

Radioimmunologie et exploration fonctionnelle

par Jacques Ingrand

(Maître de conférences agrégé de biophysique ; Biologiste des Hôpitaux ; Service d'exploration fonctionnelle et de traitement par les radioisotopes et techniques physiques associées, Groupe hospitalier Cochin-Maternité, 27, rue du Faubourg St-Jacques, 75674 Paris Cedex 14).

La radioimmunologie a cette année près de 18 ans d'existence puisque c'est en 1959 que Berson et Yalow proposèrent cette technique pour le dosage de l'insuline plasmatique. Depuis cette date, la radioimmunologie a connu une expansion ininterrompue, « colonisant » d'abord l'endocrinologie, puis les autres disciplines biologiques et médicales. Ce phénomène est dû essentiellement à la création d'outils de dosage très efficaces de par leur sensibilité, leur spécificité et la possibilité de travail en grande série.

La contribution des techniques radioimmunologiques d'une part à l'amélioration de nos connaissances concernant la physiologie et la pathologie, d'autre part au perfectionnement des méthodes d'exploration fonctionnelle est actuellement difficile à évaluer dans son ensemble, dans la mesure où de nouveaux domaines d'application sont encore régulièrement découverts.

L'exposé abordera les points suivants :

Principes de l'analyse radioimmunologique.

Problèmes posés par les réactifs.

Problèmes méthodologiques.

Discussion

- Radioimmunologie et radioanalyse,
- Avantages et inconvénients,
- Techniques concurrentes.

Conclusion.

Principes de l'analyse radioimmunologique

Classiquement, la radioimmunologie est définie comme une méthode qui utilise le principe de la dilution isotopique en présence d'un antigène et de l'anticorps correspondant.

On rappelle que les anticorps sont des molécules appartenant à la classe des globulines, élaborées par un organisme vivant à la suite de l'administration d'une substance étrangère, l'antigène.

La radioimmunologie représente l'une des variantes de l'analyse dite par compétition qui regroupe toutes les techniques fondées sur l'emploi de réactifs spécifiques de liaison. Un exemple permet d'illustrer cette notion de liaison spécifique : la thyroxine (hormone thyroïdienne) peut être fixée sur au moins deux récepteurs moléculaires ; l'un est la T.B.G. (Thyroxin Binding Globulin), α -globuline présent dans le sang aux conditions physiologiques, l'autre est un anticorps antithyroxine (présent dans le sang d'un animal ayant reçu des injections répétées de thyroxine dans certaines conditions).

A l'origine, la radioimmunologie était réservée aux hormones polypeptidiques à caractère antigénique intrinsèque ; elle concerne également les haptènes qui sont des molécules sans antigénicité propre, mais qui acquièrent la faculté d'induire la production d'anticorps à la suite d'un couplage avec une autre molécule.

Le concept de base d'un dosage radioimmunologique est simple (Figure 1).

Lorsqu'on mélange antigène (AG) et anticorps (AC), on obtient la formation d'un complexe antigène-anticorps (AG-AC).



Si l'antigène est marqué (AG*), le complexe obtenu sera également marqué, puisque l'anticorps ne peut pas différencier AG et AG*.

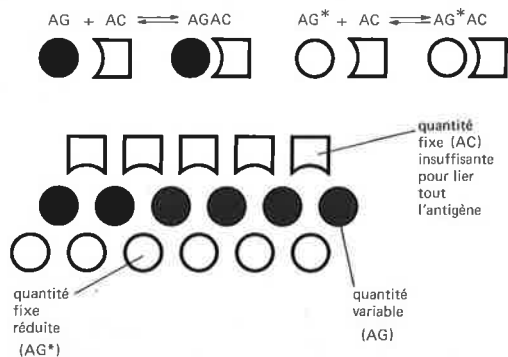


Figure 1. Principes du dosage radio-immunologique.

Comme les deux espèces d'antigène coexistent, on parle de dilution isotopique, dilution de AG^* par AG et de AG^*AC par $AGAC$. Si l'anticorps est en concentration limitée, il se produira une compétition entre AG et AG^* pour les sites de fixation de l'anticorps. Plus il y aura d'antigène *non marqué*, moins l'antigène marqué pourra se fixer à l'anticorps.

C'est la mesure de la diminution de la quantité du complexe AG^*AC qui permet le dosage de l'antigène non marqué (AG). La courbe d'étalonnage utilise bien entendu une quantité fixe de AG^* , de manière à suivre les modifications apportées par les incréments successifs de AG (voir figure 2).

A. Problèmes posés par les réactifs

Après cette présentation des différents éléments entrant en réaction, nous allons maintenant analyser plus en détail les problèmes posés par les réactifs, en insistant sur les points révélateurs des limites de la méthode.

A. 1. L'anticorps

Le réactif le plus important dans les dosages radioimmunologiques est sans conteste l'antisérum (sérum contenant l'anticorps) qui doit posséder un titre et une spécificité convenables, et une forte affinité pour l'antigène.

A. 1. 1. Production d'un antisérum

Les hormones peptidiques de poids moléculaire supérieur à 4.000 ne posent généralement pas de problèmes lors de la préparation d'un antisérum.

Il faut reconnaître actuellement que l'isolement d'un bon antisérum relève de procédés plus empiriques que scientifiques. Voici, résumées, les données les plus communément admises (Tableau I).

Lorsque les molécules à doser ne sont pas antigéniques (on parle

Tableau I. A propos de la préparation d'un antisérum.

Animaux choisis :

cobayes, lapins

($n \geq 10$.)

Procédé « standard moyen ».

- Mélange de l'antigène* avec l'adjuvant de Freund.
- Injections s.c., im, ip, id en 1 ou plusieurs sites; répéter tous les mois.
- Prélèvements pour contrôle (dates variables, ex. 15 jours après la 4^e injection).

* Quelques dizaines de μg .

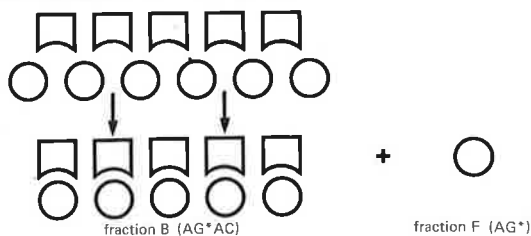
Tableau II. Substances utilisées pour le couplage d'haptènes.

Haptènes : T_3 , T_4 , stéroïdes, digoxine, vasopressine, AMP, morphine, prostaglandines, catécholamines.

Agents de couplage : carbodiimide, glutaraldéhyde, alkylchloroformates, sels d'isoxazolium diisocyanates, diimidoesters...

Protéine porteuse : polylysine, sérumalbumines, acide polyglutamique.

1^{er} cas : masse m de l'antigène non marquée = 0



2^e cas (extrême) : $m \rightarrow \infty$

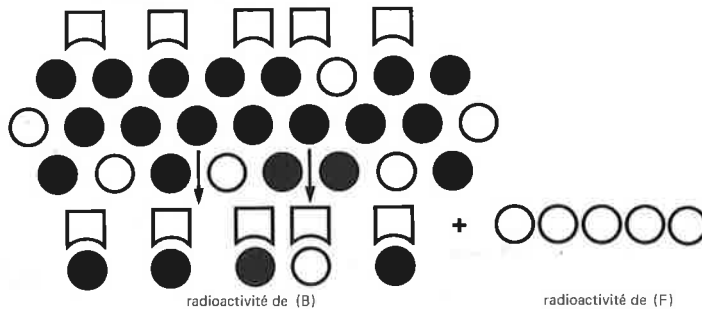


Figure 2. Compétition entre AG et AG^* aux points extrêmes de la gamme étalon.

d'haptènes), on procède par couplage covalent avec des protéines de poids moléculaire plus élevé (Tableau II).

Il est à noter dans ce procédé que certains groupements fonctionnels de l'haptène sont « étouffés » dans la configuration stérique résultante. Le rapport molaire $\frac{\text{haptène}}{\text{protéine}}$ varie de 10 : 1 à 30 : 1.

A. 1. 2. Analyse des caractéristiques d'un antisérum

L'analyse d'un antisérum comporte trois opérations principales, la mesure du titre, la vérification de la spécificité et la détermination de l'affinité de l'anticorps pour l'antigène ; cette dernière caractéristique est liée de manière très étroite à la sensibilité des dosages effectués à l'aide de l'antisérum.

a) Le titre d'un antisérum

En pratique, le titre d'un antisérum est défini comme la dilution qui, en l'absence d'antigène froid (non marqué), provoque la fixation de 50 % de l'antigène marqué sur l'anticorps (Figure 3).

