

## Tests immunologiques à l'aide des complexes organométalliques. Un nouveau concept \*

par Michael Caïs

(Department of Chemistry Technion, Israël Institute of Technology, Haïfa, Israël.)

### I. Introduction

Le contrôle quantitatif précis des substances chimiques dans les fluides biologiques est devenu l'un des plus importants outils auxiliaires dans les études pharmacocinétiques, dans le traitement chimiothérapeutique des maladies, dans la toxicologie légale, ainsi que dans différents aspects en relation avec les nombreux problèmes survenant avec l'usage répandu des médicaments. Bien que moins de deux décades se soient écoulées depuis le travail des pionniers Yadow et Berson (1) sur le dosage de l'insuline dans le plasma, les tests radioimmunologiques (TRI) sont devenus aujourd'hui une des techniques de pointe pour la détermination des molécules biologiquement actives et de leurs métabolites dans les fluides physiologiques.

Le principe des TRI est basé sur la réaction spécifique de liaisons des protéines entre un antigène (ou haptène) et un anticorps (figures 1 et 2). Une quantité variable d'antigène et une quantité constante d'antigène marqué avec un isotope radioactif, tels  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$  ou  $^{125}\text{I}$ , sont mis en compétition pour la réaction d'attachement à un nombre constant et limité de sites d'anticorps jusqu'à ce que l'équilibre soit atteint.

Le complexe anticorps-antigène est séparé de l'antigène libre, non lié, et la quantité d'antigène libre et/ou lié est déterminée en mesurant la radioactivité des phases séparées. Bien que cette technique présente une grande sensibilité et une grande spécificité, le TRI souffre d'un certain nombre d'inconvénients dont quelques-uns sont énumérés sur la figure 3.

<b>Antigènes :</b>	Substances qui déclenchent la formation des, et réagissent avec les └───────────┬───────────┘ Anticorps
<b>Antisérum :</b>	Sérum qui contient des anticorps par suite de l'injection d'antigènes.
<b>Haptènes :</b>	Petites molécules (P.M. < 5 000) qui manifestent des propriétés antigéniques seulement quand elles sont liées par covalence à une macromolécule porteuse.

Figure 1. Définitions.

<b>Réaction immunologique :</b> Anticorps + Antigène $\rightleftharpoons$ complexe anticorps-antigène $\text{AC} + \text{Ag} \rightleftharpoons \text{Ac} - \text{Ag}$ Constante de liaison : $K = \frac{[\text{Ac} - \text{Ag}]}{[\text{Ac}][\text{Ag}]}$ [Ag] $\rightarrow$ conc. en sites Ag se combinant séparément [Ac] $\rightarrow$ conc. en sites Ac se combinant séparément.
<b>Test de liaison des protéines compétitives</b> Une quantité variable de Ag et une quantité constante de Ag marqué sont en compétition pour se lier à une quantité limitée et constante des sites de Ac.

Figure 2. Réaction immunologique

\* Conférence présentée à l'Assemblée annuelle de la Société Chimique de France, le 31 mai 1978, à Clermont-Ferrand.

1. Coût élevé des isotopes
2. Coût élevé de l'équipement de comptage de radioactivité
3. Risques pour la santé dans la préparation et l'utilisation des haptènes marqués avec des isotopes
4. Une compétence spéciale est nécessaire dans l'utilisation des isotopes
5. Variété limitée des isotopes utilisables
6. Problèmes dans l'introduction de l'isotope dans la molécule d'haptène
7. Courte durée de conservation des haptènes marqués
8. Des temps de comptage prolongés sont nécessaires avec des haptènes tritiés de faible activité spécifique.

Figure 3. Inconvénients du test radioimmunologique

Ces dernières années, il y a eu un effort important dans le développement d'autres procédés analytiques qui utilisent les anticorps pour leur grand intérêt en ce qui concerne la spécificité et la sensibilité mais n'emploient pas d'isotope radioactif.

On appelle ces méthodes des tests immunologiques non isotopiques. Un exemple de test non isotopique est la technique du test par radical libre (TRL) dans lequel le haptène est marqué avec un radical nitroxyde stable, un marqueur de spin. (2) En solution, le haptène ainsi marqué peut se mouvoir par une agitation libre et désordonnée et donner naissance à un signal (RPE) isotrope à trois raies. Cependant quand le haptène marqué est lié à la grosse molécule d'anticorps, la mobilité du radical libre est considérablement réduite et on observe un élargissement anisotrope de la raie du signal RPE. En présence du haptène non marqué, l'espèce non marquée est déplacée du complexe anticorps-haptène, elle retrouve sa mobilité et on observe une augmentation du signal RPE. La concentration en haptène non lié est proportionnelle à l'intensité du pic RPE. Sur la figure 4 est représenté schématiquement le principe de la technique (TRL). Nous présentons quelques résultats de nos travaux sur ce système au chapitre III.

