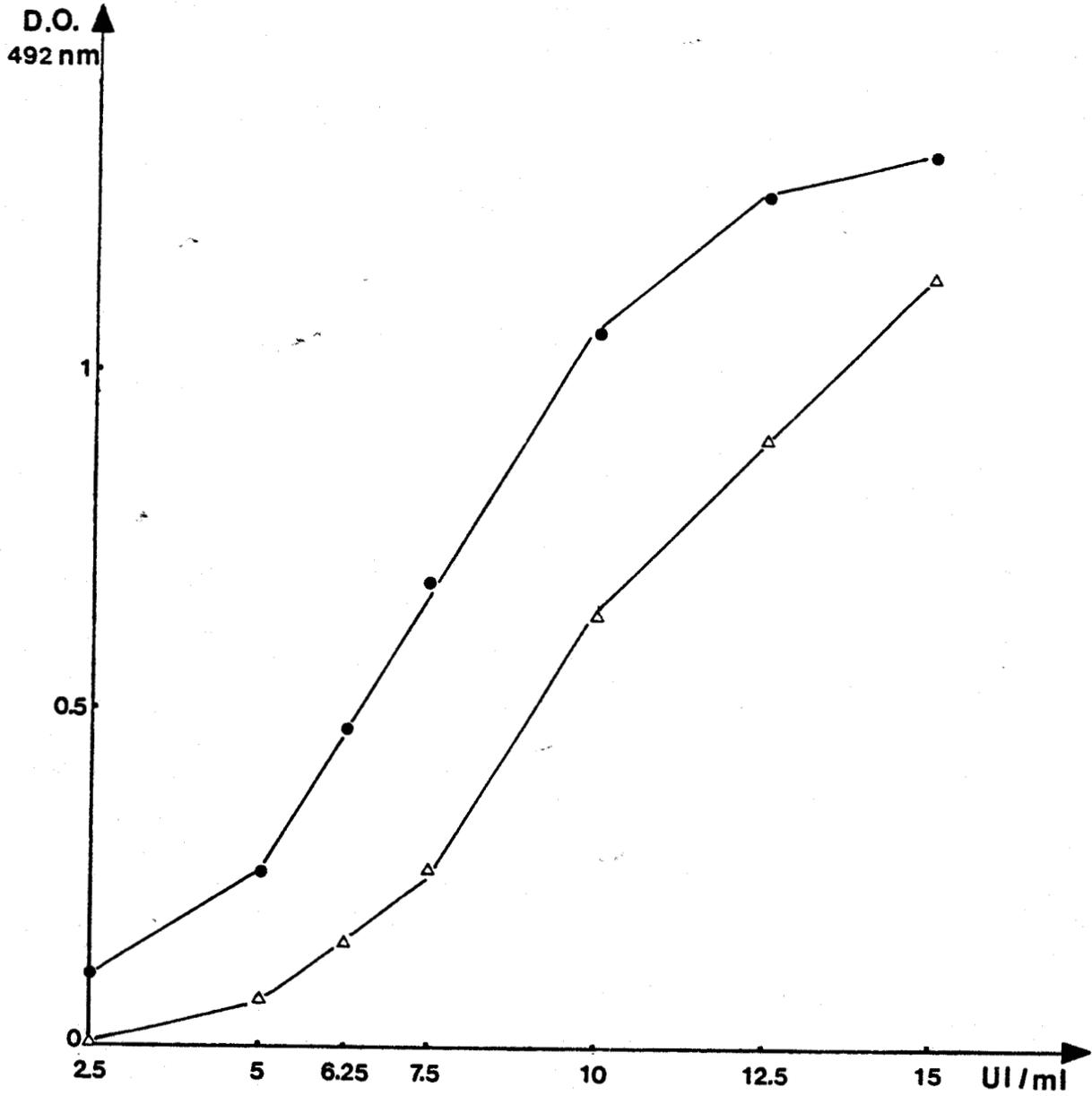
Avant d'aborder les résultats de l'application pratique des techniques que nous avons mises au point, il nous semble important de discuter des éléments notés jusqu'à présent.

Nous nous sommes fixés un certain nombre de critères à respecter dans la mise au point d'une technique de dépistage des Ac AT :

- la précision qui est bien évidemment un des points principaux
- la sensibilité, ici, n'est pas le but principal puisque nous devons dépister des taux élevés d'Ac AT : au moins 4 UI/ml. Nous avons bien entendu recherché le maximum de sensibilité dans la zone supérieure à 4 UI/ml mais l'étude qui précède nous montre que, par le jeu des dilutions d'anatoxine, des sérums ou du conjugué, il est toujours possible de déplacer cette zone vers des taux d'Ac plus faibles.

- la rapidité et la possibilité d'adaptation à l'automatisation : ces deux derniers objectifs ont été atteints grâce à la méthode d'adsorption de l'anatoxine tétanique par séchage à 37°C qui possède un rendement de fixation très élevé. Ainsi, les temps d'incubation ont été très fortement réduits (1 h et 1/2 h au total) et les échantillons sont utilisés purs ou à une dilution facilement réalisable directement dans les cupules et avec un risque d'erreur faible.

INFLUENCE DE LA CONCENTRATION DU SUBSTRAT



● — ● S₁

△ — △ S₂



III) APPLICATION AUX DEPISTAGE ET DOSAGE DES Ac AT

1°) Courbes d'étalonnage

Elles sont établies par mesure de la densité optique, en fin de réaction immunoenzymatique, pour une gamme de concentration d'Ac AT réalisée par dilution de nos étalons de référence.

Les courbes obtenues par la technique sandwich pour le sérum (fig 27) et le plasma (fig 28) sont comparables. Comme le montre la figure 28, la courbe est d'allure sigmoïdale ; un phénomène de zone dû à la saturation des sites antigéniques par un excès d'Ac ou à un défaut de substrat se manifeste au delà de 20 UI/ml. Dans le cas du sérum étalon, les possibilités de la technique sont d'au moins 15 UI/ml. Il est donc possible de doser, au cours même du dépistage, sur échantillon pur, le taux d'anticorps AT jusqu'à 20 UI/ml. Au delà, il est nécessaire de diluer l'échantillon.

La courbe établie, à partir du sérum étalon, par la technique indirecte (fig 29) présente une rupture de pente à partir de 7,5 UI/ml ; nous serons donc amenés à reprendre certains échantillons pour les doser dans la zone de la courbe ayant la meilleure pente.

2°) Dépistage des anticorps antitétaniques

Nous avons rassemblé dans le tableau VI les résultats comparatifs des dépistages de ces anticorps réalisés par les techniques immunoenzymatiques et par électroimmuno-diffusion. Nous avons distingué 4 catégories d'échantillons selon le taux d'anticorps antitétaniques : inférieur à 4 UI/ml, de 4 à 7 UI/ml, égal et supérieur à 8 UI/ml (subdivisé en 8 - 19 UI/ml et supérieur ou égal à 20 UI/ml).

La technique sandwich nous fournit des résultats concordants avec l'électro-immunodiffusion pour les plasmas comme pour les sérums ; ce n'est pas le cas pour la technique indirecte qui semble nettement moins satisfaisante (apparemment, déplacement de la classe 4 à 7 UI/ml vers la classe \geq 8 UI/ml).

Les taux d'Ac AT déterminés par les techniques immunoenzymatiques sont surestimés par rapport à ceux de l'EID, en particulier pour la technique indirecte. Ce phénomène peut s'expliquer par plusieurs faits :

- l'électroimmunodiffusion permet de mettre en évidence les anticorps précipitants quelque soit leur classe (170). L'apparition d'anticorps antitétaniques des classes IgM et IgA n'est pas limitée à la réponse immunitaire primaire (77).