La mesure du titre n'est pas suffisante pour affirmer que l'antisérum convient au dosage radioimmunologique ; il indique la dilution de travail et permet de prévoir la durée d'utilisation du réactif, compte tenu du volume d'antisérum recueilli.

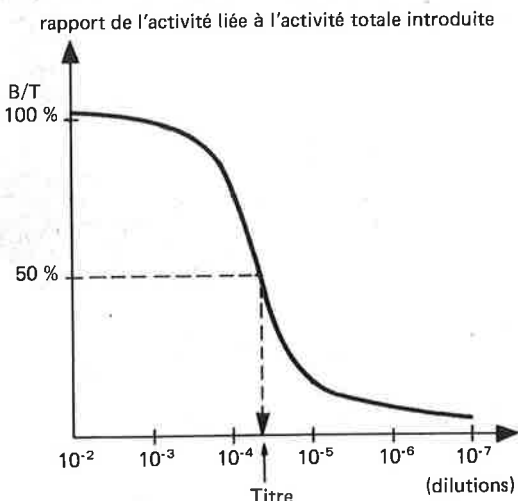


Figure 3. Détermination du titre d'un antisérum.

b) La spécificité de l'antisérum

La spécificité de l'antisérum dépend de la capacité de l'anticorps de détecter les différences les plus fines de structure moléculaire. Elle peut être étudiée par l'introduction de quantités croissantes des

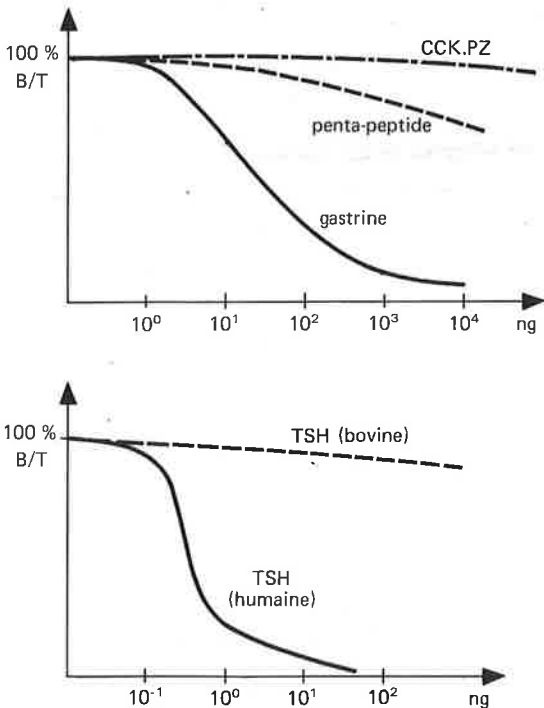


Figure 4. Mise en évidence de réactions croisées.

substances incriminées, ce qui permet la mise en évidence de réactions croisées éventuelles (Figure 4).

Les résultats sont habituellement exprimés en % de réactivité croisée, valeur calculée à partir du rapport des poids donnant la même réponse. (Tableau III).

Tableau III. Étude de la spécificité de deux antisérums.

% de réactivité croisée (ex.).		Immunosérum/anti I ₃	
Immunosérum/anticortisol		Immunosérum/anti I ₃	
Cortisol	100	I. T ₃	100
11-désoxy	100	acide triiodothyro acétique	33
21-désoxy	100	I. T ₄	0,3
Cortisone	40	T ₂	1,4
Progesterone	28	Acide triiodothyro propionique	0,01
17-OH —	56		
Testostérone	13		
Œstradiol	0,01		

La mauvaise spécificité d'un antisérum oblige à recourir aux techniques classiques d'extraction par solvants organiques ou de chromatographie sur colonne ; c'est le cas pour un certain nombre de stéroïdes où il y a lieu d'éliminer au préalable les substances susceptibles d'interférer.

Remarque:

Il faut également avoir la certitude que le composé présent dans le liquide biologique (plasma le plus souvent) se comporte vis à vis de l'anticorps de la même façon que la substance étalon. En pratique, on regarde quel est l'effet de la dilution du plasma sur la réponse du système analytique en comparant les courbes réponse-dose obtenues à partir des dilutions identiques du standard et du plasma (Figure 5).

Insistons donc bien encore sur le fait que le dosage radioimmunologique concerne la séquence immunoréactive. Certaines molécules immunologiquement proches du composé (pour lequel a été préparé

Étude des effets de la dilution (GH humaine)

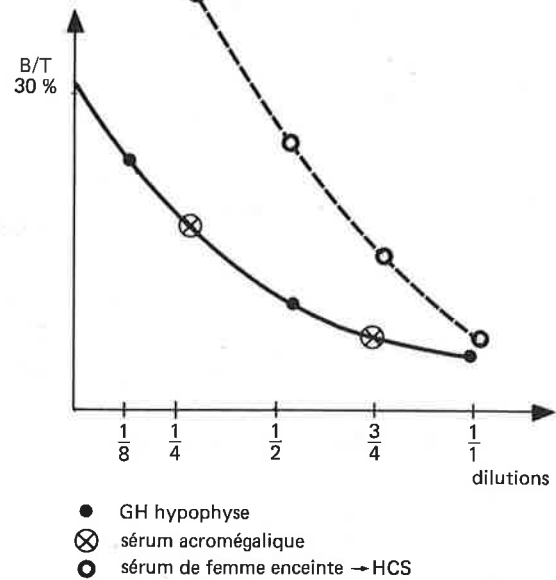


Figure 5. Dilution de liquides biologiques censés renfermer de la GH (hormone de croissance).

un antisérum) pourront être mesurées par le test alors qu'elles peuvent être dépourvues d'intérêt biologique.

Cette notion de séquence immunoréactive est illustrée dans le tableau IV.

Tableau IV. Séquences immunoréactives.

1. Précurseurs hormonaux circulants de P.M. élevé ex proinsuline, « big » ACTH.
2. Fragments métaboliques.
3. Exemple de l'ACTH.
 - Séquence N-terminale (1-24) active biologiquement, peu immunogène.
 - Séquence C. terminale (25-39) (propriétés inverses).
4. Déterminants antigéniques communs HCG, LH, FSH, TSH (sous-unité α identique).

c) L'affinité de l'anticorps pour l'antigène

Une fois déterminées la dilution de travail et la spécificité de plusieurs lots d'antisérums, il reste à sélectionner l'antisérum susceptible d'atteindre la meilleure sensibilité, c'est-à-dire celui pour lequel un

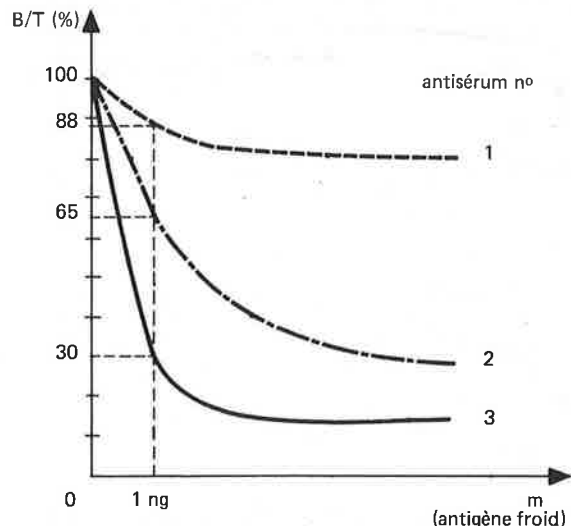


Figure 6. Étude de la sensibilité de plusieurs antisérums.

incrément réduit d'antigène froid provoque le déplacement le plus important de l'antigène marqué (Figure 6).

La pente la plus forte permet d'identifier le meilleur réactif au niveau de ce critère.

A ce stade de l'exposé, il nous paraît opportun d'introduire quelques développements conceptuels simples, montrant que l'affinité d'un anticorps peut être évaluée de manière quantitative à l'aide de la constante d'équilibre de la réaction réversible $AG + AC \rightleftharpoons AG-AC$. Nous avons choisi pour cela un modèle, sans doute trop simplifié, mais dont le mérite est de fournir un schéma explicatif bien adapté en fin de compte aux systèmes analytiques réels.

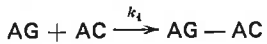
Résumons d'abord les conditions de validité du modèle (Feldman et Rodbard) (Tableau V).

Tableau V. Conditions de validité du modèle étudiant la réaction $AG + AC \rightleftharpoons AG-AC$.