Les principaux inconvénients de cette méthode sont le prix élevé de l'équipement RPE et son utilisation limitée à la seule détection de petites molécules de haptène. Un autre exemple de marquage non isotopique est le développement des tests immunologiques par marquage avec des enzymes. Un tel système est commercialisé sous le nom de EMIT (enzyme multiplied immunoassay technique) technique dans laquelle l'haptène est marqué par une enzyme active le lysozyme capable de casser la paroi des bactéries. Les molécules de haptène attachées à la surface du lysozyme n'interfèrent pas avec l'activité enzymatique. Quand les anticorps sont liés à ces haptènes marqués, le substrat est stériquement entravé dans son approche des

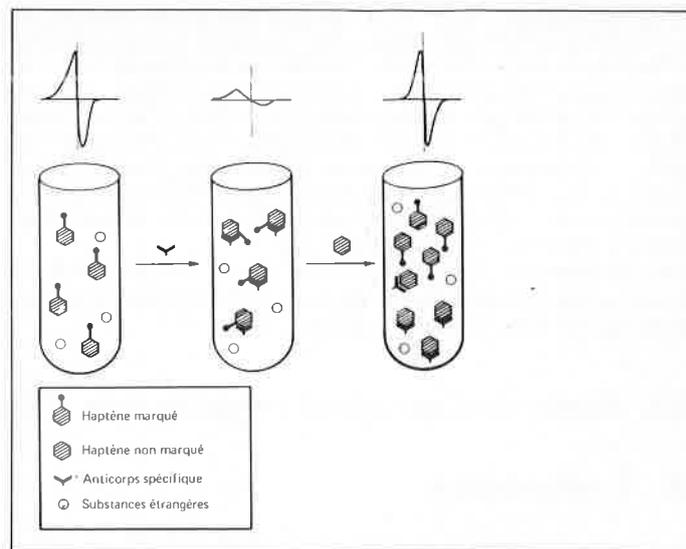
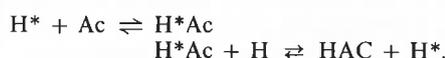


Figure 4. Représentation imagée de la technique du test immunologique par radical libre (TRL).



sites de l'enzyme active. L'haptène non marqué déplace l'haptène marqué et il en résulte une augmentation de l'activité enzymatique. En mesurant les densités optiques à la fois au départ et à la fin de l'analyse, on peut déterminer la quantité de haptène non marqué dans l'échantillon inconnu. Ces deux dernières méthodes, (TRL et EMIT) ont été qualifiés (2, 4) d'immunotests homogènes pour indiquer que ce test n'exige pas la séparation physique de l'antigène lié et non lié.

Dans cet exposé nous présentons des résultats de notre travail sur le développement d'un nouveau système non isotopique en vue d'études immunochimiques et d'applications aux tests immunologiques. Le concept de base de ce nouveau système est l'utilisation d'atomes métalliques, généralement sous forme de complexes organométalliques ou de coordination, comme agents de marquage des haptènes ou des antigènes macromoléculaires. Les composés marqués par un métal sont appelés des métalloantigènes et/ou métallohaptènes. Le test immunologique basé sur ces réactifs est appelé test métalloimmunologique (TMI).

## II. Test métalloimmunologique. Concepts généraux.

Le principe général des réactions compétitives d'attachement des protéines et la nomenclature appliquée au TMI sont donnés sur la figure 5.

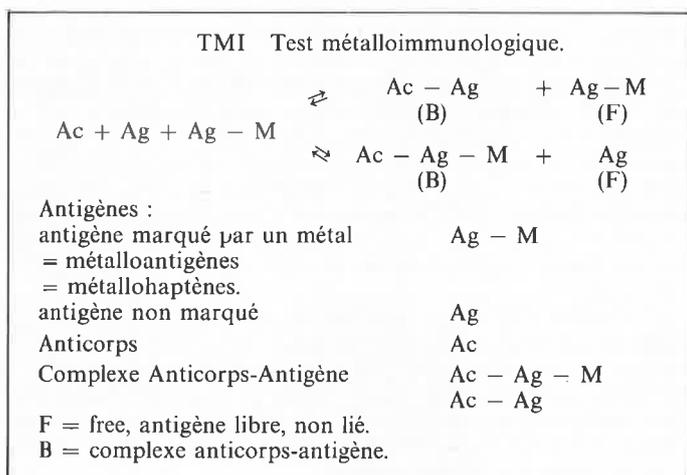


Figure 5. Principe et nomenclature du TMI.

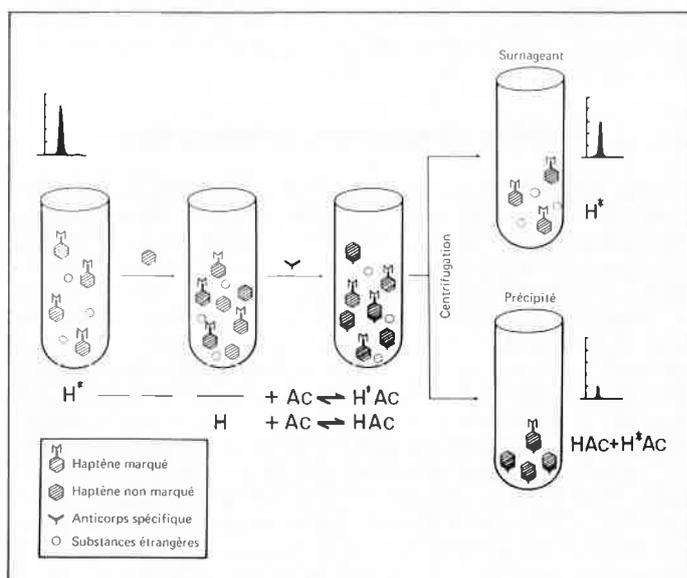


Figure 6. Représentation imagée du TMI.