COURBE D'ETALONNAGE ETABLIE A PARTIR DU SERUM
A 15 UI/ML PAR TECHNIQUE SANDWICH

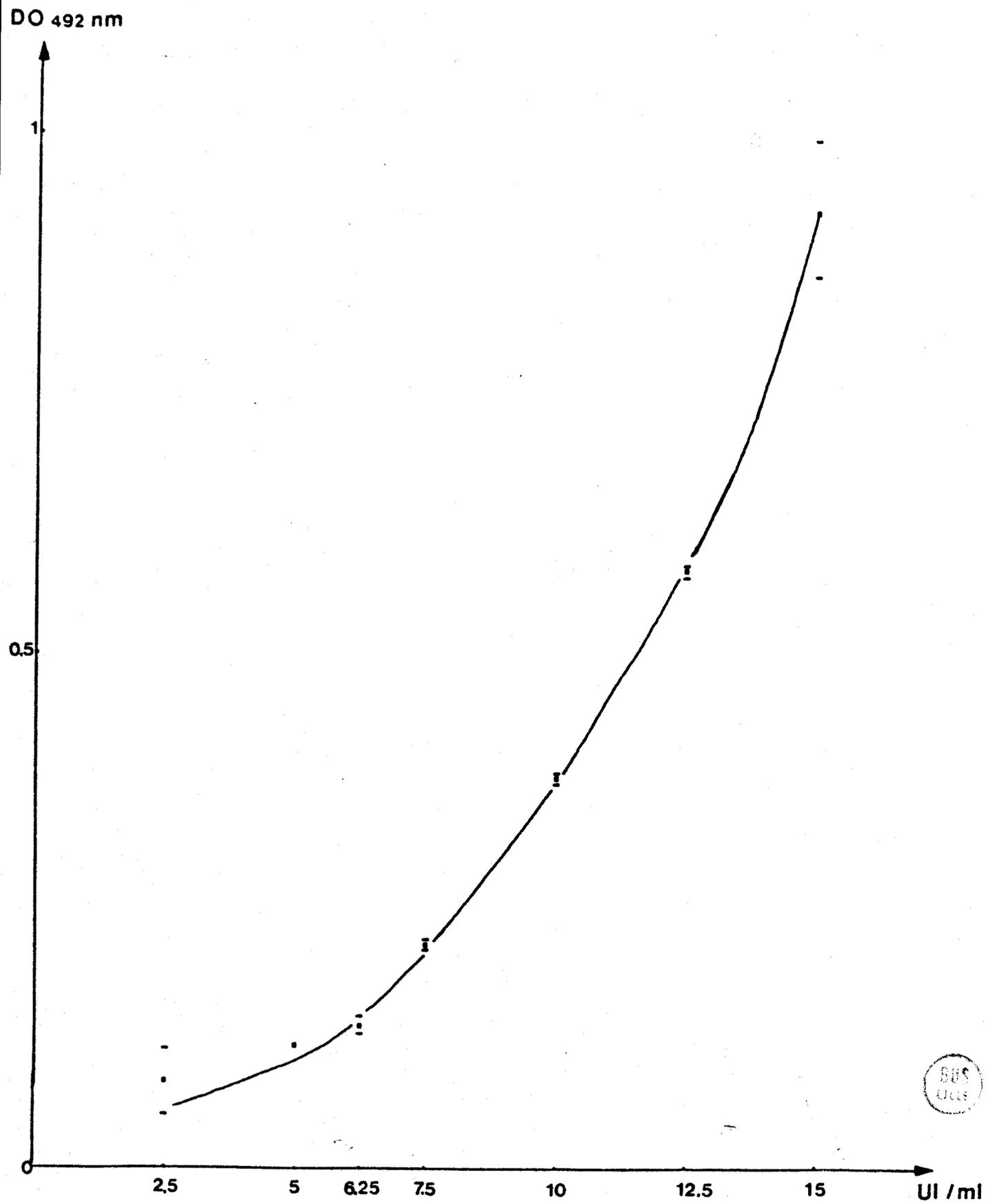


Figure 28

COURBE D'ETALONNAGE ETABLIE A PARTIR DU PLASMA
A 40 UI/ML PAR TECHNIQUE SANDWICH

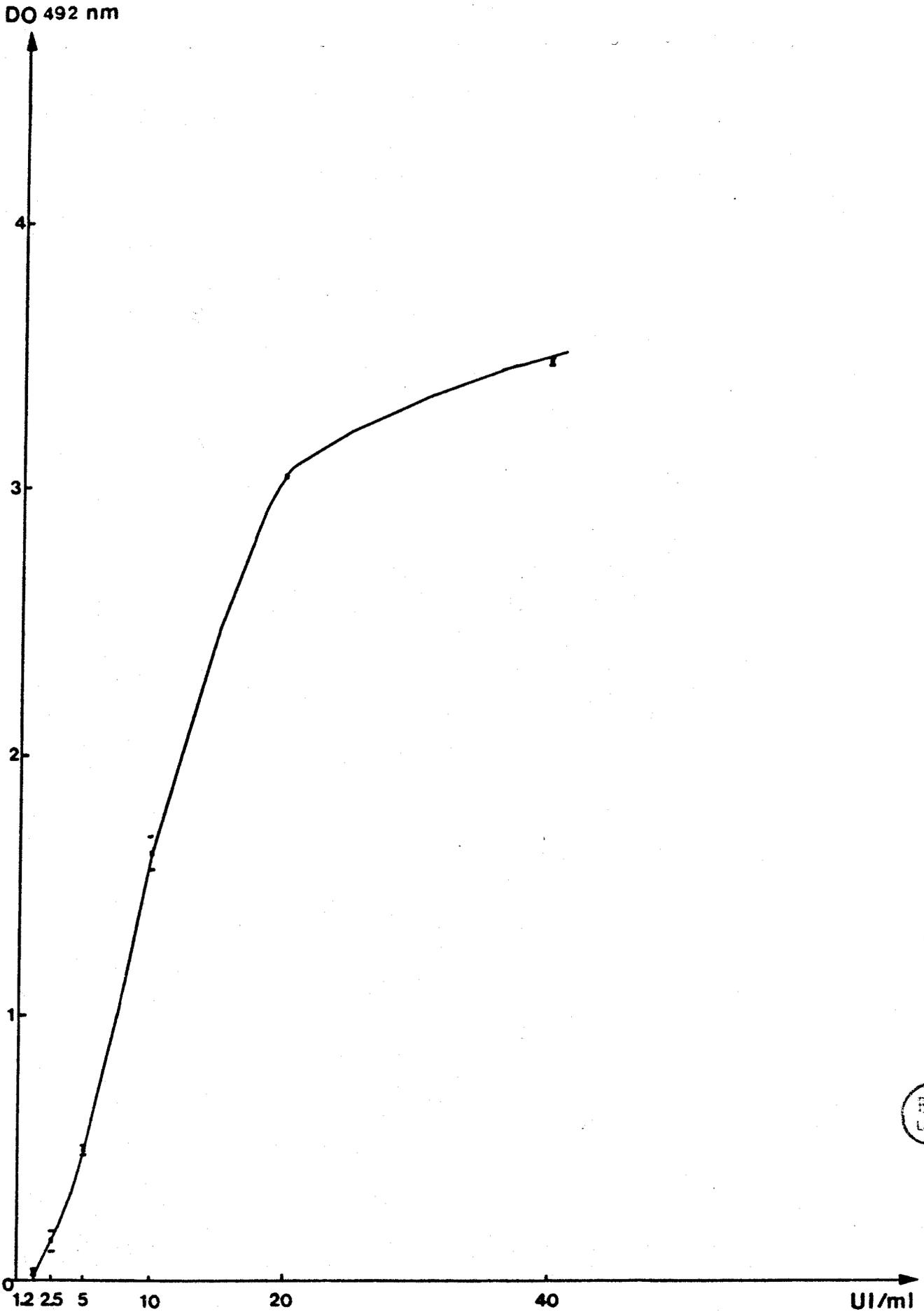
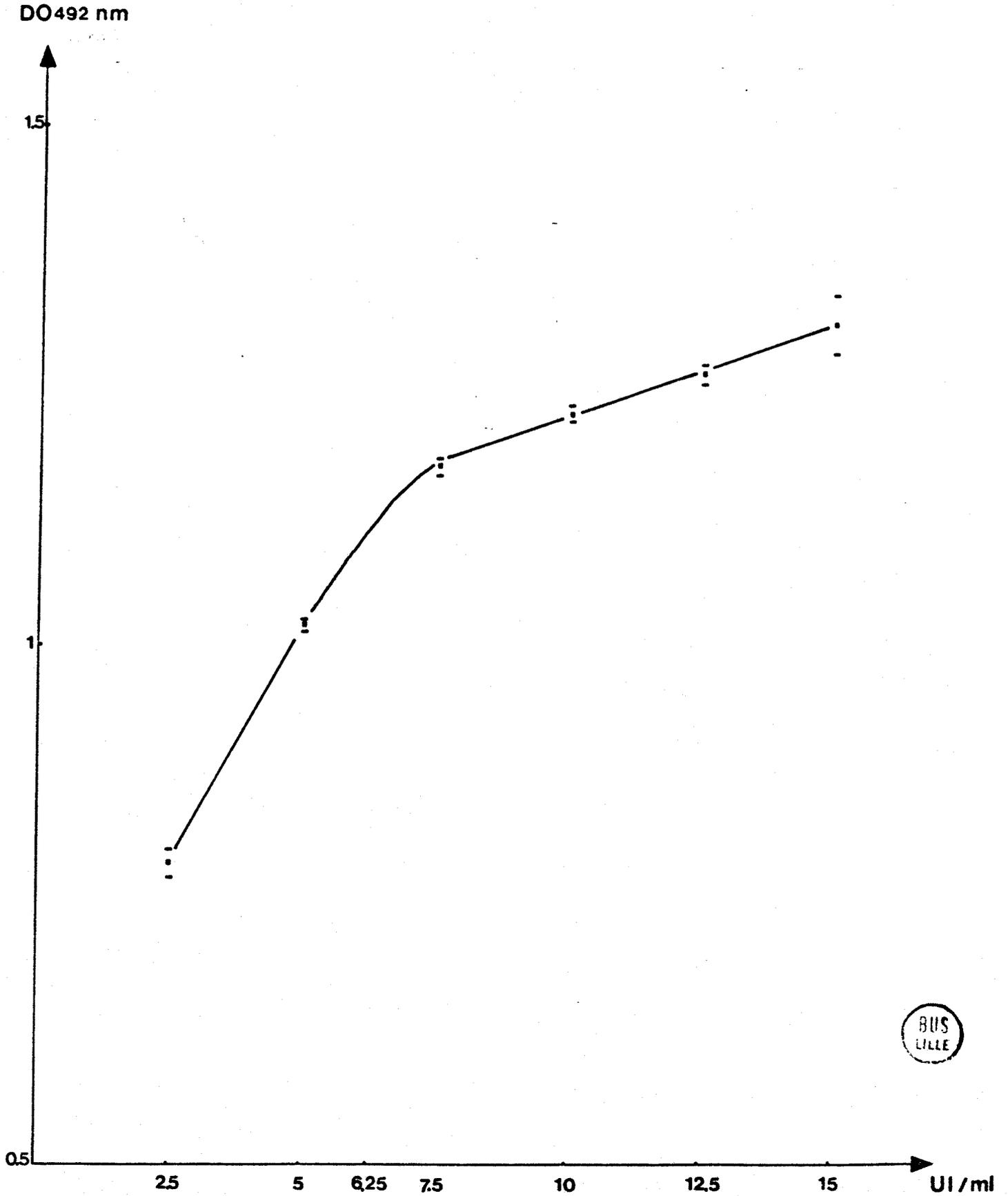


Figure 29

COURBE D'ETALONNAGE ETABLIE A PARTIR DU SERUM
A 15 UI/ML PAR TECHNIQUE INDIRECTE



- les techniques immunoenzymatiques détectent les anticorps antitétaniques immunologiquement actifs vis à vis de l'anatoxine qu'ils soient précipitants ou non, la variante d'EIA indirecte ne dosant que les anticorps de type IgG.

La technique EIA sandwich dose donc, théoriquement, tous les anticorps antitétaniques présents dans les échantillons, de façon spécifique.

Nous avons étudié les résultats des dosages d'anticorps antitétaniques en calculant, par la méthode des moindres carrés, les droites de régression linéaire et le coefficient de corrélation entre taux estimé en EID et mesuré en EIA.

Les résultats concernant les sérums et plasmas par technique EIA sandwich ont été traités séparément puisque la nature des échantillons et donc des étalons employés diffère.

Les figures 30, 31 et 32 représentent les droites de régression obtenues. Le diagramme établi (fig 30) pour 122 sérums dosés par la technique indirecte montre la grande dispersion des valeurs. L'équation de la droite de régression linéaire est $y = 1,14 x + 0,05$ (fig 30). Notre technique immunoenzymatique indirecte surestime les taux d'Ac AT par rapport à l'EID d'autant plus que ceux-ci sont élevés, comme le reflète déjà le tableau VI. Le coefficient de corrélation r est de 0,79.

Par contre, les coefficients de corrélation pour 84 sérums et 80 plasmas dosés par technique EIA sandwich sont beaucoup plus satisfaisants : ils sont respectivement de 0,94 et 0,97, ce qui indique une concordance presque parfaite. Les équations des droites de régression sont $y = 1,29 x - 1,11$ (fig 31, sérums) et $y = 1,12 x - 1,39$ (fig 32, plasmas). Dans l'ensemble, nous notons une surestimation des taux d'Ac AT dosés dans les sérums. Les coefficients de corrélation de 0,94 et 0,97 obtenus entre la technique sandwich et l'EID montrent que nous avons dosé les mêmes populations d'Ac AT.

Nous n'avons rapporté jusqu'à présent que des résultats obtenus avec les techniques immunoenzymatiques par mesure spectrophotométrique. Il ne faut pas écarter la possibilité de lecture visuelle pour la sélection des sérums ayant un titre d'Ac AT intéressant. La figure 33 est la photographie d'une plaque après révélation de l'enzyme fixé. Par comparaison des intensités de coloration obtenues pour l'étalon à 4 UI/ml et les échantillons à doser, il est possible de dépister, très rapidement et sans aucun appareillage, les prélèvements dont le taux d'Ac AT est égal au moins à 4 UI/ml.

Figure 30

Corrélation entre les résultats des dosages d'Ac AT par E.I.D et E.I.A

- indirecte sur des sérums.

Le chiffre à côté d'un point représente le nombre de résultats superposés en ce même point (9 résultats, sortant de l'échelle, n'apparaissent pas sur la figure).

$$y = 1,14 x + 0,05$$



x taux d'Ac AT en UI/ml EID

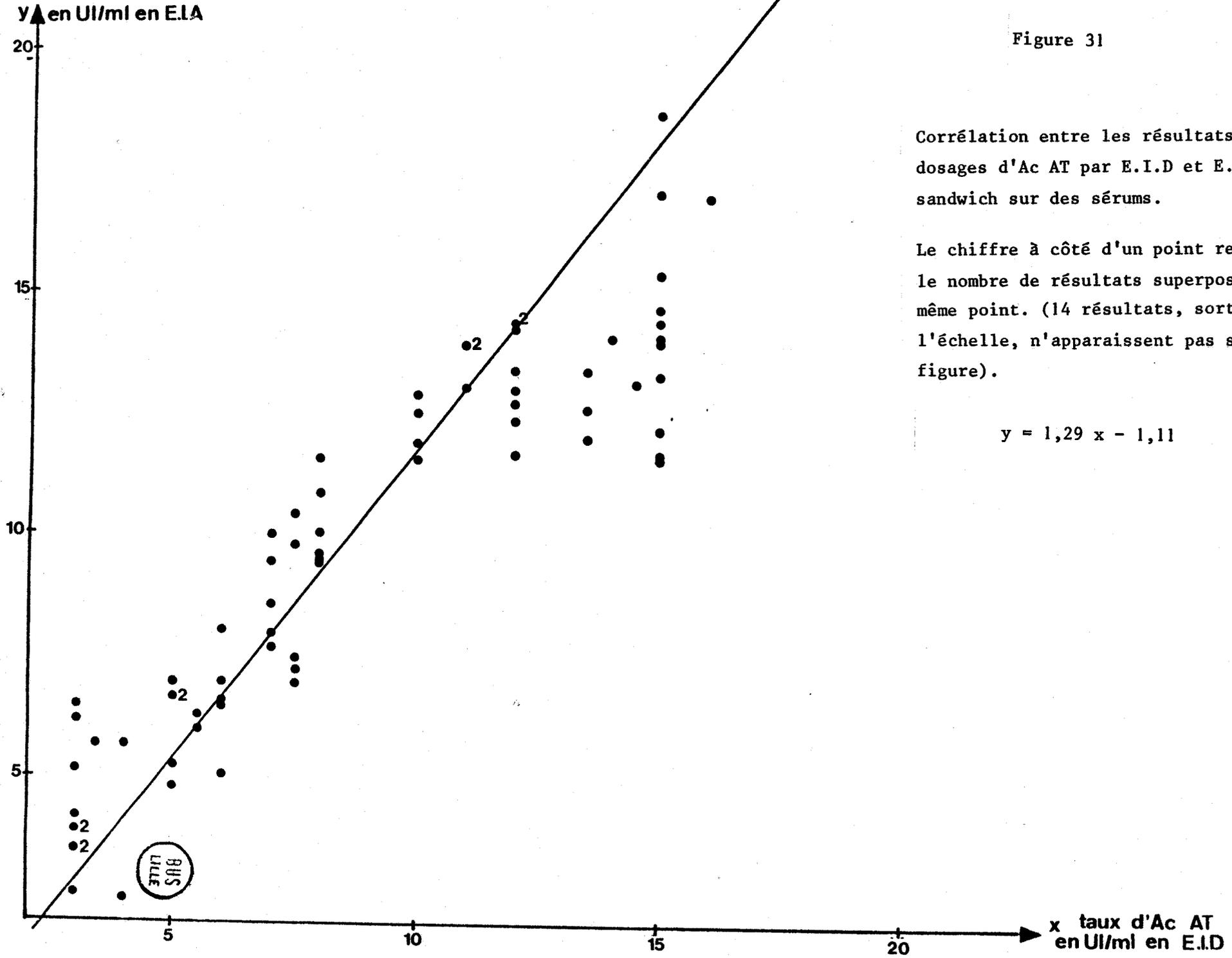


Figure 31

Corrélation entre les résultats des dosages d'Ac AT par E.I.D et E.I.A sandwich sur des sérums.