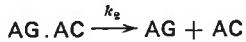
1. L'antigène et l'anticorps sont constitués d'une seule forme chimique homogène.
2. Ils sont monovalents.
3. La loi d'action des masses s'applique.
4. L'antigène marqué et l'AG froid ont les mêmes propriétés physico-chimiques.
5. La réaction atteint l'équilibre.
6. Les formes B et F peuvent être séparées sans modification de l'équilibre.

Étudions maintenant ce modèle, en cherchant à déterminer les conditions expérimentales du calcul de la constante d'équilibre.

Pour l'antigène non marqué



$$v_1 = + \frac{dm}{dt} = k_1[AG][AC]$$



$$v_2 = - \frac{dm}{dt} = k_2[AG-AC]$$

à l'équilibre $v_1 = v_2$

$$k = \frac{k_1}{k_2} = \frac{[AG-AC]}{[AG][AC]} \text{ (litres. mole}^{-1}\text{) (eq. 1)}$$

Pour l'antigène marqué

$$k^* = \frac{k_1^*}{k_2^*} = \frac{[AG^*-AC]}{[AG^*][AC]} = K \text{ (eq. 2)}$$

A partir de certaines valeurs expérimentales de mesure de radioactivité et des concentrations molaires calculées à partir de l'antigène froid introduit dans une gamme d'étalonnage, il devient possible de calculer K. En effet,

mesure expérimentale :

$$R = \frac{[Ag^* - AC]}{[AG^*]} = \frac{B}{F} \text{ (← eq. 2)}$$

Expression de [AC] à modifier

$$[AC] = \frac{[AC_0] - [AG - AC]}{\text{sites libres} \quad \text{sites totaux} \quad \text{sites occupés ou hormone liée}}$$

$$\text{d'où } \frac{B}{F} = K([AC_0] - [AG - AC])$$

Calcul de [AG - AC] :

$$\frac{[AG^* - AC]}{[AG^*] + [AG^* - AC]} = \frac{B}{T} = \frac{[AG - AC]}{[AG] + [AG - AC]}$$

or: $[AG] + [AG - AC] = [AG_T]$ (Valeur connue)

La représentation graphique de la fonction

$$\begin{aligned} \frac{B}{F} &= K([AC_0] - [AG - AC]) \\ &= K([AC_0]) - \frac{B}{T}[AG_T] \end{aligned}$$

fournit une droite, dite de Scatchard (Figure 7). Les valeurs usuelles de K sont comprises entre 10^9 et 10^{12} litres par mole.

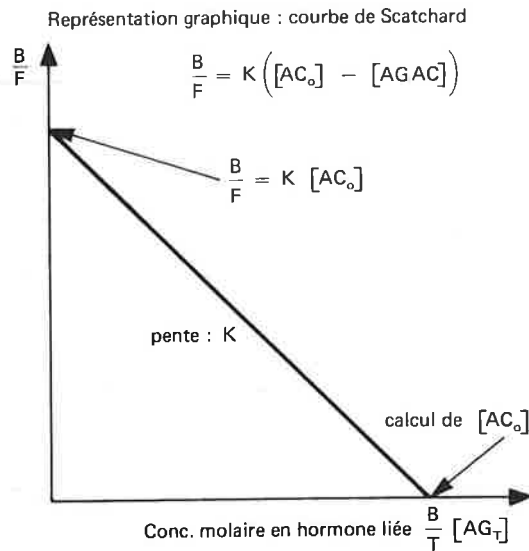
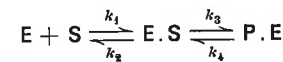


Figure 7. Représentation de Scatchard.

N. B. Certains auteurs utilisent une approche différente en rapprochant la réaction radioimmunologique et la réaction enzyme (E) - substrat (S).



P : Produit

La constante de Michaelis-Menten,

$$K_M = \frac{K_2 + K_3}{K_1}$$

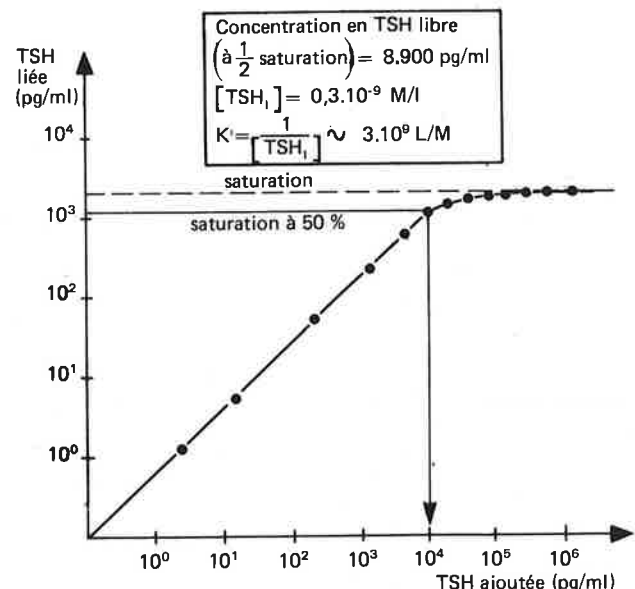


Figure 8. Courbe de saturation TSH - anticorps anti TSH.

appliquée au cas de la R. i. ($K_3 = 0$) devient

$$K_M = \frac{K_2}{K_1}$$

Elle est numériquement égale à l'inverse de la concentration (en substrat) observée pour une saturation de l'enzyme à 50 %.

En pratique, $E = AC - S = AG$

(courbes de saturation avec mesure de la concentration de l'hormone libre pour une saturation de l'AC à 50 %) (Figure 8).

La longueur du chapitre consacré à l'étude de l'antisérum concrétise l'importance de ce réactif, qui est véritablement le pivot du dosage radioimmunologique.

Nous allons aborder maintenant l'étude des autres réactifs dont le rôle, pour être moins décisif, est cependant déterminant au cours de l'analyse.

A. II. L'antigène marqué

En théorie, la molécule marquée utilisée dans une réaction radioimmunologique devrait être rigoureusement identique à la molécule à doser. Ceci implique le marquage d'un atome faisant partie de l'édifice moléculaire.

En fait, ce procédé n'est appliqué que dans le cas de l'iode pour les hormones thyroïdiennes et parfois dans le cas du tritium pour certains stéroïdes ou des médicaments. En pratique, on utilise le plus souvent des molécules marquées par des atomes non constitutifs (appelés parfois hétéroatomes), dans la mesure où les antigènes marqués produits ne sont pas discernables des antigènes natifs vis à vis de l'anticorps.

La caractéristique dominante d'un tel antigène marqué est la valeur de son activité spécifique.

Rappelons que l'activité spécifique, qui révèle la proportion de molécules marquées au sein de l'ensemble des molécules, s'exprime en unités d'activité par unité de masse ou par mole, c'est-à-dire par exemple en m Ci/mg ou en Ci/mole. Les activités spécifiques utilisées en R. i. s'échelonnent entre 10 et 500 m Ci/mg. Elles déterminent la quantité minimum d'antigène susceptible d'être décelé (Figure 9).

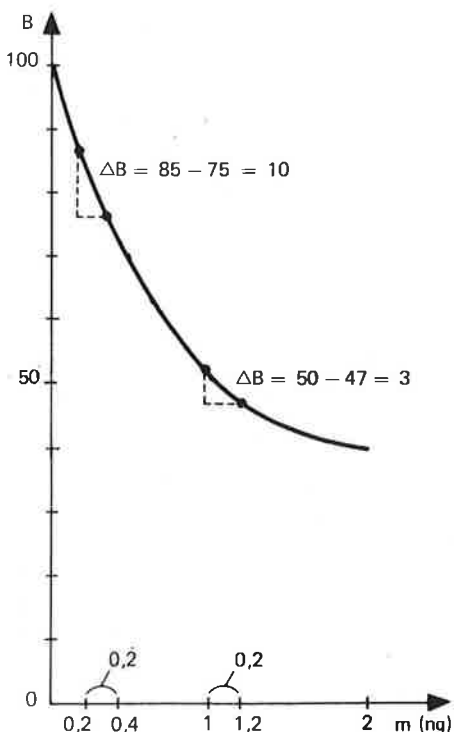


Figure 9. Influence de l'activité spécifique.

Supposons une courbe Réponse-Dose. $B = f(m)$ obtenus avec un traceur idéal de masse pratiquement *nulle* au point O et un anticorps donné.

Si maintenant nous utilisons deux traceurs d'activité spécifique différente :

- le premier entraîne 0,2 ng avec l'activité nécessaire à la détection
- le second entraîne 1 ng avec cette même activité (son activité spécifique est inférieure).