Le chiffre à côté d'un point représente le nombre de résultats superposés en ce même point. (14 résultats, sortant de l'échelle, n'apparaissent pas sur la figure).

$$y = 1,29 x - 1,11$$

Figure 32

Corrélation entre les résultats des dosages d'Ac AT par E.I.D et E.I.A sandwich sur des plasmas.

Le chiffre à côté d'un point représente le nombre de résultats superposés en ce même point (6 résultats, sortant de l'échelle n'apparaissent pas sur la figure).

$$y = 1,12 x - 1,39$$

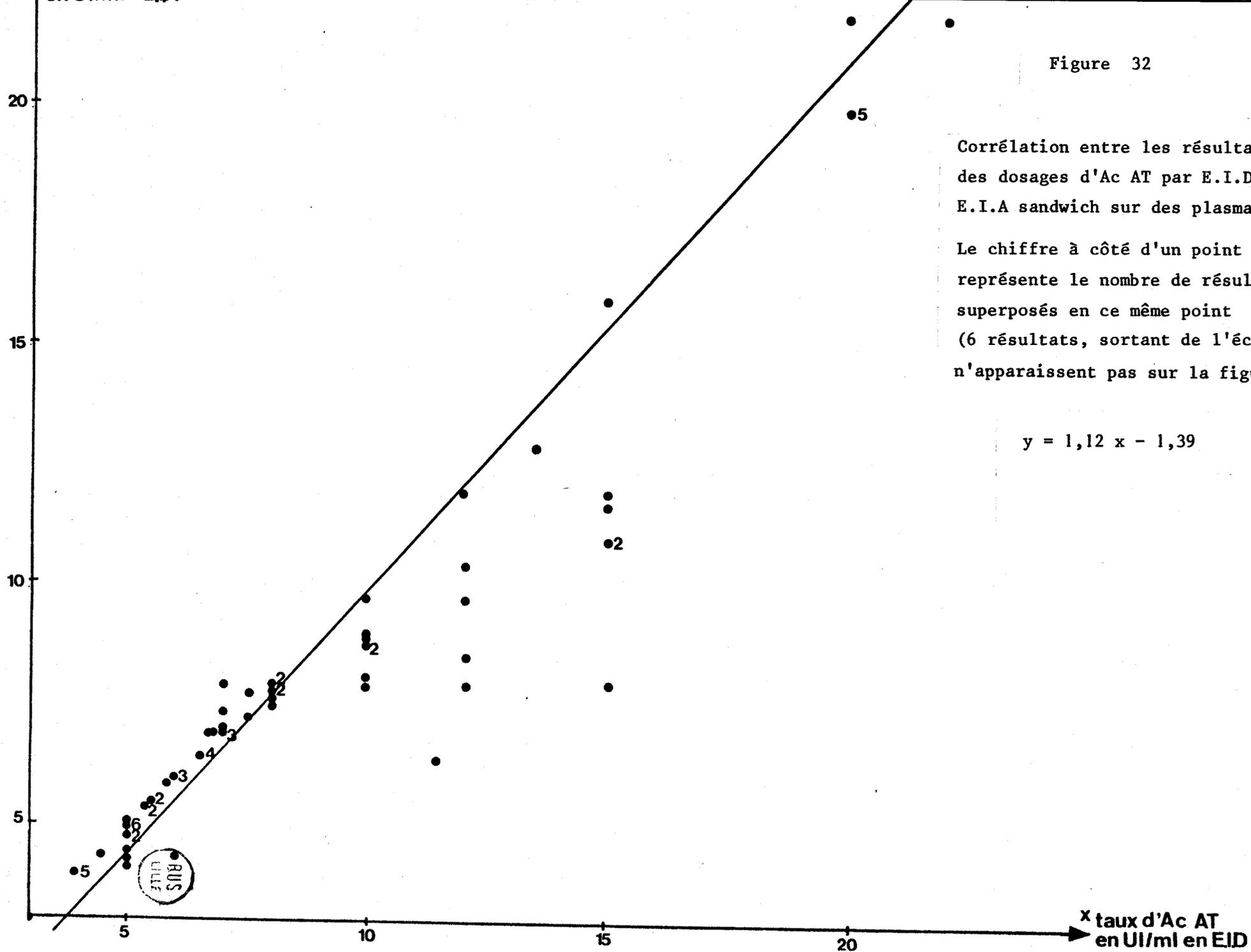
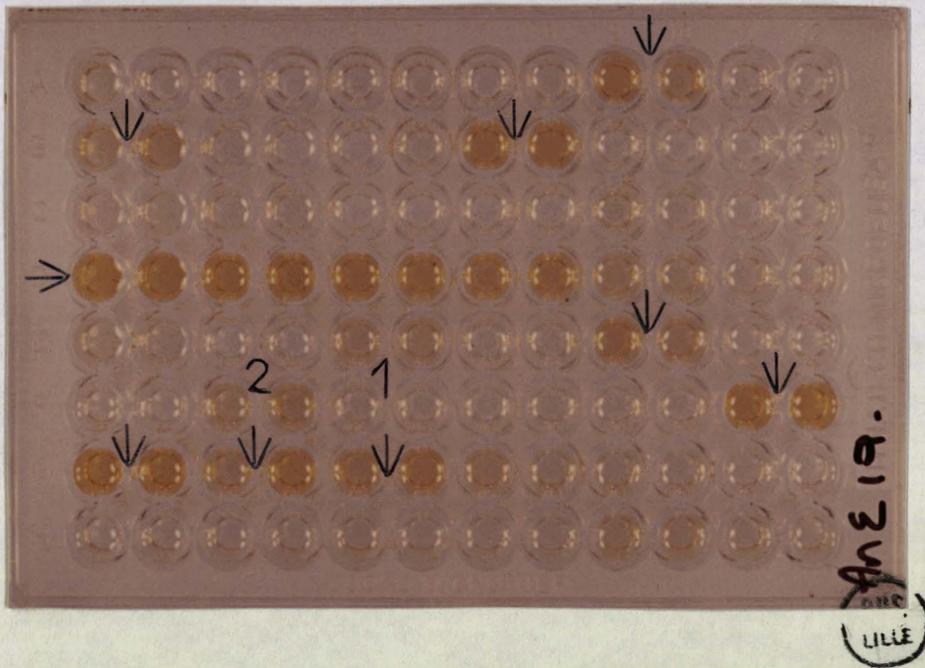


Figure 33

LECTURE VISUELLE D'UNE PLAQUE EN FIN
DE REACTION IMMUNOENZYMATIQUE



- 1 sérum étalon à 4 UI/ml
- 2 témoin tampon

➔ : sérums contenant des Ac AT à un taux égal ou supérieur à 4 UI/ml

3°) Reproductibilité

Le tableau VII rassemble toutes les valeurs en UI/ml obtenues pour le sérum étalon à 5 UI/ml par les différentes techniques employées dans ce travail.

Les chiffres se rapportant à la technique de neutralisation de la toxine chez la souris ne sont donnés qu'à titre indicatif, ce dosage n'ayant été réalisé que 4 fois par un laboratoire extérieur. (Pasteur, Garches).

Les coefficients de variation se situent à 8,5 % et environ 12,5 % pour les techniques immunoenzymatiques alors que celui observé pour l'EID est de l'ordre de 11 %. Avec la méthode immunoenzymatique sandwich mise au point au laboratoire, nous disposons donc d'une technique aussi rapide que l'électro-immunodiffusion (1 heure) et d'une meilleure reproductibilité.

Les études de reproductibilité réalisées pour d'autres techniques de dépistage des anticorps antitétaniques sont peu nombreuses. Cependant, nous avons relevé les quelques valeurs suivantes : la technique de Laurell, utilisée en routine au Centre de Transfusion de Bordeaux possède un CV de 6 à 8 % (136), WINSNES (170) mentionne, qu'au cours d'essais répétés en électroimmunodiffusion et test de neutralisation de la toxine, les résultats varient de plus ou moins 33 % ce qui nous paraît exagérément élevé, enfin STIFFLER-ROSENBERG (147) obtient avec une technique immunoenzymatique indirecte un CV de 10 à 12 %, ce qui coïncide à peu près avec nos propres résultats.

Différents facteurs d'erreurs et donc de variation sont impliqués. Nous pouvons invoquer, en premier lieu, le support plastique : il existe des variations d'adsorption des protéines dans différentes parties des plaques de microtitration, ce phénomène connu est aussi appelé effet de bord ; de plus, des écarts thermiques inter-puits pendant les périodes d'incubation ont été récemment démontrés par BURT (36). Nous avons utilisé des plaques spécialement traitées (M 129 B) pour éliminer l'effet de bord mais le facteur thermique a pu intervenir d'autant que les temps d'incubation courts adoptés ne permettent pas d'atteindre un équilibre de température. La qualité optique du plastique est également importante dans le cas d'une lecture spectrophotométrique automatisée : la mesure se faisant à travers le fond des godets en plastique, toute rayure ou défaut de la plaque interfère dans le résultat.

Un facteur primordial réside, dans les dilutions d'anatoxine et des échantillons. Pour la méthode sandwich, les conditions de travail optimales étant réunies, cette source d'erreur n'est intervenue que pour les échantillons

TABLEAU VII

ETUDE DE REPRODUCTIBILITE DES TECHNIQUES D'ELECTRO-
IMMUNODIFFUSION ET IMMUNOENZYMATIQUES

Technique	nombre de dosages	\bar{M} en UI/ml	σ \pm	CV intra essai	CV inter essai
neutralisation de la toxine chez la souris	4	5,25	$\pm 0,96$		18,24 %
E.I.D	18	4,33	$\pm 0,49$		11,2 %
E.I.A. sandwich	13	4,11	$\pm 0,33$	8,1 %	
	26	4,06	$\pm 0,35$		8,62 %
E.I.A. indirecte	16	4,26	$\pm 0,46$	10,72 %	
	28	4,34	$\pm 0,55$		12,66 %



ayant un taux d'anticorps antitétaniques supérieur à 20 UI/ml et devant donc être dilués ; le coefficient de corrélation avec l'électroimmunodiffusion montre que cet élément n'a pas joué dans les résultats. Par contre, le choix des dilutions d'anatoxine et des échantillons (1:32, 1:10), qui nous avait paru le plus adapté pour la technique EIA indirecte, s'est montré, à long terme, peu judicieux. La nécessité de reprendre les échantillons titrant plus de 7 UI/ml, afin d'obtenir une meilleure précision dans le dosage entraîne un risque d'erreur important .

Le dernier point susceptible d'intervenir dans les variations se situe au niveau de la révélation de l'enzyme fixé. Le temps d'incubation du substrat est très court (de l'ordre de 2 minutes) ; ceci a été adopté dans l'optique de rapidité de la technique mais il est évident que, dans ces conditions, le moindre décalage dans l'arrêt de la réaction entraîne des variations de densité optique importantes.

Un palliatif pourra peut-être être trouvé dans l'utilisation d'une concentration de substrat telle que la coloration apparaisse un peu moins rapidement, tout en respectant les impératifs horaires, pour permettre d'assurer un temps de réaction avec l'enzyme égal dans tous les godets d'une plaque. L'automatisation de cette étape peut également être envisagée dans ce même but.

Nous avons disposé d'un appareil de lecture de D.O. automatique MULTISKAN (FLOW LABO) qui, par l'utilisation de faisceaux optiques verticaux, permet la mesure de la densité optique du contenu de 8 cupules à la fois à travers le plastique de la plaque : ceci autorise plusieurs lectures d'une même plaque puisque'il n'y a pas de prélèvement de l'échantillon.

Nous avons constaté ainsi qu'il était possible de retarder la mesure de D.O. des plaques après révélation enzymatique, en stockant celles-ci à 4°C et à l'obscurité, cependant, on observe une perte de sensibilité pour les faibles concentrations d'Ac AT par augmentation de la "coloration de fond" à la suite de la dégradation spontanée du substrat.

4°) Conclusion

Au stade de l'application des 2 variantes immunoenzymatiques que nous avons mises au point, la technique indirecte s'est avérée mal adaptée au dépistage et au dosage des Ac AT. Il semble que le choix des paramètres de la réaction n'ait pas été judicieux : une étude ultérieure pourrait nous permettre de corriger le protocole de la technique. De plus, la spécificité de la technique indirecte nous paraît inférieure à celle de la méthode immunoenzymatique "sandwich". Cette dernière répond à la plupart des critères nécessaires pour être utilisée dans un dépistage de masse des Ac AT, l'automatisation pouvant éventuellement entraîner l'amélioration de la reproductibilité de la méthode.

CONCLUSIONS GENERALES

Le but de notre travail a été de mettre au point une technique de dépistage et dosage des anticorps antitétaniques de taux égal ou supérieur à 4 UI/ml en vue de la préparation d'immunoglobulines humaines spécifiques.

Diverses méthodes immunologiques sont couramment employées cependant, la plupart ont pour inconvénient majeur un manque d'objectivité dans l'interprétation des résultats outre des temps de réaction longs ou une mise en oeuvre délicate.

Nous avons donc étudié deux variantes de la technique immuno-enzymatique, indirecte ou sandwich, pour les anticorps antitétaniques.

La méthode indirecte nécessite une étude plus approfondie. En effet, deux possibilités s'offraient à nous pour le choix des conditions optimales de réalisation de la technique

anatoxine diluée au 1:32,	sérum au 1:10
ou	//
	//
	1:64
	//
	1:15

nous avons opté pour le premier cas qui s'est révélé inadéquat.

La technique sandwich, pour laquelle nous avons préparé au laboratoire un conjugué anatoxine tétanique-péroxydase de raifort, satisfait pleinement aux critères imposés. Elle permet d'obtenir, au cours même du dépistage, le dosage des anticorps antitétaniques, jusqu'à 20 UI/ml, que l'on peut ainsi classer selon leur titre. Les courbes obtenues sont caractérisées par une pente forte qui permet la détermination précise et sensible du taux des anticorps. La reproductibilité évaluée à 8 % et le délai de 1 heure pour l'obtention des résultats sont tout à fait compatibles avec un dépistage de masse. Dans un tel contexte cette méthode peut se prêter à l'automatisation dans la mesure où l'on dispose d'appareils de lavage et de répartition des réactifs.

Les essais ont été réalisés, pour les deux méthodes avec de l'anatoxine fraîche ou recyclée fixée sur le godet plastique sans que les résultats en soient affectés.

Les techniques immunoenzymatiques précédemment décrites pour le dosage des anticorps antitétaniques (71, 135, 147, 159, 161, 162) présentent certains inconvénients. Le délai d'obtention des résultats varie entre 3 heures (71) et 48 heures (147). La technique classique d'adsorption à pH 9,6

des protéines sur des supports en plastique (41, 42) aboutit à un rendement de fixation faible ce qui implique la nécessité d'étudier les échantillons à doser à des dilutions importantes - 1:200 en général - pour éviter les effets de zone - L'adsorption de l'anatoxine par séchage à 37° C, que nous avons préconisée, améliore nettement le rendement de fixation, permettant ainsi de réduire les différents temps d'incubation et doser les anticorps antitétaniques sur des dilutions peu importantes - 1:10 pour la technique indirecte - voire sur sérum pur pour la variante "sandwich". Un bon rendement est également obtenu lors de la fixation de l'anatoxine sur du Sépharose 4B (135) cependant cette technique nécessite de nombreuses centrifugations au cours des étapes de lavage, rendant son application à un dépistage en grande série difficilement réalisable. Pour la technique indirecte, nous avons employé un conjugué préparé par l'Institut Pasteur ; par contre, nous avons réalisé le couplage de l'anatoxine tétanique avec la peroxydase selon la méthode d'AVRAMEAS (13) plus simple et plus rapide que le mode de conjugaison préconisé par NAKANE et KAWAOI (108), employé par HABERMANN (71). Le conjugué obtenu n'a subi aucune étape de purification mais son activité ne semble pas en être affectée ; cependant cette amélioration de la qualité du conjugué peut être envisagée à condition que le prix de revient du réactif n'en soit pas exagérément augmenté.

Entre nos mains, la technique immunoenzymatique dite "sandwich" semble posséder une spécificité supérieure à celle de la technique indirecte mettant en jeu un conjugué anti IgG humaines-enzyme (147, 159, 162). En effet, celui-ci est susceptible de révéler outre les IgG fixées spécifiquement, les IgG sériques adsorbées de manière aspécifique sur le support solide, alors que le conjugué anatoxine-enzyme met en évidence uniquement les anticorps spécifiques.

En ce qui concerne la technique sandwich, il ressort que nous pouvons titrer les anticorps antitétaniques objectivement par rapport à une gamme étalon sans diluer les échantillons et ce jusqu'à 20 UI/ml tandis que l'EID (55), l'hémagglutination (20, 51, 111) et la neutralisation de la toxine chez la souris, nécessitent de nombreuses dilutions. Cette dernière méthode toutefois est la technique de référence car elle seule permet de doser l'activité biologique in vivo des anticorps antitétaniques.

La technique de Laurell, quant à elle, ne présente un effet de zone qu'au delà de 30 UI/ml par contre, elle nécessite un délai de 24 heures pour l'obtention d'un résultat.

La reproductibilité de l'EIA sandwich est meilleure que celle de l'EID pour un temps de réaction équivalent. Par ailleurs, l'EIA permet une détermination immédiate du titre des anticorps antitétaniques. Les coefficients de variation de l'EIA indirecte et de l'EID sont à peu près équivalents.

Le prix de revient des réactifs des techniques immunoenzymatiques que nous avons mises au point est de l'ordre de 0 F 40 par sérum. La technique d'EID employée au laboratoire revient environ à 0 F 20 par sérum. Des réactifs commercialisés coûtent, pour le Laurell 0 F 50 par sérum et pour l'hémagglutination 1 F.

Des améliorations sont encore nécessaires. En ce qui concerne la méthode indirecte en particulier les conditions optimales de réaction doivent être revues. Pour la technique sandwich, la purification du conjugué peut être envisagée. Dans l'exposé des résultats, nous avons évoqué l'influence de la concentration du substrat, il nous semble important de poursuivre une étude dans cette voie. Enfin, l'automatisation nous paraît capitale car elle permettra d'améliorer la reproductibilité des techniques mais également parce que les temps d'incubation courts employés dans nos protocoles ne permettent pas à la réaction d'atteindre l'équilibre et que ces délais d'incubation tant avec le sérum qu'avec le conjugué ou le substrat doivent être rigoureusement minutés.

BIBLIOGRAPHIE

=====

- 1 - ACHARD J., ALQUIER P., BONHOMME R.,
Le concours médical 1970 92, 9327

- 2 - ALEXANDER J.W., MONGRIEFF J.A.,
Meeting An Coll Surg, Surg Forum 1966 287

- 3 - ALEXANDER J.W., MONGRIEFF J.A.,
J Trauma 1967 7, 288

- 4 - ARENDS J.,
J Immunol Methods 1979 25, 171

- 5 - ASO C., AITO Y.,
Makromol chem 1962 58, 195

- 6 - AVRAMEAS S.,
Bull Soc chim Biol 1968 50, 1169

- 7 - AVRAMEAS S.,
Immunochemistry 1969 6, 43

- 8 - AVRAMEAS S.,
Immunochemistry 1969 6, 825

- 9 - AVRAMEAS S., GUILBERT B.,
Europ J Immunol 1971 1, 394

- 10 - AVRAMEAS S., GUILBERT B.,
C.R. Acad Sci 1971 273, 2705

- 11 - AVRAMEAS S., LESPINATS G.,
C.R. Acad Sci Paris 1967 265, 1149

- 12 - AVRAMEAS S., TERNYNCK T.,
Immunochemistry 1969 6, 53

- 13 - AVRAMEAS S., TERNYNCK T.,
Immunochemistry 1971 8, 1175
- 14 - AVRAMEAS S., URIEL J.,
C.R. Acad Sci (Paris) 1966 262, 2543
- 15 - AXEN R., PORATH J., ERNBACK S.,
Nature 1967 214, 1302
- 16 - BASTIANI R.,
Proceedings of 2nd R.S. First Symposium on immunoassays
Karger Basel 1978
- 17 - BEHRING E.,KITASATO S.,
Deutsch Med Wochenschr 1890 16, 1113
- 18 - BELANGER L., HAMEL D., DUFOUR D., POULIOT M.,
Clin chem 1976 22, 198
- 19 - BELANGER L., SYLVESTRE L., DUFOUR D.,
Clin chim Acta 1973 48, 15
- 20 - BENAMON D., GARRETA M., MULLER A.,
Revue Française de Transfusion et immunohématologie
1977 XX 3, 467
- 21 - BERNATH S., HABERMANN E.,
Med Microbiol immunol 1974 160, 47
- 22 - BERENBAUM M.D.,
Immunology 1959 2, 71
- 23 - BIZZINI B.,
Thèse université de Paris 1969 n° 311
- 24 - BIZZINI B.,
La clinique 1973 67, 707,609

- 25 - BIZZINI B., BLASS J., TURPIN A., RAYNAUD M.,
Eur. J Biochem 1970 17, 100
- 26 - BIZZINI B., TURPIN A., RAYNAUD M.,
Ann Inst Pasteur 1971 120, 791
- 27 - BLASS J., BIZZINI B., RAYNAUD M.,
Bull Soc chim France 1967 19, 3957
- 28 - BOENISCH T.,
Protides of Biological Fluids 1976 24, 743
- 29 - BONY D., FAVAREL-GARRIGUES J.C., CARDINAUD J.P., DEMARQUEZ J.L.,
Bordeaux Médical 1973 17, 2791
- 30 - BOORSMA D.M., KALSBECK G.L.,
J Histochem Cytochem 1975 23, 200
- 31 - BOORSMA D.M., STREEFKERK J.G.,
J Histochem cytochem 1976 168, 341
- 32 - BOUT D., DUGIMONT J.C., FARAG H., CAPRON A.,
1st international Symposium on immunoenzymatic techniques INSERM
symposium n°2 edited by FELDMANN et al 1976 p 175
- 33 - BOWES J.H., CATER C.W.,
Biochem Biophys Acta 1965 168, 341
- 34 - BROOKS V.B., CURTIS D.R., ECCLES J.C.,
J Physiol 1957 135, 655
- 35 - BULLOCK S.L., WALLS K.W.,
J infectious diseases 1977 136 suppt S 279
- 36 - BURT S.M., CARTER T.J.N., KRICKA L.J.,
J Immunol Methods 1979 31, 231
- 37 - CAMPBELL D.H., WELIKY N.,
In Methods in immunology and immunochemistry eds C.A. WILLIAMS and
M.W. chase (Academic Press, New York, London) 1967 1, 378

- 38 - CARLSSON H.E., LINDBERG A.A., HAMMARSTROM S.,
Infection and Immunity 1972 6, 703

- 39 - CASTRO A., MONJI N.,
Experientia 1979 35, 568

- 40 - CASTRO A., WU M., ROSENTHAL C., CLEARY T., NUNSCH C., MALKUS H.,
Research communications in chemical pathology and pharmacology
1977 16, 199

- 41 - CATT K., NIAL H., TREGGAR G.W.,
Nature 1967 213, 825

- 42 - CATT K., TREGGAR G.W.,
Science 1967 158, 1570

- 43 - CHRISTENSEN P., JOHANSSON A., NIELSEN V.,
J Immunol Methods 1978 23, 23

- 44 - COHN E.J., GURD F.R.N., SURGENDR D.M., BARNES B.A., BROWN R.K.,
DEROUAUX G., GILLESPIE J.M., KAHNT F.W., LEVER W.F., LIN C.H.,
MITTELMANN D., MOUTON R.F., SCHMID K., UROMA E.,
J Am chim Soc 1950 72, 465

- 45 - COONS A.H., KAPLAN M.H.,
J exp Med 1950 91, 1

- 46 - CUATRECASAS P., WILCHER M., ANFINSEN C.B.,
Biochem 1968 61, 636

- 47 - DE SAINT MARTIN J., EYQUEM A., TURPIN A., BIZZINI B.,
Feuillets de Biologie 1974 XV, 80