A partir du même anticorps, la quantité minimum d'antigène décelable va dépendre essentiellement de ΔB , dont la valeur diminue quand la masse d'antigène froid présente au point O augmente.

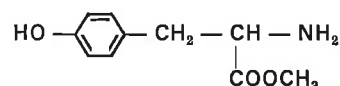
La technique de marquage comporte trois étapes, le marquage proprement dit, la purification et l'analyse des propriétés de l'antigène marqué.

A. II. 1. Le marquage proprement dit

Nous retiendrons le seul exemple de l'iode 125 qui est actuellement l'isotope le plus utilisé en radioimmunologie.

Le marquage s'effectue par substitution sur les noyaux de certains aminoacides aromatiques, tyrosine essentiellement et phénylalanine, et, dans certains cas, sur le noyau imidazole de l'histidine. Quand le substrat ne possède pas de noyau susceptible d'être iodé, il est quelquefois possible de greffer un chaînon possédant un noyau aromatique, l'ensemble pouvant être ultérieurement soumis à l'iodation.

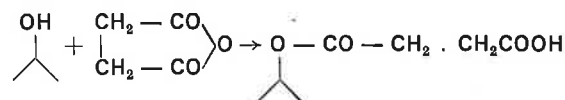
On utilise dans ce but l'ester méthylique de la tyrosine (TME).



La fonction amine du TME se fixe :

- soit sur une fonction carboxyle (COOH) de la molécule à modifier,

soit sur un COOH formé par estérification d'un hydroxyle (OH) de la molécule à modifier, à l'aide d'anhydride succinique.



- soit sur un COOH obtenu par formation d'oxime entre un $>C=O$ libre et l'*o*-carboxyméthyl hydrolamine.

Ex : testostérone, cortisol, digitoxigénine, AMP cyclique.

N. B. Il va de soi que la pureté radiochimique de l'antigène marqué dépend de la pureté initiale de l'antigène (ex : extrait d'organe contenant une hormone).

L'iodation des molécules se fait par oxydation de l'iode I^- avec passage sous la forme I^0 (iode élémentaire) ou I^+ (ex : $Cl I$). Cette oxydation est réalisée à l'aide de 3 grands types de méthodes. (Tableau VI).

L'oxydation par la chloramine T, en dépit de certains inconvénients, est encore actuellement la méthode la plus utilisée.

Tableau VI. Méthodes d'oxydation de l'iode $I^- \rightarrow I^0$ et/ou I^+ .

1. Voie chimique : Chloramine T, blocage par métabisulfite Na
2. Voie électrolytique : oxydation anodique.
3. Voie enzymatique : H_2O_2 en présence de lacto peroxydase ; blocage par mercaptoéthanol (ou dilution).

A. II. 2. La purification

Après le marquage, la solution contient un mélange d'antigène marqué, d'antigène dégradé marqué et d'iode radioactif. La récupération de l'antigène marqué se fait le plus souvent par élu-

tion fractionnée sur colonne (cellulose ou sephadex le plus souvent). (Figure 10).

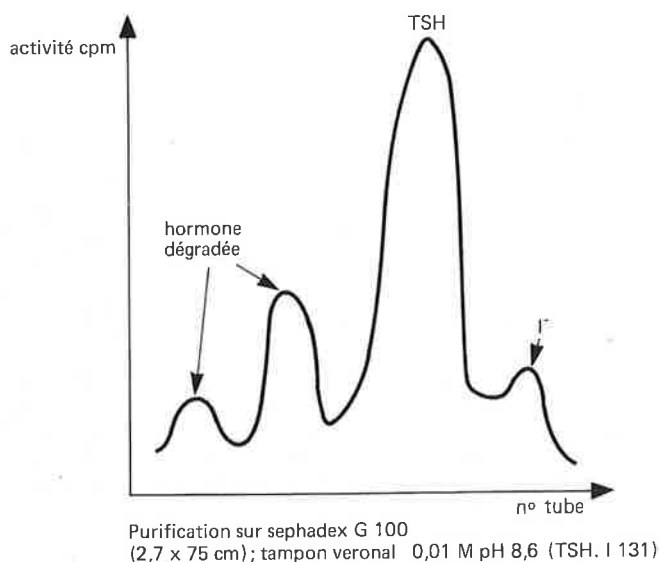


Figure 10. Purification après marquage de TSH marquée.

A. II. 3. Vérification de la pureté physico-chimique et de la réactivité vis à vis de l'anticorps.

Cette vérification est indispensable pour préciser les conditions de conservation et le délai de péremption. En effet, la radiolyse et la destruction moléculaire provoquée par la désintégration d'un atome radioactif («decay catastrophe») conduisent à des modifications sensibles de la composition de la solution.

Ex : chromatographie électrophorèse de l'insuline marquée (Figure 11).

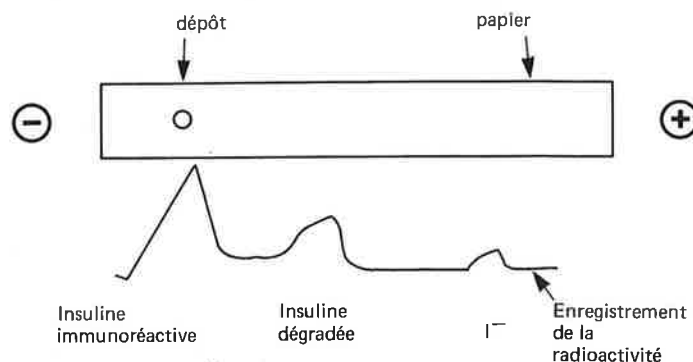


Figure 11. Contrôle de la pureté de l'insuline marquée.

A. III. Problèmes posés par l'antigène

Il est indispensable que l'antigène standard et l'antigène présent dans l'échantillon biologique aient le même comportement au sein du système d'analyse. La preuve en est généralement faite par le test de dilution que nous avons déjà analysé plus haut.

Le problème ne se pose pas lorsque l'antigène possède une structure connue et qu'il a pu être synthétisé. Les standards sont alors décrits en unités de masse.

Dans le cas des hormones peptidiques, on utilise encore fréquemment les unités d'activité biologique, comme c'est le cas avec les extraits purifiés. Il arrive même d'avoir à employer un extrait isolé à partir d'une autre espèce animale (le système est dit hétérologue) : dans ce cas, l'importance de l'étude des réactions croisées est encore plus marquée.

Dans le cas des standards primaires d'hormones, il existe un Service Central, grâce auquel on peut espérer une certaine uniformité dans l'expression des résultats publiés.

En routine, les laboratoires ont le plus souvent accès à des standards secondaires, calibrés par rapport aux standards précédents.

B. Problèmes méthodologiques

Nous allons maintenant analyser dans un premier temps les problèmes rencontrés lors du mélange des réactifs et de la séparation des fractions (libres et liées) contenant l'antigène marqué. A ce sujet, nous voudrions signaler que les différentes opérations d'un dosage radioimmunologique se prêtent parfaitement à la mécanisation par automate, semi-automate ou à l'utilisation de systèmes plus simples comme les dilueurs et les distributeurs rencontrés en biochimie classique.

Dans un deuxième temps, nous exposerons les modes de traitement des données numériques fournies par le comptage (au passeur automatique) des échantillons radioactifs.

B. I. Incubation des réactifs

Les paramètres suivants, qui interviennent au moment de la réaction AG-AC, doivent faire l'objet d'une analyse : température et durée de l'incubation, force ionique, pH, présence de substances capables d'interférer.

B. I. 1. Température

La constante K qui régit l'équilibre AG-AC est plus élevée à basse température (Tableau VII). C'est la raison pour laquelle les dosages demandant une haute sensibilité sont effectués à 4 °C pendant une durée suffisante pour atteindre l'équilibre (soit 3 à 4 jours).

Tableau VII. Exemple de variation de K en fonction de la température.

Valeurs de la constante d'équilibre K (œstradiol + AC \rightleftharpoons œstradiol — AC) en fonction de la température	
θ (°C)	K ($\times 10^9$ L. M ⁻¹)
4	5,38
26	1,65
37	0,91

B. I. 2. Durée

L'élévation de température permet d'atteindre plus rapidement l'équilibre. Lorsque la gamme des concentrations utiles explorées permet de renoncer à une très grande sensibilité, il peut être intéressant de réaliser les incubations des réactifs à 37 °C pendant un laps de temps aussi court que 30 minutes.

N. B. Il est tout à fait possible d'effectuer la séparation des phases B et F avant l'équilibre, dans la mesure où standards et inconnus sont traités dans des conditions strictement identiques de durée et de température.