- 48 - DEATON D.C., MAXWELL K.W., SMITH R.S., CREVELING R.L.,
Clin chem 1976 22, 1465

- 49 - DEATON D.C., MAXWELL K.W., SMITH R.S., CREVELING R.L.,
VIII Annual Symposium on advanced analytical concepts for the
clinical Laboratory, Oak Ridge, Tennessee 1976

- 50 - DROUET J., GRANIER C., STEINBUCH M., AMOUCHE P.,
Société National de Transfusion Sanguine
23-24 novembre 1978, Toulouse
- 51 - DUVILLERS-MONTREUIL M., GOUEMAND M.,
Revue Française de Transfusion et d'Immunohématologie 1977 XX, 315
- 52 - ENGVALL E.,
Lancet 1976 2, 1410
- 53 - ENGVALL E., PERLMANN P.,
Immunochemistry 1971 8, 871
- 54 - ENGVALL E., PERLMANN P.,
J Immunol 1972 109, 129
- 55 - ENTWISTLE C.C., ELDRIDGE P.L.,
Vox Sang 1973 25, 240
- 56 - FABER K.,
Berlin Kein wochenschr 1890 27, 717
- 57 - FERRUA B., MAIOLINI R., MASSEYEFF R.,
J Immunol methods 1979 25, 49
- 58 - FRIGERIO N.A., SHAW M.J.,
J Histochem cytochem 1968 17, 176
- 59 - FRIGERIO N.A., SHAW M.J.,
J Histochem cytochem 1969 17, 176
- 60 - FRUCHART J.C., DESREUMAUX C., DEWAILLY P., SEZILLE G., JAILLARD J.,
CARLIER Y., BOUT D., CAPRON A.,
Clin chem 1978 24, 455
- 61 - GIBBONS I., SKOLD C., ROWLEY G.L., ULLMAN E.F.,
Clin chem 1979 25, 1923 Abstract
- 62 - GOUEMAND M., MARTINACHE L.,
La Gazette de la Transfusion 1977 1ère année N°2
(Bulletin d'information de l'ADTS)

- 63 - GOULON M., GIRARD O., GROSBUI S., DESORMEAU J.P., CAPPONI M.F.,
Nouvelle Presse Médicale 1972 45, 3049

- 64 - GOULON M., GROSBUI S.,
Encycl Med chir Paris Maladies infectieuses 1974 1, 8038

- 65 - GRAHAM R.C., KARNOVSKY M.J.,
J Histochem Cytochem 1966 14, 291

- 66 - GRAY B.M.,
J Immunol Methods 1979 28, 187

- 67 - GREENWOOD F.C., HUNTER W.M., GLOVER J.S.,
Biochem J 1963 89, 114

- 68 - GRIPENBERG M., LINDER E., KURPI P., ENGVALL E.,
Scand J Immunol 1978 7, 151

- 69 - GUESDON J.L., AVRAMEAS S.,
J Immunol methods 1976 11, 129

- 70 - GUESDON J.L., DAVID B., LAPEYRE J.,
Ann Immunol 1977 128, 799

- 71 - HABERMANN E., HELLER I.,
Protides of biological Fluids 1976 24, 825

- 72 - HABERMANN E., WIEGAND H.,
Naunyn-Schmiedebergs Arch pharmacol 1973 276, 321

- 73 - HAMAGUCHI Y., KATO K., FUKUI H., SHIRAKAWA I., OKAWA S., ISHIKAWA E.,
KOBAYASHI K., KATUNUMA N.,
Eur J Biochem 1976 71, 459

- 74 - HAMAGUCHI Y., KATO K., ISHIKAWA E., KOBAYASHI K., KATUNUMA N.,
Febs letters 1976 69, 11

- 75 - HAMMARSTROM J., ENGVALL E., SUNBLAD G., GOLDSTEIN I.J., JOHANSEN B.G.,
SVENSSON S.,
Proc Nat Acad Sci 1975 72, 1528

- 76 - HERRMAN J.E., COLLINS M.F.,
J Immunol Methods 1976 10, 363

- 77 - HERNANDEZ R., JUST M., BURGİN-WOLFF A.,
Z Immun Forsch 1973 145, 376

- 78 - HERZOG F., GAIFFE M.,
IX° congrès national de Transfusion Sanguine 1973 Nancy

- 79 - HERZOG F., GAIFFE M., TURPIN A., BIZZINI B.,
Nouvelle Presse Médicale 1972 14, 935

- 80 - JOUJA V.,
Folia microbiol Praha 1965 10, 341

- 81 - KABAT E.A.,
National research-council 26 oct 1962

- 82 - KALIMO K.O.K., MEURMAN O.H., MÄKI J., VAINIONPÄÄ R., KALIMO H.,
J immunol Methods 1975 19, 331

- 83 - KATO K., FUJUI H., HAMAGUCHI Y., ISHIKAWA E.,
J Immunol 1976 116, 1554

- 84 - KATO K., HAMAGUCHI Y., FUKUI H., ISHIKAWA E.,
Febs letters 1975 56, 370

- 85 - KATO K., HAMAGUCHI Y., FUKUI H., ISHIKAWA E.,
Eur J Biochem 1976 62, 285

- 86 - KATO K., HAMAGUCHI Y., OKAWA S., ISHIKAWA E., KOBAYASHI K.,
KATUNUMA N.,
J Biochem 1977 81, 1557

- 87 - KING T.P., LI Y., KOCHOUMIAN L.,
Biochemistry 1978 17, 1499

- 88 - KITASATO S.,
Zeitchr F.hyg 1889 6, 105

- 89 - KNEZ V., REIMER C.B.,
J Immunol Methods 1977 18, 105

- 90 - KORN A., FEAIRHELLER S., FILACHIONE E.,
J Mol Biol 1972 65, 525

- 91 - LAURELL C.B.,
Analyt Biochem 1966 15, 45

- 92 - LEINIKKI P., PASSILA S.,
J infect Dis 1977 36 suppl S 294

- 93 - LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L., RANDALL R.H.,
J biological chemistry 1951 193, 265

- 94 - MAIOLINI R., MASSEYEF R.,
J Immunol Methods 1975 8, 223

- 95 - MAIOLINI R., FERRUA B., MASSEYEF R.,
J Immunol Methods 1975 6, 335

- 96 - MANCINI G., CARBONARA A.O., HEREMANS J.F.,
Immunochemistry 1965 2, 235

- 97 - MARTIN-BOUYER G., GRAVILLON S.,
Santé Sécurité Sociale Statistiques et commentaires 1975 n° 6

- 98 - MASSEYEF R., MAIOLINI R., BOURON Y.,
Biomedecine 1973 19, 314

- 99 - MATHIESEN L., FEINSTONE S.M., WONG D.C., SKINHOEJ R., PRUCELL R.H.,
J clin Microbiol 1978 7, 184

- 100 - MESNIER F., PIQUET Y.,
Bull Soc Pharm Bordeaux 1977 116

- 101 - MEYERSEN K., SCHULZ R.C., KERN W.,
Makromol chem 1962 58, 204

- 102 - MILES L., HALES C.,
Nature 1968 219, 186

- 103 - MONGET D.,
Ann biol clin 1978 36, 527

- 104 - MONTREUIL M., DUPRESSOIR M.V., GOUEMAND M.,
Société Nationale de Transfusion Sanguine 23-24 novembre 1978 Toulouse

- 105 - MONTREUIL M., DUPRESSOIR M.V., GOUEMAND M.,
XI° congrès national de Transfusion Sanguine 25-29 juin 1979 Strasbourg

- 106 - MORRISEY B.W., HAN C.C.,
J Colloid and interface Science 1978 3, 423

- 107 - NAKANE P.K.,
J Histochem Cytochem 1968 16, 557

- 108 - NAKANE P., KAWAOI A.,
J Histochem cytochem 1974 22, 1084

- 109 - NAKANE P.K., PIERCE G.B.,
J Histochem Cytochem 1966 14, 929

- 110 - NAKANE P.K., PIERCE G.B.,
J cell Biol 1967 33, 307

- 111 - NELSON M.,
Vox Sanguinis 1973 25, 457

- 112 - NETTER R.,
Communication du protocole du laboratoire de contrôle du Ministère
de la Santé 1974

- 113 - NICOLAIER A.,
Deutsch Med Wochenschr 1884 10, 842

- 114 - ORNSTEIN L.,
J Histochem Cytochem 1966 14, 790

- 115 - OTTENI J.C., HERAN J.,
Le tétanos table ronde, Strasbourg
L'expansion scientifique française 29-30 mai 1969

- 116 - PARK H.,
J Immunol methods 1978 20, 349

- 117 - PEPE F.A.,
J Biophys Biochem cytol 1961 11, 512

- 118 - PESCE A.J., FORD D.J., GAIZUTIS M.A., POLLACK V.E.,
Biochem Biophys Acta 1977 492, 399

- 119 - PESCE A.J., MENDOZA N., BOREISHA I., GAIZUTIS M.A., POLLACK V.E.,
Clin chem 1974 20, 353

- 120 - PILLAI S., BACHHAWAT B.K.,
Febs letters 1978 90, 51

- 121 - PIQUET Y., MESNIER F., LARCEBAU-ARGILAS S., SANCHEZ D.,
Bulletin Société Pharmacie de Bordeaux 1977 116

- 122 - PORATH J., ASPBERG K., DREVIN H., AXEN R.,
J chromat. 1973 86, 53

- 123 - PORTER R.R.,
Biochem J 1959 73, 119

- 124 - PREVOT A.R., BOORSMA H.J.,
Ann Inst Pasteur 1939 63, 600

- 125 - RAMON G.,
C.R. Acad Sci (Paris) 1923 177, 1338

- 126 - RAYNAUD M.,
C.R. Acad Sci (Paris) 1947 225, 543

- 127 - RAYNAUD M., RELYVELD E.H., TURPIN A., MANGALO R.,
Ann Inst Pasteur 1959 96, 60

- 128 - REGAMEY R.H.,
Praxis 1955 44, 268

- 129 - RICHARD F.M., KNOWLES J.R.,
J Mol Biol 1968 37, 231

- 130 - RITCHIE R.F.,
Lab Management 1975 13, 32

- 131 - ROBBINS J.B., HAIMOVICH J., SELA M.,
Immunochemistry 1967 4, 11

- 132 - ROTHFUS J.A., SMITH E.L.,
J Biol chem 1963 238, 1402

- 133 - ROUX E., VAILLARD.,
Ann Inst Pasteur 1893 7, 65

- 134 - RUBINSTEIN K.E., SCHNEIDER R.S., ULLMAN E.F.,
Biochem Biophys Res. Comm. 1972 47, 846

- 135 - SANCHEZ-VIEUILLE D.,
Thèse doctorat d'état pharmacie Bordeaux 1977 N°10 p 78

- 136 - SANCHEZ-VIEUILLE D.,
Thèse doctorat d'état pharmacie Bordeaux 1977 N°10 p 82

- 137 - SANCHEZ-VIEUILLE D.,
Thèse doctorat d'état pharmacie Bordeaux 1977 N°10 p 89

- 138 - SANGER F.,
Biochem J 1945 39, 507

- 139 - SAUDERS G.C.,
Ann J vet Res 1977 38, 21

- 140 - SERGENT L.,
Université de Paris VI
Faculté de BROUSSAIS Hotel Dieu thèse 1974 N° 193

- 141 - SINGER S.,
Nature 1959 183, 1523

- 142 - SMITH R.S. et al.,
III° International colloquium at Pont à Mousson (Editeur G.Siest)
Expansion Scientifique Française 1975

- 143 - SOHL-AKERLUND A., HANSON L.A., AHLSTEDT S., CARLSSON B.,
Scand J Immunol 1977 6, 1275

- 144 - STERNBERGER L.A., CUCULIS J.J.,
J Histochem cytochem 1969 17, 190

- 145 - STERNBERGER L.A., HARDY P.H., CUCULIS J.J., MEYER H.G.,
J Histochem cytochem 18, 315

- 146 - STIFFLER-ROSENBERG G., FEY H.,
Schweiz med Wschr 1975 105, 804

- 147 - STIFFLER-ROSENBERG G., FEY H.,
Schweiz med Wschr 1977 107, 1101

- 148 - STRAUS W.,
J Histochem cytochem 1964 12, 470

- 149 - STREEFKERK J.G., DEELDER A.M.,
J Immunol Methods 1975 7, 225

- 150 - TURPIN A., BIZZINI B.,
Réunion plenière des Directeurs des Postes et Centres de Transfusion
Sanguine 22 Nov 1973