B. I. 3. pH

Il existe un pH optimum (généralement compris entre 6,8 et 8,6), qui doit être maintenu par utilisation d'une solution tampon.

B. I. 4. Force ionique

Les concentrations élevées en sels modifient le déroulement de la réaction antigène-anticorps; la force ionique du tampon doit être aussi réduite que possible (généralement 0,05 M).

B. I. 5. Composition du liquide biologique analysé (plasma le plus souvent)

Il faut ici signaler l'influence éventuelle de protéines, d'enzymes, d'anticorps circulants, de substances médicamenteuses.

● Effet des protéines

L'osmolalité et la teneur en protéines des solutions standards et des échantillons doivent être tenues rigoureusement identiques.

L'excès de protéines est un facteur non spécifique d'inhibition de la formation du complexe AG-AC. Le plus souvent, on essaie d'opérer

sur une dilution de plasma au $\frac{1}{10}$ (en pratique, 100 μ l de plasma dans un volume final de 1 ml).

● **Enzymes protéolytiques**

La présence d'enzymes protéolytiques a parfois été incriminée, Cet effet s'amenuise lorsqu'on réduit la durée d'incubation ou qu'on ajoute des inhibiteurs enzymatiques (tels que le mercaptoéthanol, le trasyolol, la benzamidine).

● **Anticorps circulants**

Dans certains cas, il y a lieu de rechercher l'existence d'anticorps endogènes circulants (ex : diabétiques traités par l'insuline).

La présence de tels anticorps, qui fausserait complètement le dosage, est décelée dans des tubes de contrôle où l'antisérum n'est pas introduit.

● **Substances médicamenteuses**

Les médicaments absorbés par le patient n'interfèrent que rarement dans les dosages dans la mesure où le volume de plasma utilisé est faible.

Par contre, il y a lieu de s'assurer que l'anticoagulant utilisé éventuellement lors du prélèvement de sang n'exerce pas d'influence.

Remarques importantes :

a) Une modification du mode opératoire classique de radioimmunologie permet souvent d'atteindre une meilleure sensibilité.

Les spécialistes appellent préincubation, le procédé qui consiste à laisser en contact l'antigène froid avec l'anticorps au moins 24 h avant l'addition de l'antigène marqué.

Le gain de sensibilité du test est généralement imputé à la réduction du temps de contact de l'antigène marqué avec les substances « non spécifiques » du sérum.

b) Contrôle des interférences non spécifiques : en règle générale, toute série de dosage comporte des tubes de contrôle où on ajoute l'antigène marqué et du tampon à la place de l'antisérum. Ces tubes, qui subiront le traitement commun, servent à déterminer la radioactivité retrouvée dans la fraction B malgré l'absence d'anticorps. Ils sont les témoins d'une liaison non spécifique de l'antigène.

B. II. Séparation des fractions B et F

Nous arrivons maintenant au paragraphe concernant la séparation des fractions de l'antigène libre ou liée.

Disons de suite qu'il n'existe pas de technique de fractionnement universelle. Un tel système devrait présenter les caractéristiques définies dans le tableau VIII.

Voici quelles sont les principales méthodes de séparation utilisées en routine (Tableau IX).

C. Discussion

Les différents points de la méthodologie du dosage radioimmunologique ont été présentés avec l'intention de faire ressortir aussi bien les avantages que les limitations. Il est temps du reste de faire remarquer que la radioanalyse, de la même façon que tout acte de biologie clinique, doit passer sous les fourches caudines d'un contrôle de qualité cohérent et régulier.

Dans la discussion qui va suivre, nous voudrions ajouter quelques éléments de réflexion, à partir desquels les perspectives d'avenir pourraient être dégagées. En particulier, nous souhaitons d'une part, préciser la place de la radioimmunologie au sein des techniques de la radioanalyse et d'autre part, comparer brièvement les avantages et les inconvénients de la méthode par rapport aux méthodes concurrentes.

C. I. La radioimmunologie et les autres techniques de la radioanalyse

La radioimmunologie représente l'une des variantes de l'analyse dite par compétition utilisant un réactif de liaison spécifique. Nous résumons l'essentiel des données concernant les protéines et les récepteurs membranaires.

Tableau VIII. Caractéristiques d'un système de séparation (B et F) idéal.

- Séparation complète.
- Reproductibilité.
- Pas d'influence sur la réaction AG + AC.
- Économie.
- Indifférence à l'égard des différences minimes de concentration en protéines (plasma \neq standards).

Tableau IX. Méthodes de séparation.

1. Précipitation non spécifique (Éthanol, acétone, PEG, Sulfate NH_4) \rightarrow B.
2. Immunoprécipitation \rightarrow B (Addition d'un 2^e anticorps dirigé contre la globuline constituant le premier).
ex. premier AC anti insuline: γ globuline de lapin.
Deuxième AC: sérum de mouton anti lapin.
3. Anticorps en phase solide \rightarrow B
 - paroi interne des tubes.
 - particules (sephadex, verre).
4. Adsorption de l'antigène \rightarrow F.
Suspensions de charbon, talc, silice, résine échangeuse d'ions, etc...

B. III. Mode d'exploitation des résultats

La courbe réponse - dose, établie à l'aide des solutions d'étalonnage, peut être construite selon différents procédés (Tableau X).

Tableau X. Mode d'exploitation des résultats numériques.

Comptages fournis par le passeur automatique d'échantillons.

Axe des Y : réponse	axe des X	Grapho obtenu
$B, F, \frac{B}{F}, \frac{B}{T}$	X = dose	curviline
B/B_0	Log X	sigmoïde
Logit B/B_0	Log X	droite
$(= \text{Log} \frac{B/B_0}{1 - B/B_0})$		

De nombreux modèles ont été proposés pour simuler la courbe réponse - dose ; quels que soient les fondements mathématiques retenus dans les programmes de traitement de données, on ne peut que constater que l'automatisation des calculs en radioimmunologie est devenue monnaie courante et surtout qu'elle est satisfaisante. La concentration obtenue doit *bien entendu* être éventuellement corrigée en tenant compte d'une dilution ou d'un coefficient d'extraction.

Tableau XI. Analyses par compétition à l'aide de systèmes non immuns.

	Molécule	Réactif
Hormones	T_4	TBG
	Cortisol	CBG
	Progestérone	PBP
	Testostérone	SBP
	œstradiol	
Substances non hormonales	Vit. B_{12}	f-intrinsèque
	Ac-folique	réductase
	AMP_c	Phosphodiesterases

C. I. 1 Analyses par compétition utilisant des systèmes non immuns

Les applications de ces techniques sont devenues assez peu nombreuses ; elles obligent le plus souvent à effectuer une extraction de la molécule à partir du liquide biologique (Tableau XI).

C. I. 2 Analyses à l'aide de récepteurs cellulaires.

La première étape de la stimulation hormonale est représentée le plus souvent par la liaison d'une hormone à un constituant cellulaire. On sait depuis 1970, dans le cas des hormones polypeptidiques que cette étape de reconnaissance s'effectue à l'aide de macromolécules situées dans la membrane plasmique des cellules.

Les membranes obtenues après homogénéisation des tissus cibles et fractionnement subcellulaire contiennent ces récepteurs sous une forme restée active (exemples dans le tableau XII).

Parmi les avantages, il faut souligner le fait que le récepteur ne reconnaît que les substances biologiquement actives (quelle que soit l'espèce).

Tableau XII. Exemples de dosages utilisant les récepteurs.

Hormone	Tissu
LH, HCG	Corps jaune testicule
FSH	testicule
Prolactine	glande mammaire
GH	foie
ACTH	surrénales
Glucagon	foie
Insuline	foie
Somatomédine	placenta

Exemple :

LH (α - β) : oui	LH - α seule	: non
	LH - β seule	: non
	FSH (séquence α identique)	: non

Dans le cas des hormones peptidiques, la manipulation d'une structure insoluble favorise l'isolement du couple hormone-récepteur. Cependant des inconvénients notables existent :

- les récepteurs des stéroïdes, d'origine cytoplasmique, sont solubles et relativement instables
- il est difficile d'obtenir un traceur radioactif conservant son activité biologique à l'issue du marquage
- il n'est pas toujours aisé de contrôler les conditions de milieu assurant une bonne reproductibilité de la liaison de l'hormone au récepteur.

La technique semble réservée pour un moment encore aux études de physiologie fine, notamment celles concernant les mécanismes d'action ; son application aux dosages en grande série est actuellement écartée.

C. II. Avantages et inconvénients de la radioimmunologie

C. II. 1 Les avantages

Qualité des résultats (sensibilité, spécificité).
Rapidité d'exécution.

Tableau XIII. Disciplines médicales et biologiques concernées par la radioanalyse.

- Hormonologie. Physiologie. Biochimie. Endocrinologie classique ; obstétrique ; gastroentérologie ; Cardio-néphrologie.
- Pharmacologie. Thérapeutique.
- Cancérologie.
- Allergo-immunologie.
- Hématologie.
- Rhumatologie.
- Bactériologie. Virologie. Parasitologie.

Rentabilité (travail en grande série).

Universalité (nombre de disciplines concernées). Tableaux XIII à XVII.

Tableau XIV. Dosages hormonaux.

- Hypothalamus LH, RH, TRH.
- Hypophyse (ante)
Stimulines ACTH, LH, FSH, TSH.
h. à action directe STH, MSH, LPH, prolactine.
- Post hypophyse : vasopressine, ocytocine.
- Thyroïde T_3 , T_4 .
- Tractus G.I : gastrine, secretine, CCK-PZ.
- Pancréas : Insuline, glucagon.
- Métabolisme P-Ca : Parathormone, calcitonine.
- eau et électrolytes : vasopressine, aldostérone.
- Vasomotricité : angiotensines, kinines.
- Chorion : HCG, HCS.
- Stéroïdes surrénales : cortisol...
- Stéroïdes gonades : œstradiol, progesterone, ... testostérone...

Tableau XV. Dosage de médicaments et de stupéfiants.

- Cardiotoniques : digitoxine, digoxine gitaloxine gitoxine ouabaine acétylstrophanthidine proscillaridine.
- Barbituriques : Barbital, Phénobarbital, secobarbital, Pento-barbital.
- Drogues, stupéfiants : Morphine héroïne tetrahydrocannabinol LSD mézcaline amphétamines nicotine, cotinine.
- Stéroïdes.
- Anticonvulsivants, relaxants... : Diphénylhydantoïne tubocurarine, phénothiazines, diazepam, pentazocine.
- Antibiotiques : Penicilline gentamicine...
- Divers : Probenecide glibenclamide...

Tableau XVI. Dosages des protéines.

- Enzymes : amylase lipase trypsine chymotrypsine carboxypeptidase élastase esterase fructose 1.6 diphosphatase dopamine β -hydroxylase, phosphatase alcaline.
- Protéines.
Albumine, hémoglobine F.
Immunoglobulines IgE, A, G, M.
 β_2 -microglobuline.
Lipoprotéines.
Fibrinogène plasminogène prothrombine. TBG, neurophysine, lactoferrine, rétinol-BP Erythropoïétine, ferritine.

Tableau XVII. Applications diverses.

- Médiateurs, précurseurs, métabolites.
AMP cyclique GMPc sérotonine ARN messenger Thymidine.
- Acides gras polyénoïques : prostaglandines.
- Vitamines : A, B_{12} , D, D_3 .
- Toxines : St-Aureus Cl-Botulinum.
- Antigènes : α -foetoprotéine, antigène carcinoembryonnaire, phosphatase alcaline placentaire, sulfoglycoprotéine fœtale.
- Antigène australie.
- Antigène associé à l'helminthiase, à la schistosomiase.
- Divers : anticorps anti ADN, facteur rhumatoïde, facteurs de croissance (nerf, épiderme) parotine, properdine etc...

C'est assurément l'endocrinologie qui a bénéficié le mieux de l'apport de la radioimmunologie. Tableaux XVIII et XIX.

C. II. 2 Les inconvénients

Certains ne lui sont pas particuliers. Tableaux XX et XXI.

Tableau XVIII. Apport de la radioimmunologie à l'endocrinologie.

1. Diagnostic d'états pathologiques caractérisés par un excès ou un défaut de sécrétion.
2. Étude des systèmes de régulation.
3. Mise en évidence d'une normalisation ou d'une altération d'une concentration sanguine hormonale.

Tableau XIX. Principales applications de la radioanalyse en endocrinologie.

Insuline: hypoglycémies organiques, dépistage fin diabète latent.
 STH: acromégalie nanisme.
 FSH: Hypogonadisme masculin, oligozoospermie.
 LH: anomalies cycle menstruel, anomalies puberté, pathologie hypothalamohypophysaire.
 TSH: hypothyroïdie.
 Prolactine: galactorrhées, stérilité, tumeurs.
 Parathormone: surveillance traitement insuffisance rénale.
 HCS: surveillance grossesse.
 HCG: môle hydatiforme, choriocarcinome.
 Aldostérone: syndrome Conn. Troubles Na^+K^+ .
 Angiotensine: hypertension artérielle.
 T_3 , T_4 : Pathologie thyroïdienne.
 Stéroïdes CS: Pathologie CS. Cushing. Addison.
 Stéroïdes gonadiques: Stérilités d'origine endocrinienne.

Tableau XX. Inconvénients de la R.I.

1. Lourdeur et coût de l'équipement.
2. Réglementation concernant les isotopes.
3. Problèmes de radioprotection (surtout en cas de marquage).
4. Radiolyse des antigènes marqués.
5. Mauvaises performances en certains domaines.
 Standards humains controversés ou inexistantes.
 Problème des déterminants antigéniques sans activité biologique.

Tableau XXI. Organisation d'un département complet de radioanalyse (utilisation des trousse exclue).

Laboratoires d'analyse avec matériel de pipettage, de centrifugation, de réfrigération (automates et semi-automates souhaitables).
 Laboratoire de recherche et de développement.
 Unité de marquage et de purification des molécules marquées.
 Unité de production d'anticorps.
 Matériel de détection (passeurs β , γ). et de traitement des données.
 Autres unités.

C. III. Présentation de techniques concurrentes non isotopiques

Les contraintes de la réglementation sur l'utilisation des isotopes ont sans aucun doute grandement contribué au développement de méthodes visant à concurrencer et même à supplanter les dosages décrits plus haut. Voici, rassemblées dans un tableau, ces différentes

Tableau XXII. Les ressources de l'immunologie.

- Techniques sans marqueur: nephelométrie; immunodiffusion radiale; électroimmunodiffusion; immunoélectrophorèse.
- Techniques avec marqueur.
 1. Particules indicatrices d'une agglutination (hématies, latex...).
 2. Substances fluorescentes.
 3. Enzymes.
 4. Bactériophages.
 5. Radicaux libres.

méthodes qui, à l'exception des techniques de chromatographie gazeuse (associée à la spectrométrie de masse) utilisent les ressources de l'immunologie. Tableau XXII.

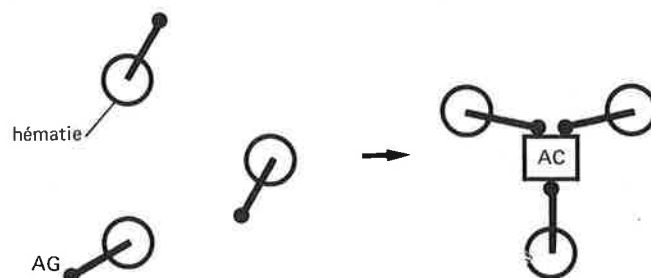
Les radioisotopes, vecteurs d'une énergie captée à l'aide d'un détecteur approprié, n'ont pas le monopole du transport d'information.

Il est possible d'utiliser aussi :

a) des particules ou cellules, indicatrices visuelles d'une agglutination (Figure 12).

hématies : hémagglutination (nombreuses variantes)
 latex : agglutination du latex.

Principe de quelques méthodes utilisant l'hémagglutination



- 1 - application aux anticorps
- 2 - détection des antigènes solubles par la technique d'inhibition de l'hémagglutination.

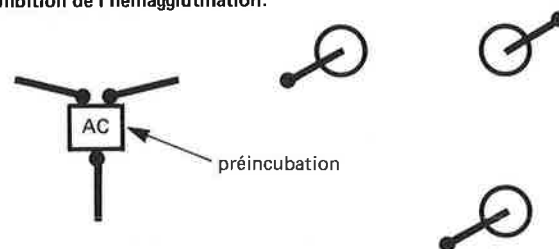


Figure 12. Principe de quelques méthodes utilisant l'hémagglutination.

Ici le déterminant antigénique est adsorbé ou lié de manière covalente, sur des hématies. En présence d'anticorps polyvalents, on assiste à une union de cellules séparées au préalable.

On détermine quelle est la dilution de l'échantillon qui provoque une agglutination décelable (mesure de la concentration en anticorps).

Une variante (inhibition de l'hémagglutination) permet la détection des antigènes solubles.

On effectue une préincubation de l'anticorps (réactif en quantité constante) avec différentes dilutions de l'antigène à mesurer.