- 151 - TURPIN A., BIZZINI B., RAYNAUD M.,
Ann Inst Pasteur 1971 120, 801

- 152 - TURPIN A., RAYNAUD M.,
Ann Inst Pasteur 1959 97, 718

- 153 - VAN WEEMEN B.K., SCHUURS A.H.W.M.,
Febs letters 1972 24, 72

- 154 - VAN WEEMEN B.K., SCHUURS A.H.W.M.,
Febs letters 1971 24, 72
- 155 - VAN WEEMEN B.K., SCHUURS A.H.W.M.,
J Immunology 1972 109 : 129
- 156 - VAN WEEMEN B.K., SCHUURS A.H.W.M.,
Febs letters 1974 43, 215
- 157 - VAN WEEMEN B.K., SCHUURS A.H.W.M.,
Clinica chimica acta 1977 81, 1
- 158 - VOLLER A., BIDWELL D.E., BARLETT A.,
Bull Wld. Hlth. Org 1974 51, 209
- 159 - VOLLER A., BIDWELL D.E., BARLETT A.,
Protides of biological Fluids 1976 24, 751
- 160 - VOLLER A., BICWELL D.E., BARTLETT A.,
The E.L.I.S.A. Flowline publication (Guernsey) 1977 p 13
- 161 - VOLLER A., BIDWELL D.E., BARTLETT A.,
The E.L.I.S.A. Flowline publication (Guernsey) 1977 p 24
- 162 - VOS J.G., BUYS J., HANSTED E. J., HAGENNAARS A.M.,
Infection and immunity 1979 24, 798
- 163 - WEI R., KNIGHT G.J., ZIMMERMAN D.H., BOND H.E.,
Clin chem 1977 23, 813
- 164 - WELINDER K.G., SMILLIE L.B., SCHONBAUM G.R.,
Can J Biochem 1972 50, 44
- 165 - WESTON P.D., AVRAMEAS S.,
Biochem Biophys Res Comm 1971 45, 1574
- 166 - WIDE L.,
Acta Endocrinol Suppl 1970 142, 207

- 167 - WIDE L.,
In Radioimmunoassay methods K.E. KIRKHAM et W.HUNTER ed.
(Churchill Livingstone, Edinburg)
1971 p 405

- 168 - WIDE L., AXEN R., PORATH J.,
Immunochemistry 1967 4, 381

- 169 - WILSON M.B., NAKANE P.K.,
J Immunol Methods 1976 12, 171

- 170 - WINSNES R.,
Acta Pathologica et microbiologica scandinavia
section B 1979 87, 191

- 171 - WOLTER S., KUIJPERS L., KACAKI J., SCHUURS A.H.W.M.,
J Clin Path 1976 29, 873

- 172 - YALOW R.S., BERSON S.A.,
Nature 1959 184, 1648

- 173 - YORDE.D.E., SASSE E.A., WANG T.Y., HUSSA R.O., GARNINCIS J.C.
Clin Chem 1976 22, 1372

APPENDICE

Nous avons rassemblé ici, dans une liste non limitative, quelques exemples de dosages ou mises en évidence réalisés par méthodes immunoenzymatiques.

ENDOCRINOLOGIE

Gonadotrophine chorionique humaine (HCG)	1971	VAN WEEMEN et SCHUURS	(128)
	1972	" "	(129)
	1974	" "	(130)
	1974	VAN WEEMEN	(127)
	1976	VAN WEEMEN et SCHUURS	(131)
	1974	STIMSON et SINCLAIR	(119)
	1976	YORDE et <u>al.</u>	(163)
Hormone lutéinisante (LH)	1972	VAN WEEMEN et SCHUURS	(129)
	1974	VAN WEEMEN	(127)
	1976	VAN WEEMEN et SCHUURS	(131)
Oestrogènes	1976	VAN WEEMEN et SCHUURS	(131)
	1974	VAN WEEMEN	(127)
Lactogène placentaire	1975	BOSCH et <u>al.</u>	(16)
	1976	VAN HELL et <u>al.</u>	(126)
	1976	BARBOUR et <u>al.</u>	(7)
	1976	SADEH et <u>al.</u>	(111)
Insuline	1972	MIEDEMA et <u>al.</u>	(93)
	1973	ISHIKAWA	(67)
	1975	KATO et <u>al.</u>	(74)
	1976	KITAGAWA et AIKAWA	(77)
Hormone de stimulation de la thyroïde (TSH)	1976	MIYAI et <u>al.</u>	(96)
Thyroxine	1975	ULLMAN et <u>al.</u>	(123)
Progésterone	1975	DRAY et <u>al.</u>	(29)
	1976	GROS et <u>al.</u>	(51)
Oestriol	1975	BOSCH et <u>al.</u>	(16)
	1976	VAN HELL et <u>al.</u>	(126)
	1977	JOYCE et <u>al.</u>	(69)
Cortisol	1976	COMOGLIO et CELADA	(27)
	1977	OGIHARA et <u>al.</u>	(98)

PROTEINES SERIQUES

IgG	1971	AVRAMEAS et GUILBERT	(6)
	1971	ENGVALL et PERLMANN	(37)
	1971	ENGVALL et <u>al.</u>	(35)
	1972	ENGVALL et PERLMANN	(38)
	1975	KATO et <u>al.</u>	(73)
	1976	KATO et <u>al.</u>	(72)
	1977	GUESDON et <u>al.</u>	(52)
IgA sécrétoires	1977	SOHL-AKERLUND et <u>al.</u>	(117)
Ig E	1973	HOFFMAN	(61)
	1976	WELTMAN et <u>al.</u>	(155)
Complexes immuns	1976	AHLSTEDT et <u>al.</u>	(2)
	1977	CASALI et <u>al.</u>	(22)
	1979	RODA et <u>al.</u>	(105)
Immunoconglutinines	1978	HAUTANEN et <u>al.</u>	(57)
Facteur rhumatoïde	1978	MAIOLINI et <u>al.</u>	(87)
Ferritine	1976	BOENISCH	(13)
	1979	WATANABE	(153)
- 2 haptoglobine	1972	MIEDEMA et <u>al.</u>	(93)
	1974	FUCCARO-DECAENES et <u>al.</u>	(42)
Apolipoprotéine B	1978	FRUCHART et <u>al.</u>	(41)
Ac anti-DNA	1974	PESCE et <u>al.</u>	(100)
	1976	ENGVALL	(32)
	1978	GRIPENBERG	(50)
	1979	VLADUTIU et <u>al.</u>	(135)
	1979	KLOTZ et <u>al.</u>	(78)
Ac anti-adénosine	1974	LAUER et ERLANGER	(80)
Ac anti actine	1979	CHARLEMAGNE et <u>al.</u>	(25)
Venin de serpent et anticorps anti-venin	1977	THEAKSTON et <u>al.</u>	(120)

PROTEINES ONCOFOETALES -

α-foetoprotéine	1973	BELANGER et <u>al.</u>	(10)
	1973	MASSEYEFF et <u>al.</u>	(89)
	1975	MAIOLINI et MASSEYEFF	(88)
	1975	MAIOLINI et <u>al.</u>	(86)
	1976	BELANGER et <u>al.</u>	(9)
	1976	MASSEYEFF et <u>al.</u>	(90)
	1976	HEVEY et <u>al.</u>	(60)
Antigène carcinoembryonnaire	1977	KIRKPATRICK et <u>al.</u>	(76)
	1975	HAMMARSTROM et <u>al.</u>	(56)
	1975	ENGVALL et PERLMANN	(39)
	1976	ENGVALL et CARLSON	(34)
	1977	ENGVALL	(33)

HEMATOLOGIE

Ac anti Ag érythrocytaire	1974	HOLM et <u>al.</u>	(62)
Facteur VIII	1976	BARTLETT et <u>al.</u>	(8)
	1977	MAZURIER et <u>al.</u>	(92)
Fibrinogène	1976	VOLLER et <u>al.</u>	(142)
Ag HBs	1976	WOLTERS et <u>al.</u>	(157)
	1977	WOLTERS et <u>al.</u>	(158)
	1977	CASTRO et <u>al.</u>	(24)
	1977	HALBERT et <u>al.</u>	(54)
	1977	WEI et <u>al.</u>	(154)
	1977	LANGE et <u>al.</u>	(79)
	1977	UKKONEN et <u>al.</u>	(124)
	1977	VANDERVELDE et <u>al.</u>	(125)
	1977	KACAKI et <u>al.</u>	(70)
1978	ADACHI et <u>al.</u>	(1)	

VIROLOGIE

§ Mise en évidence d'antigènes des agents infectieux

Ag HBs lié à l'hépatite B	cf. chapitre Hématologie	
Ag HA lié à l'hépatite A	1978 LOCARNINI et <u>al.</u>	(84)
	1978 MATHIESEN et <u>al.</u>	(91)
Virus herpès simplex	1977 MIRANDA et <u>al.</u>	(95)
	1978 MILLS et <u>al.</u>	(94)
Entérovirus	1979 HERRMAN et <u>al.</u>	(58)
Rhéovirus	1977 YOLKEN et <u>al.</u>	(161)
Rotavirus	1978 YOLKEN et <u>al.</u>	(159 , 160)
	1979 BIRCH et <u>al.</u>	(12)
Virus polyhédrique nucléaire	1978 KELLY et <u>al.</u>	(75)
Quelques virus végétaux	1976 VOLLER et <u>al.</u>	(138)
	1977 CLARK et ADAMS	(26)
	1978 GERA et <u>al.</u>	(43)

§ Mise en évidence d'anticorps contre les agents infectieux

Ac anti hépatite A	1978 MATHIESEN et <u>al.</u>	(91)
	1978 DUERMEYER et <u>al.</u>	(31)
	1978 DUERMEYER et VANDERDEEN	(30)
Ac anti herpès	1977 GILMAN et DOCHERTY	(45)
	1977 GRAUBALLE et VESTERGAARD	(47)
	1977 VESTERGAARD et <u>al.</u>	(134)
Ac anti rotavirus	1978 YOLKEN et <u>al.</u>	(162)
	1978 GHOSE et <u>al.</u>	(44)
Ac anti cytomégalo virus (CMV)	1976 VOLLER et <u>al.</u>	(140)
	1977 CASTELLANO et <u>al.</u>	(23)
	1977 SCHMITZ et <u>al.</u>	(114)
	1977 ANDERSON et ANDERSON	(4)
	1977 LEINIKKI et PASSILA	(82)
Ac anti virus d'EPSTEIN-BARR (EBV)	1976 VOLLER et <u>al.</u>	(141)
	1977 WALLEN et <u>al.</u>	(149)
Ac anti rubéole	1975 VOLLER et <u>al.</u>	(139)
	1976 VOLLER et <u>al.</u>	(140)
	1977 GRAVELL et <u>al.</u>	(48)
	1977 PREVOST et GUESDON	(101)
	1978 VEJTORP	(132)

VIROLOGIE (suite)

Ac anti rougeole	1976	VOLLER et <u>al.</u>	(140)
	1979	KAHANE et <u>al.</u>	(71)
Ac anti influenza et anti oreillons	1976	LEINIKKI et PASSILA	(81)
Ac anti arbovirus	1976	VOLLER et <u>al.</u>	(143)
Ac anti rage	1977	ATANASIU et <u>al.</u>	(5)
	1977	THRAENHART et KUWERT	(122)
Ac anti RS virus (respiratory syncitial)	1978	RICHARDSON et <u>al.</u>	(103)

BACTERIOLOGIE

§ Mise en évidence d'antigènes d'agents infectieux

Toxine de vibrio cholerae	1973	HOLMGREN et SVENNERHOLM	(63)
---------------------------	------	-------------------------	--------

§ Mise en évidence d'anticorps

Ac anti vibrio cholerae	1973	HOLMGREN et SVENNERHOLM	(63)
Ac anti salmonella	1972	CARLSONN et <u>al.</u>	(20)
	1975	CARLSONN et <u>al.</u>	(21)
Ac anti brucella et Ac anti yersinia	1976	CARLSONN et <u>al.</u>	(19)
Ac anti E. coli	1974	JODAL et <u>al.</u>	(68)
Ac anti streptocoque M	1976	RUSSEL et <u>al.</u>	(110)
Ac anti rickettsia quintena	1977	HALLE et <u>al.</u>	(55)
	1977	HERRMAN et <u>al.</u>	(59)
Ac anti mycobacteria	1976	NASSAU et <u>al.</u>	(97)
Ac anti tréponème	1973	VELDKAMP et VISSER	(133)
	1975	PATRAMANIS et <u>al.</u>	(99)
Ac anti syphilis	1976	VOLLER et <u>al.</u>	(143)
Ac anti gonorrhée (N.gonorrhoeae)	1978	GLYNN et ISON	(46)
Ac contre diverses bactéries	1974	AHLSTEDT et <u>al.</u>	(3)
	1974	SMITH et <u>al.</u>	(116)
Ac contre polysaccharides bactériens	1979	GRAY	(49)
Ac antitétaniques	1976	VOLLER et <u>al.</u>	(144)
	1976	HABERMANN et HELLER	(53)
	1977	VOLLER et <u>al.</u>	(145)
	1977	STIFFLER ROSENBERG et FEY	(118)

MYCOLOGIE

Aspergilloses	1976	HOMMEL et <u>al.</u>	(65)
Candidoses	1976	HOMMEL et <u>al.</u>	(64)
	1977	WARREN et <u>al.</u>	(151)
Ag fungiques	1979	WARREN et <u>al.</u>	(152)
Ag d'aspergillus fumigatus	1979	RICHARDSON et <u>al.</u>	(104)
Ac anti aspergillus fumigatus	1979	SEPULVEDA et <u>al.</u>	(115)

MALADIES PARASITAIRES

Parasitologie humaine

Malaria	1974	VOLLER et <u>al.</u>	(147)
	1975	VOLLER et <u>al.</u>	(148)
	1976	VOLLER et <u>al.</u>	(137)
Schistosomie	1975	HULDT et <u>al.</u>	(66)
	1976	BOUT et <u>al.</u>	(17)
	1977	DEELDER et <u>al.</u>	(28)
Trypanosomie	1975	VOLLER	(136)
	1975	VOLLER et <u>al.</u>	(142)
	1976	W.H.O.	(156)
	1977	RUITENBERG	(106)
Toxoplasmosse	1976	BOUT et <u>al.</u>	(17)
	1973	PATRAMANIS et <u>al.</u>	(99)
	1976	VOLLER et <u>al.</u>	(146)
	1977	BULLOCK et WALLS	(18)
	1977	WALLS et <u>al.</u>	(150)
Amibiose	1975	BOS et <u>al.</u>	(14,15)
Trichinose	1975	ENGVALL et LUNJSTROM	(36)
	1975	FARAG et <u>al.</u>	(40)
Hydatidose	1976	BOUT et <u>al.</u>	(17)
Onchocerciose	1975	VOLLER et <u>al.</u>	(142)
	1976	BOUT et <u>al.</u>	(17)
Leishmania	1976	HOMMEL	(64)
Parasitologie animale			
Brucellose	1979	THOEN	(121)

Parasitologie animale (suite)

Trichinose	1974	LUNJSTROM et <u>al.</u>	(83)
	1974	RUITENBERG et <u>al.</u>	(107)
	1975	RUITENBERG et <u>al.</u>	(108)
	1976	RUITENBERG et <u>al.</u>	(109)
Choléra du porc	1975	SAUNDERS	(112)
	1976	SAUNDERS	(113)
Mycobacterium paratuberculosis	1978	BERG, JORGUNSEN et <u>al.</u>	(11)
Trypanosomie	1977	LUCKINS	(85)
Babesia	1976	PURNELL et <u>al.</u>	(102)

BIBLIOGRAPHIE DU TABLEAU IMMUNOENZYMOLOGIE

- 1 - ADACHI H., FUKUDA T., FUNAHASHI S., KURAHORI T., ISHIKAWA E.,
Vox Sang 1978 35, 219

- 2 - AHLSTEDT S., HANSON L.A., WADSWORTH C., JATVIG J.B.,
Scand J Immunol 1976 5, 293

- 3 - AHLSTEDT S., HOLMGREN J., HANSON L.A.,
Int. Arch Allergy app Immunol 1974 46, 470

- 4 - ANDERSON H.K., ANDERSON P.,
Abstracts from the 5th Scandinavian virus symposium 1977 15

- 5 - ATANASIU P., SAVY V., PERRIN P.,
Ann Microbiol. Inst. Pasteur 1977 128 A, 489

- 6 - AVRAMEAS S., GUILBERT B.,
C.R. Acad. Sci. 1971 273, 2705

- 7 - BARBOUR H.M.,
J Immunol Methods 1976 11, 15

- 8 - BARTLETT A., DORMANDY K.M., HAWKEY C.M., STABLEFORTH P., VOLLER A.,
Brit. Med J 1976 1, 994

- 9 - BELANGER L., HAMEL D., DUFOUR D, POULIOT M.,
Clin chem 1976 22, 198

- 10 - BELANGER L., SYLVESTRE C., DUFOUR D.,
Clin chem Acta 1973 48, 15

- 11 - BERG-JORGUNSEN J., THODEJENSEN P.,
Acta Vet Scandinavica 1978 19, 310

- 12 - BIRCH C.J., LEIHMANN N.I., HANKER A.J., MARSHALL J.A., GUST I.D.,
J Clinical Pathology 1979 32, 700

- 13 - BOENISCH T.,
Protides of Biological Fluids 1976 24, 743
- 14 - BOS H.J., VAN DER EIJK A.A.,
Arch invest Med. (Mex.) 1975
- 15 - BOS H.J., VAN DER EIJK A.A., STEERENBERG P.A.,
Trans R. Soc trop Med Hyg 1975 69, 440
- 16 - BOSCH A.M.G., VAN HELL H., BRANDS J.A.M., VAN WEEMEN B.K., SCHUURS A.H.W.M.,
Cli. chem 1975 21, 1009
- 17 - BOUT D., DUGIMONT J.C., FARAG H., CAPRON A.,
1st International symposium on immunoenzymatic techniques INSERM symposium
n°2 edited by FELDMANN et al (north holland publishing Co, Amsterdam)
1976 2, 175
- 18 - BULLOCK S.L., WALLS K.W.,
J infect Dis 1977 136, supplt S 279
- 19 - CARLSSON H.E., HURVELL B., LINDBERG A.A.,
Acta Path. Microbiol Scand 1976 84, 168
- 20 - CARLSSON H.E., LINDBERG A.A., HAMMARSTROM S.,
Infect. and immunity 1972 6, 703
- 21 - CARLSSON H.E., LINDBERG A.A., HAMMARSTROM S., LJUNGGREN A.,
Int Arch. allergy and app immunology 1975 48, 485
- 22 - CASALI P., BOSSUS A., CARPENTIER N.A., LAMBERT P.H.,
Clin Exp Immunol 1977 29, 342
- 23 - CASTELLANO G.A., HAZZARD G.T., MADDEN D.L., SEVER J.L.,
J infect Dis 1977 136, supplt S 337
- 24 - CASTRO A., WU M., ROSENTHAL C., CLEARY T., WUNSCH C., MALKUS H.,
Research communications in chemical pathology and pharmacology 1977 16, 199

- 25 - CHARLEMAGNE D., SCHWARTZ K., BERNARD S., PARAF A.,
J Immunol methods 1979 29, 145

- 26 - CLARK M.F., ADAMS A.N.,
J Gen Virol 1977 34, 475

- 27 - COMOGLIO S., CELADA F.,
J Immunol methods 1976 10, 161

- 28 - DEELDER A.M.; RUITENBERG E.J., KORNELIS D., STEERENBERG P.A.,
Exp Parasit 1977 41, 133

- 29 - DRAY F., ANDRIEU J.M., RENAUD F.,
Biochem Biophys. Acta 1975 403, 131

- 30 - DUERMAYER W., VAN DER DEEN J.,
Lancet 1978 II, 684

- 31 - DUERMAYER W., VAN DER VEEN J., KOSTER B.,
Lancet 1978 I, 823

- 32 - ENGVALL E.,
Lancet 1976 2, 1410

- 33 - ENGVALL E.,
Biomedical Applications of immobilized enzymes and proteins edited by T.M.S
CHANG Plenum Press 1977 2, 87

- 34 - ENGVALL E., CARLSSON H.E.,
1st International symposium on immunoenzymatic techniques INSERM symposium
n°2 edited by FELDMANN et al (north holland publishing CO, Amsterdam)
1976 135

- 35 - ENGVALL E., JONSSON K., PERLMANN P.,
Biochem Biophys Acta 1971 251, 427

- 36 - ENGVALL E., LJUNGSTROM I.,
Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica 1975 83, 1

- 37 - ENGVALL E., PERLMANN P.,
Immunochemistry 1971 8, 871

- 38 - ENGVALL E., PERLMANN P.,
J immunology 1972 109, 129

- 39 - ENGVALL E., PERLMANN P.,
Microbiology Immunology edited by C.G. HEDEN and T. ILLENY Wiley New-York
1975 529

- 40 - FARAG H., BOUT D., CAPRON A.,
Biomedicine Express 1975 23, 276

- 41 - FRUCHART J.C., DESREUMAUX C., DEWAILLY P., SEZILLE C., JAILLARD J.,
CARLIER Y., BOUT D., CAPRON A.,
Clin chem 1978 24, 455

- 42 - FUCCARO-DECAENES C., MERIADEC B., BUEFFE D., BURTIN P.,
Ann. Immunol. 1974 125 C, 747

- 43 - GERA A., LOEBENSTEIN G., RACCAH B.,
Virology 1978 86, 542

- 44 - GHOSE L.H., SCHNAGL R.D., HOLMES I.H.,
J Clin Microbiol 1978 8, 268

- 45 - GILMAN S.C. DOCHERTY J.J.,
J infect Dis 1977 136 suppt S 286

- 46 - GLYNN A.A., ISON C.,
British J of venereal Diseases 1972 54, 97

- 47 - GRAUBALLE P.C., VESTERGAARD B.F.,
Lancet 1977 2, 1038

- 48 - GRAVELL M., DORSETT P.H., GUTENSON O., LEY A.C.
J infect Dis 1977 136 suppt S 300

- 49 - GRAY B.M.,
J immunol methods 1979 28, 187
- 50 - GRIPENBERG M., LINDER E., KURKI P., ENGVALL E.,
Scand J immunol 1978 7, 151
- 51 - GROS C., PETIT O., DRAY F.,
Protides of biological Fluids 1976 24, 763
- 52 - GUESDON J.L., DAVID B., LAPEYRE J.,
Ann. Immunol (Inst Pasteur) 1977 128 C, 799
- 53 - HABERMANN E., HELLER I.,
Protides of biological Fluids 1976 24, 825
- 54 - HALBERT S.P., ANKEN M.,
J infect Dis 1977 136 suppl S 318
- 55 - HALLE S., DASCH G.A., WEISS E ,
J. Clin Microbiol 1977 6, 101
- 56 - HAMMARSTROM S., ENGVALL E., SUNBLAD G., GOLDSTEIN I.J., JOHANSSON B.G.,
SVENSSON S.,
Proc Nat Acad Sci 1975 72, 1528
- 57 - HAUTANEN A., KOISTINEN V., PENTTINEN K., WAGER O.,
J Immunol methods 1978 21, 335
- 58 - HERRMANN J.E., HENDRY R.M., COLLINS M.F.,
J Clin Microbiol 1979 10, 210
- 59 - HERRMAN J.E., HOLLINGDALE M.R., COLLINS M.F., VINSON J.W.,
Proc Soc exp Biol Med 1977 154, 285
- 60 - HEVEY R., BONACKER L.H., SPARACIO R.,
1st International symposium on immunoenzymatic techniques INSERM symposium
n°2 edited by FELDMANN et al (north holland publishing Co, Amsterdam)
1976 p 191
- 61 - HOFFMAN R.R.,
J allergy and clin immunology 1973 51, 303

- 62 - HOLM G., ENGVALL E., HAMMARSTROM S., NATVIG J.B.,
Scand J Immunol 1974 3, 173

- 63 - HOLMGREN J., SVENNERHOLM A.M.
Infection and immunity 1973 7, 759

- 64 - HOMMEL M.,
Trans Roy Soc trop Med Hyg 1976 70, 15

- 65 - HOMMEL M., KIEN TRUONG T., BIDWELL DE.,
La Nouvelle Presse Médicale 1976 5, 2789

- 66 - HULDT G., LAGERQUIST B., PHILLIPS T., DRAPER C.C., VOLLER A.,
Ann Trop Med Parasit 1975 69, 483

- 67 - ISHIKAWA C.,
J Biochem (Tokyo) 1973 73, 1319

- 68 - JODAL U., AHLSTEDT S., CARLSSON B., HANSON L.A., LINDBERG U., SOHL A.,
Int Arch allérgy and app. immunol 1974 47, 537