Ces techniques possèdent une très bonne sensibilité. Dans certains cas, elles sont en passe de supplanter la radioanalyse (ex. antigène Australia). Elles ont été proposées pour doser la morphine dans l'urine (sensibilité : 0,8 ng/ml).

- Avantages : rapidité, simplicité, économie.
- Inconvénients : préparation et conservation des réactifs, adsorptions non spécifiques.

b) des substances fluorescentes :

Techniques d'immunofluorescence, beaucoup utilisées en histochimie. On utilise des substances fluorescentes couplées à l'antigène ou à l'anticorps.

c) des enzymes.

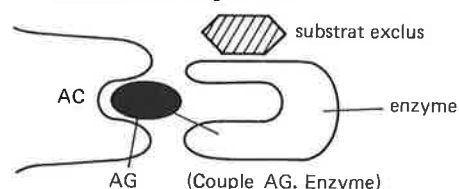
La théorie du dosage immunoenzymologique est identique à celle du dosage r.i. Le traceur radioactif est remplacé par une enzyme couplée à l'antigène. Lorsque la réaction atteint l'équilibre, les fractions libres et liées sont séparées et on mesure une activité enzymatique à l'aide de procédés photométriques.

Nous avons choisi d'illustrer l'intérêt de ces techniques par un exemple

de dosage immunoenzymatique en phase homogène. Cette variante est en effet particulièrement élégante, dans la mesure où la *séparation des fractions B et F n'est pas nécessaire*. (Figure 13).

Principes d'un dosage immunoenzymatique en phase homogène.

1. en l'absence d'antigène libre



2. en présence d'antigène libre

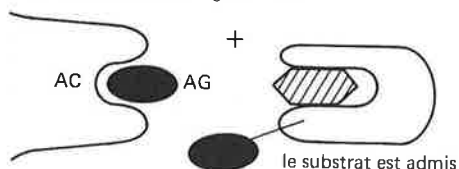


Figure 13. Principes d'un dosage immunoenzymatique en phase homogène.

- en l'absence d'antigène libre, le couple AG-enzyme se fixe à l'anticorps de telle sorte que les groupements actifs de l'enzyme ne peuvent agir sur un substrat spécifique,

- l'addition d'antigène lève l'inhibition de l'activité enzymatique dans la mesure où cet antigène libre prend la place du couple AG-enzyme.

L'immunoenzymologie est en pleine expansion. Elle a déjà été employée avec succès dans le dosage de l'HCS, de l'insuline, de certains stéroïdes et des médicaments. Elle présente l'incontestable avantage de pouvoir être appliquée au dosage des substances fragiles qui supportent mal l'addition d'un traceur radioactif ;

Comme inconvénients, signalons l'allongement du protocole opératoire (il faut laisser agir l'enzyme sur le substrat) ; elle ne semble pas encore compétitive avec la Ri dans le domaine de l'endocrinologie où sa sensibilité est parfois insuffisante.

d) des bactériophages (viroimmunologie)

Il s'agit là d'une levée par un antigène de l'inhibition de l'activité d'un phage (modifié). (Figure 14).

Principe du dosage viro-immunologique

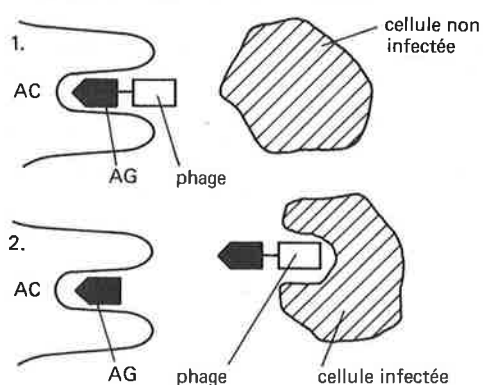


Figure 14. Principe du dosage viroimmunologique.

D. Perspectives d'avenir pour la radioimmunologie et la radioanalyse

Il ne faudrait pas conclure à partir de l'examen rapide des techniques concurrentes, que la radioanalyse vit ses dernières années ! Même les experts les plus «antiradioanalyse» donnent encore 15 à 20 ans à la méthode.

Ici, en bout de chaîne, on mesure le taux de croissance de la bactérie correspondante.

Cette technique dite du «viroimmunoassay», préconisée en France par l'équipe de Dray (Institut Pasteur) a été appliquée à notre connaissance aux prostaglandines, à l'œstradiol et aux radicaux pénicilloyles.

e) des radicaux libres.

Là encore, on assiste à la réapparition du signal associé à un radical libre que la liaison à un anticorps de l'haptène porteur avait en quelque sorte étouffé. (Figure 15).

Principes du dosage immunologique utilisant les radicaux libres

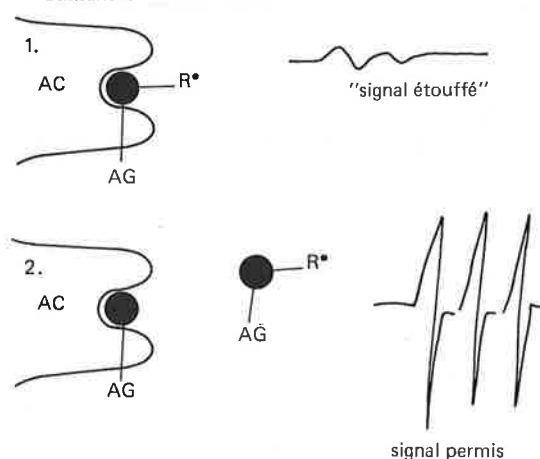


Figure 15. Principe du dosage immunologique utilisant les radicaux libres.

Le détecteur en fin de chaîne est ici un spectromètre de résonance de spin électronique qui étudie les modifications du spectre d'un atome placé dans un champ magnétique ; parmi les radicaux proposés, signalons le nitrosyle (spectre à 3 lignes).

Les spécialistes (U.S.A.) de la technique d'immunoessai utilisant un marquage de résonance du spin de l'électron insistent sur la rapidité du dosage.

Le dosage de la morphine dans les urines demanderait de 1 à 2 minutes ; il semble y avoir des problèmes avec les analyses portant sur le plasma en raison de la concentration importante des protéines.

Il est intéressant de donner ici les résultats d'une confrontation entre 3 méthodes non isotopiques et la radioimmunologie, utilisées par des spécialistes pour le dosage de la morphine dans les urines (Tableau XXIII).

Tableau XXIII. Étude comparative des performances de quelques dosages immunologiques.

Molécule étudiée : morphine.		
Liquide biologique : urines.		
	Seuil de détection	Durée d'un essai ou cadence
Inhibition de l'hémagglutination	3 ng/ml	50 à 50 par h
Immunoenzymologie	0,5 µg/ml	1 min. par essai
Résonance spin électronique	0,5 µg/ml	500 par jour
Radioimmunologie	0,1 µg/ml	

- implantation en analyse de grande routine,
- formation des cadres (médecins, pharmaciens, biochimistes, chimistes, etc...),
- orientation générale (axes de recherche).

Pour durer, la radioanalyse devra :

1. Maintenir à un bon niveau et multiplier les dosages qui font l'intérêt actuel de la radioimmunologie : endocrinologie, pharmacologie, cancérologie...

C'est dire toute l'importance du contrôle de qualité pour que s'installe et demeure la confiance entre le biologiste et le clinicien.

2. Profiter des progrès en chimie, en immunologie, en physiopathologie, pour faire passer les techniques les plus utiles du laboratoire de recherche au laboratoire de routine.

Citons, comme exemple, l'AMP cyclique qui, étudié en tant que médiateur hormonal cellulaire, voit ses indications cliniques se préciser (étude de la réponse à la parathormone) ; également les kinines, les hormones hypothalamiques, certaines hormones antehypophysaires (MSH, LPH) ou posthypophysaires, les prostaglandines ; les problèmes d'allergie et d'immunopathologie (anticorps anti ADN, facteur rhumatoïde, anticorps antithyroglobuline), ceux également rencontrés en bactériologie, virologie, parasitologie.

3. Développer les techniques d'analyse par saturation utilisant les récepteurs tissulaires.

E. Quelques références utiles à consulter

Généralités.

Berson S.A. and Yalow R.S., Methods in investigative and diagnostic endocrinology. Vol. 2 A / 2 B. North Holland Publ. Co., Amsterdam 1973.

Margoulies M., Protein and polypeptides hormones. Excerpta Medica Foundation, ICS 161, Symposium International Liege 1968

Hayes R.L., Goswitz F.A. and Murphy B.E.P., Radioisotopes in medicine ; in vitro studies. USAEC, oak Ridge 1968

A.I.E.A., In vitro procedures with radioisotopes in chemical medicine and research, A.I.E.A., Vienne 1970 (et 1973)

INSERM, Séminaire sur les techniques radioimmunologiques, INSERM Paris 1972

Bizollon C.A. et membres du comité d'organisation, Compte-rendus du colloque international de radioimmunologie de Lyon, Lyon, 1972, 1974, 1976.

Antisérums

Volume 23 (n° 10) (décembre 1975) de Pathologie et Biologie. Articles de Court G. : The production of antibodies for radioimmunoassay (p. 859-862) et Malvano R. and Rollieri E. : Antiserum characteristics and assay quality (p. 863-868)

Odell W.D. and Daughaday W.H., Principles of competitive protein binding assays. J.B. Lippincott Co, Philadelphia 1971. Articles de Odell W.D. et al. : Production of antisera for radioimmunoassays (p.57-88) et Abraham G.E. and Grover P.K. : Covalent linkage of steroid hormones to protein carriers for use in radioimmunoassay (p. 140-157).

Théories mathématiques en radioimmunologie

Berson S.A. and Yalow R.S., Quantitative aspects of reaction between insulin and insulin binding antibody, *J. Clin. Investig.*, 1959, **38**, 1996.

Ekins R.P., Radioimmunoassay, protein binding and other saturation assay techniques. Year Book of Nuclear Medicine, Year Book Medical Publ., Chicago 1973

Feldman H. and Rodbard D., Mathematical theory of radioimmunoassay, dans Odell W.D. and Daughaday W.H., Principles of competitive protein-binding assays, J.B. Lippincott Philadelphia 1971, p. 158-203

Scatchard G., The attraction of proteins for small molecules and ions, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1949, **51**, 660-672

La liaison au récepteur étant un intermédiaire obligatoire dans le mécanisme d'action cellulaire des hormones, le dosage fait appel à la fonction physiologique elle-même. On étudie donc la réceptivité tissulaire :

- concentration des récepteurs dans les organes cibles,
- réceptivité de l'organe,

Ceci se révèle particulièrement intéressant dans les cas suivants :

- reproduction,
- diabétologie,
- cancérologie (c'est ainsi qu'on peut actuellement différencier les tumeurs hormono dépendantes).

On a avancé récemment l'hypothèse de l'existence de récepteurs des œstrogènes et de la progestérone. Chez une femme recevant un traitement hormonal pour un cancer du sein, la réponse dépendrait de la présence de ces deux types de récepteurs.

Chez les femmes qui n'ont pas les 2 récepteurs (environ 70 %), le traitement hormonal et la castration sont inefficaces.

La radioimmunologie, en situation de challenger pendant les années 1960, a conquis une position dominante dans le domaine de l'analyse biomédicale ; son introduction a permis des explorations jusque-là interdites, ouvrant des voies qui vont être désormais accessibles dans un certain nombre de cas à des techniques concurrentes. Il appartient aux responsables de laboratoire d'apprécier au mieux les limites de chacune des techniques avant d'affronter investissement et reconversion.

Nisonoff A. and Pressman D., Heterogeneity and average combining constants of antibodies from individual rabbits, *J. Immunol.*, 1958, **80**, 417-428

Abraham G. and Odell W.D., dans Immunological methods in steroid determination, Appleton Century Crofts, New York, 1970, p. 87

Sips R., On the structure of a catalyst surface, *J. Chem. Phys.*, 1948, **16**, 490.

Marquage des antigènes (et des haptènes)

Hunter W.M. and Greenwood F.C., Preparation of iodine 131 labeled growth hormone of high specific activity, *Nature*, 1962, **194**, 495

Rao Chervu L. and Murty D.R.K., Radiolabeling of antigens : procedure and assessment of properties, *Seminars Nucl. Med.*, 1975, **5** (2), 157-172

Theorell J.I. and Johansson B.G., Enzymatic iodination of polypeptides with I-125 to high specific activity, *Biochim. Biophys. Acta*, 1971, **251**, 363-369

Rosa U. et al., Chemical and biological effects of iodination on human albumin, *Biochim. Biophys. Acta*, 1967, **133**, 486-498

Midgley A.R. et al., A general procedure for the estimation of steroidal and other haptenic substances, *Steroids*, 1969, **13**, 731-737.

Standards pour dosages radioimmunologiques

A.I.E.A., Standardization of radioimmunoassay procedure, Report of an A.I.E.A. Panel, *Int. J. Appl. Rad. Isot.*, 1974, **25**, 145-160

Bangham D.R. and Cotes P.M., Standardization and standards, *Brit. Med. J.*, 1974, **30** (1), 12-17

Mécanisation des opérations manuelles

Ingrand J. et al., Etat actuel de l'automatisation des dosages radioimmunologiques, *J. Biol. Méd. Nucl.*, 1974, **9** (35), 22-41

Robyn C., Bagshawe K.D., Table ronde sur l'automatisation en radioimmunologie, C.R. III^e colloque de radioimmunologie de Lyon, 1976, p. 437-463.

Exploitation des calculs ; emploi des ordinateurs

Rodbard D., Statistical quality control and routine data processing for radioimmunoassays and immunoradiometric assays, *Clin. Chem.*, 1974, **20**, 1255-1270

Chang P.C. et al., Optimal statistical design of radioimmunoassays and competitive protein binding assays, *Endocrinol.*, 1975, **96**, 973
Healy M.J.R., Statistical analysis of radioimmunoassay data, *Biochem. J.*, 1972, **130**, 207
Venot A. et al., Automatisation sur miniordinateur des calculs en radioimmunologie ; choix des méthodes. *J. Fr. Biophys. Med. Nucl.*, 1977, **1** (1), 11-18
Valleron A.J., Méthodes statistiques en radioimmunologie, Séminaire INSERM sur les techniques radioimmunologiques, Paris 1972, p. 149.

Autres méthodes de la radioanalyse

Ekins R.P., Radioimmunoassay and saturation analysis ; Basic principles and theory, *Brit. Med. Bull.*, 1974, **30**, 3
Murphy B.E.P., Hormone assay using binding proteins in blood, dans Odell W.D. and Daughaday W.H., Principles of competitive binding assays, J.B. Lippincott Co, Philadelphia 1972, p. 108
Miles L.E.M. and Hales C.N., The use of labeled antibodies in the assay of polypeptide hormones, *J. Nucl. Biol. Med.*, 1969, **13**, 10
Zettner A. and Duly P.E., Principles of competitive binding assays (saturation analysis). II. Sequential saturation, *Clin. Chem.*, 1974, **20**, 5-14
Korenman S.G., Radioligand binding assay of specific oestrogens using a soluble uterine macromolecule, *J. Clin. Endocrinol. Metabol.*, 1968, **28**, 127
Haour F., Les récepteurs hormonaux comme moyen d'investigation, C.R. III^e Congrès Lyon, 1976, p. 301.

Techniques d'analyse concurrentes n'utilisant pas les radioisotopes.

Van Weemen B.K. and Schuurs A.M.W., Immunoassay using haptenzyme conjugates, *F.E.B.S. Letters*, 1972, **24**, 77
Rowley G.L. et al., Mechanism by which antibodies inhibit haptenzyme deshydrogenase conjugates. An enzyme immunoassay for morphine, *J. Biol. Chem.*, 1975, **250**, 3759
Feldman H. et al., First international symposium on immunoenzymatic techniques, Symposium INSERM, North Holland Publ. Co., Amsterdam 1976.
Avrameas M.S. et Guilbert B., Dosage immunoenzymologique de protéines à l'aide d'immunoabsorbants et d'antigènes marqués aux enzymes, *C.R. Acad. Sci.*, 1971, **273**, 2705
Engvall E. and Perlmann P., Enzyme linked immunosorbent assay, Quantitative assay of immunoglobulin G, *Immunochemistry*, 1971, **8**, 871
Mule S.J. et al., Immunoassays for drugs subject to abuse, C.R.C. Press, Cleveland 1974
Dray F. et al., Immunochemical detection of prostaglandins with prostaglandin-coated bacteriophage T₄ and by radioimmunoassay, *Anal. Biochem.*, 1972, **50**, 399
Leute R.K. et al., Spin immunoassay technique for determination of morphine, *Nature*, 1971, **236**, 253
Hawks R.L., Gas chromatographic mass spectrometry in drug screening by immunoassay in Mule S.J. et al., Immunoassays for drugs subject to abuse, C.R.C. Press Cleveland 1974, p. 73
Waller G.R., Biochemical applications of mass spectrometry, Wiley Interscience, New York, 1972.