- 69 - JOYCE B.G., READ G.F., FAHDY D.R.,
Steroids 1977 29, 761

- 70 - KAKAKI J., WOLTERS G., KUIJPERS L., SCHUURS A.H.W.M.
J Clin Path 30, 894

- 71 - KAHANE S., GOLDSTEIN V., SAROV I.,
Intervirology 1979 12, 39

- 72 - KATO K., FUKUI H., HAMAGUCHI Y., ISHIKAWA E.,
J immunol 1976 116, 1554

- 73 - KATO K., HAMAGUCHI Y., FUKUI H., ISHIKAWA E.,
Febs letters 1975 56, 370

- 74 - KATO K., HAMAGUCHI Y., FUKUI H., ISHIKAWA E.,
J Biochem (Tokyo) 1975 78, 432

- 75 - KELLY D.C., EDWARDS M.L., EVANS H.F., ROBERTSON J.S.,
J Gen Virology 1978 40, 465

- 76 - KIRKPATRICK A., WESPIC H.T., NAKAMURA R.M.,
Clin chem 1977 23, 50
- 77 - KITAGAWA T., AIKAWA T.,
J Biochem (Tokyo) 1976 79, 233
- 78 - KLOTZ J.L., MINAMI R.M., TEPLITZ R.L.,
J Immunol methods 1979 29, 155
- 79 - LANGE W., KOHLER H., APROCADA J., OTT A., SUCKER U.,
Deut Med Wochenschr 1977 102, 1581
- 80 - LALER R., ERLANGER B.,
Immunochemistry 1974 11, 533
- 81 - LEINIKKI P., PASSILA S.,
J clin Path 1976 29, 1116
- 82 - LEINIKKI P., PASSILA S.,
J Infect Dis 1977; 136 suppt S 294
- 83 - LJUNSTROM I., ENGVALL E., RUITENBERG E.J.,
Proc Brit Soc Parasit 1974 69, XXIV
- 84 - LOCARNINI S.A., GARLAND S.M., LEHMANN N.I., PRINGLE R.C., GUST I.D.,
J Clin Microbiol 1978 8, 277
- 85 - LUCKINS A.C.,
Trop anim Health Prod 1977 9, 53
- 86 - MAIOLINI R., FERRUA B. MASSEYEFF R.,
J immunol methods 1975 6, 355
- 87 - MAIOLINI R., FERRUA B., QUARANTA J.F., PINOTEAU A., EULER L., ZIEGLER G.,
MASSEYEFF R.,
J immunol methods 1978 20, 25
- 88 - MAIOLINI R., MASSEYEFF R.,
J immunol methods 1975 8, 223
- 89 - MASSEYEFF R., MAIOLINI R., FERRUA B., RAGIMBEAU-GILLI J.,
Protides of the Biological Fluids 1976 24, 605

- 90 - MATHIESEN L., FEINSTONE S.M., WONG D.C., SKINHOEJ R., PURCELL R.H.,
J Clin Microbiol 1978 7, 184
- 91 - MAZURIER C., PARQUET-GERNEZ A., GOUDEMAM M.,
Pathologie Biologie 1977 25 supplt 18
- 92 - MIEDEMA K., BOELHOUWER J., OTTEN J.W.,
Clinica chimica acta 1972 40, 187
- 93 - MILLS K.W., GERLACH E.H., BELL J.W., FARKAS M.E., TAYLOR R.J.,
J Clin Microbiol 1978 7, 73
- 94 - MIRANDA Q.R., BAILEY G.D., FRASER A.S., TENOSO M.J.,
J infect Dis 1977 136 supplt S 304
- 95 - MIYAI K., ISHIBASHI K., KUMAHARA Y.,
Clin chim Acta 1976 67, 263
- 96 - NASSAU E., PARSONS E.R., JOHNSON G.D.,
Tubercle 1976 57, 67
- 97 - OGIHARA T., MIYAI K., N SHI K., ISHIBASHI K., KUMAHARA Y.,
J Clin Endocrinol metab 1977 44, 91
- 98 - PATRAMANIS I., MARKETAKIS J., KARLAMANIS E., TZAMOURANIS N., PAVLATOS M.,
J immunol Methods 1973 2, 251
- 99 - PESCE A.J., MENDOZA N., BOREISHA I., GAIZUTIS M.A., POLLACK V.E.,
Clin chem 1974 20, 353
- 100 - PREVOST J., GUESDON J.L.,
Ann Microbiol Inst Pasteur 1977 128 B, 531
- 101 - PURNELL R.E., HENDRY D.J., BIDWELL D.E., TURP P.,
Vet Rec 1976 99, 102
- 102 - RICHARDSON L.S., YOLKEN R.H., RELSHE R.B., CAMARGO E., KIM H.W., CHANOCK R.M.,
Infection and immunity 1978 20, 660

- 103 - RICHARDSON M.D., WHITE L.O., WARREN R.C.,
Mycopathologia 1979 67, 83
- 104 - RODA L., MAIOLINI R., FERRUA B., MASSEYEFF R.,
J immunol methods 1979 29, 207
- 105 - RUITENBERG E.J., BUYS J.,
Ann J trop Med hyg 1977 26, 31
- 106 - RUITENBERG E.J., STEERENBERG P.A., BROSI B.J.M., BUYS J.,
Bull World Health Organ 1974 51, 108
- 107 - RUITENBERG E.J., STEERENBERG P.A., BROSI B.J.M.,
Medikon 1975 4, 30
- 108 - RUITENBERG E.J., STEERENBERG P.A., BROSI B.J.M., BUYS J.,
J immunol methods 1976 10, 67
- 109 - RUSSEL H., FACKLAM R.R., EDWARDS L.R.,
J Clin Microbiol 1976 3, 501
- 110 - SADEH D., HERSZFELD D., HEXTER C.S.,
Protides of biological fluids 1976 24, 759
- 111 - SAUNDERS G.C.,
Proc 17th Ann Anim Assoc Vet Diag 1975 311
- 112 - SAUNDERS G.C.,
Amer J Vet Res 1976 38, 21
- 113 - SCHMITZ H., DOERR H.W., KAMPA D., VOGT A.,
J clin Microbiol 1977 5, 629
- 114 - SEPULVEDA R., LONGBOTTOM J.L., PERYS J.,
Clinical allergy 1979 9, 359
- 115 - SMITH J., HOLMGREN J., AHLSTEDT S., HANSON L.A.,
Infect Immunity 1974 10, 411

- 116 - SOHL-AKERLUND A., HANSON L.A., AHLSTEDT S., CARLSSON B.,
Scand J Immunol 1977 1275
- 117 - STIFFLER-ROSENBERG G., FEY H.,
Schwerz med Woschr 1977 107, 1101
- 118 - STIMSON W.H., SINCLAIR J.M.,
Febs Letters 1974 47, 190
- 119 - THEAKSTON R.D.G., LLOYD-JONES M.J., REID H.A.,
Lancet 1977 2, 639
- 120 - THOEN C.O., PIETZ D.E., ARMBRUST A.L., HARRINGTON R.,
J clin Microbiol 1979 10, 222
- 121 - THRAENHART O., KUWERT E.K.,
Lancet 1977 2, 399
- 122 - ULLMAN E.F., BRAKEMORE J., LEUTE R.K. et al.,
Clin chem 1975 21, 1011 (Abstract)
- 123 - UKKONEN P., KOISTINEN V., PENTTINEN K.,
J immunol methods 1977 15, 343
- 124 - VANDERVELDE E.M., COHEN B.J., COSSART Y.E.,
J clin Path 1977 30, 714
- 125 - VAN HELL H., BOSCH A.M.G., BRANDS J.A.M.,
Anal chem 1976 2, 279
- 126 - VAN WEEMEN B.K.,
enzyme immuno assays thèse Groningen 1974
- 127 - VAN WEEMEN B.K., SCHUURS A.H.W.M.,
Febs letters 1971 15, 232
- 128 - VAN WEEMEN B.K., SCHUURS A.H.W.M.,
Febs letters 1972 24, 77
- 129 - VAN WEEMEN B.K., SCHUURS A.H.W.M.,
Febs letters 1974 43, 215

- 130 - VAN WEEMEN B.K., SCHUURS A.H.W.M.,
1st International symposium on immunoenzymatic techniques INSERM symposium
n°2 edited by FELDMANN et al (north holland publishing Co, Amsterdam)

- 131 - VEJTOR P.M.,
Acta Path Microbiol Scand Sect B 1978 86, 387

- 132 - VELDKAMP J., VISSER A.M.,
Brit. J Vener Dis 1975 51, 227

- 133 - VESTERGAARD B.F., GRAUBALLE P.C., SPANGAARD H.,
Acta Path microbiol Scand B 1977 85, 466

- 134 - VLADUTILA O., PALUMBO D.A., ASIRWATHAM J.E.,
Clin chem 1979 25, 366

- 135 - VOLLER A.,
Lancet 1975 I, 426

- 136 - VOLLER A., BARTLETT A., BIDWELL D.E.,
Trans R. Soc Trop Med Hyg 1976 70, 98

- 137 - VOLLER A., BARTLETT A., BIDWELL D.E., CLARK M.F., ADAMS A.W.,
J Gen Virol 1976 33, 165

- 138 - VOLLER A., BIDWELL D.E.,
Br J exp path 1975 56, 338

- 139 - VOLLER A., BIDWELL D.E.,
Br J exp path 1976 57, 243

- 140 - VOLLER A., BIDWELL D.E.,
Pub Ann Soc Microbiol 1976 506

- 141 - VOLLER A., BIDWELL D.E., BARTLETT A.,
Tropenmed Parasitol 1975 26, 247

- 142 - VOLLER A., BIDWELL D.E., BARTLETT A.,
Bull Wld Hlth Org 1976 53, 55

- 143 - VOLLER A., BIDWELL D.E., BARTLETT A.,
Protides of biological Fluids 1976 24, 751
- 144 - VOLLER A., BIDWELL D.E., BARTLETT A.,
The E.L.I.S.A. (Flow line publications, Guernsey) 1977 24
- 145 - VOLLER A., BIDWELL D.E., BARTLETT A., FLECK D.G., PERKINS M., OLADHIN B.,
J clin Path 1976 29, 150
- 146 - VOLLER A., BIDWELL D.E., HULDT G., ENGVALL E.,
Bull world health org. 1974 51, 209
- 147 - VOLLER A., HULDT G., THORS C., ENGVALL E.,
Brit Med J 1975 1, 659
- 148 - WALLEN W.C., MATTSON J.M., LEVINE P.H.,
J infect Dis 1977 136 supplt S 324
- 149 - WALLS K.W., BULLOCK S.L., ENGLISH D.K.,
J clin Microbiol 1977 5, 273
- 150 - WARREN R.C., BARTLETT A., BIDWELL D.E., RICHARDSON M.D., VOLLER A., WHITE L.O.
Brit Med J 1977 1, 1183
- 151 - WARREN R.C., WHITE L.O., MOHAN S., RICHARDSON M.D.,
J Immunol methods 1979 28, 177
- 152 - WATANABE N., NIITSU Y., OHTSUKA S. et al.,
Clin chem 1979 25, 80
- 153 - WEI R., KNIGHT G.J., ZIMMERMAN D.H., BOND H.E.,
Clin chem 1977 23, 813
- 154 - WELTMAN J.K., FRACKELTON A.R., SZARO R.P., ROTMAN B.,
J Allergy 1976 58, 426
- 155 - W.H.O.,
Bull World Health org. 1976 54, 141

- 156 - WOLTERS G., KUIJPERS L., KACAKI J., SCHUURS A.H.W.M.,
J clin Path 1976 29, 873

- 157 - WOLTERS G., KUIJPERS L., KACAKI J., SCHUURS A.H.W.M.,
J infect Dis 1977 136 supplt S 311

- 158 - YOLKEN R.H. and others
N England J of Medecine 1978 299, 1156

- 159 - YOLKEN R.H., BARBOUR B.A., WYATT R.G., KALICA A.R., SAPIKIAN A.Z.,
CHANOCK R.M.,
Science 1978 201, 259

- 160 - YOLKEN R.H., KIM H.W., CLEM T., WYATT R.G., KALICA A.R., CHARNOCK R.M.,
ZAPIKIAN A.Z.,
Lancet 1977 2, 263

- 161 - YOLKEN R.H., WYATT R.G., BARBOUR B.A., KIM H.W., ZAKIPIAN A.Z., CHANOCK R.M.
J clin microbiol 1978 8, 283

- 162 - YORDE D.E., SASSE E.A., WANG T.Y., HUSSA R.O., GARNINCIS J.C.,
Clin chem 1976 22, 1372