Le métallohaptène (Ag - M) et l'antigène non marqué (Ag) réagissent avec les anticorps spécifiques (Ac) suivant les équations décrites sur la figure 5. Après séparations de l'antigène libre, non lié (Ag - M, Ag) des complexes anticorps-antigène (Ac - Ag - M, Ac - Ag), la quantité de métal présent dans la phase liée (B) ou/et dans la phase libre (F) est déterminée par une méthode analytique convenable (*vide infra*). La préparation d'une courbe d'étalonnage tracée pour des quantités standardisées de métallohaptène et d'antigène non marqué permet ensuite la détermination des quantités de substance analysée dans des échantillons inconnus.

Une représentation imagée du TMI est donnée par la figure 6.

Les principales composantes du développement d'un test métalloimmunologique sont résumées ci-dessous : (figure 7) :

#### Composantes du TMI

1. Production des anticorps spécifiques.
2. Synthèse des métallohaptènes.
3. Technique de séparation de l'antigène libre, non lié, du complexe anticorps-antigène.
4. Méthode analytique pour déterminer la concentration en métal.

#### Figure 7. Principales composantes d'un test métalloimmunologique.

Chacune de ces composantes sera traitée séparément dans les chapitres suivants (III-VI).

### III. Synthèse d'antigènes et production d'antisérum

#### III. 1. Introduction.

Les composés à faible poids moléculaire (P.M. 200-500) tels que les cannabinoïdes, la morphine, les barbituriques, les stéroïdes etc..., ne sont pas antigéniques. Cependant, unis de manière covalente à des macromolécules, tel le sérum albumine de bœuf (BSA, P.M.  $\approx$  65 000) les complexes se comportent comme immunogènes (en espèces hétérologues), déclenchant la production d'anticorps spécifiques du haptène de faible poids moléculaire.

Ces anticorps sont utilisés en tant que protéines liantes dans les tests immunologiques. Il est donc clair que le succès ou l'échec d'un test immunologique dépendra, par dessus tout, de la qualité de l'antisérum utilisé. Les deux critères principaux qui déterminent la qualité d'un antisérum, sont l'affinité et la spécificité. Dans ce domaine, des chercheurs ont déployé beaucoup d'efforts dans l'étude et la compréhension des facteurs qui gouvernent la spécificité et l'affinité des antisérums. En 1970, deux groupes (5, 6), démontrèrent que le site de conjugaison d'un stéroïde avec son porteur protéinique a un effet significatif sur la spécificité des antisérums et il est possible maintenant d'obtenir des antisérums de haute spécificité. Par contre, la production d'antisérums de haute affinité n'est pas encore à la portée du contrôle du chercheur. Chaque animal immunisé, de quelque espèce que ce soit, produira son propre antisérum particulier, qui peut être très différent de celui produit par un autre animal de la même espèce, même avec des procédés d'immunisation identiques. Il est donc obligatoire pour le chercheur travaillant dans ce domaine, de prêter le maximum d'attention et de soin à la question du haptène et du conjugué haptène-protéine car cette phase du processus est contrôlable en laboratoire. Une lecture de la littérature indique que, malheureusement, ceci n'a pas toujours été l'approche suivie par quelques-uns des chercheurs travaillant dans ce domaine.

Il y a plusieurs années, quand nous sommes intéressés à ce sujet de recherche, notre premier programme comportait la production d'antisérums anti-cannabinoïde. Quelques-uns des résultats sont présentés dans la prochaine partie.

#### III. 2. Synthèse d'antigènes cannabinoïdes.

Comme point de départ de ce projet, il y avait dans la littérature abondance de descriptions sur l'incorporation des techniques immunologiques dans le développement des méthodes analytiques pour l'examen en série des drogues dans les urines. Et fait surprenant, il y avait relativement peu de publications sur des tentatives pour développer ces méthodes dans l'identification des métabolites cannabinoïdes bien qu'il y eût une très notable expansion de la recherche sur les cannabinoïdes en sciences médicales, pharmacologiques, biologiques et chimiques (8). Peut être que l'une des raisons tenait aux difficultés sérieuses que l'on rencontrait dans la production des anticorps anticannabinoïdes (9). Un test radioimmunologique publié (10) pour le  $\Delta^1$ -tétrahydrocannabinol ( $\Delta^1$ -THC  $\equiv$   $\Delta^9$ -THC) a utilisé l'antisérum de chèvre obtenu contre un mélange d'isomères d'azo- $\Delta^1$ -THC (11). Les auteurs revendiquèrent (10) l'utilisation potentielle de leur méthode pour la détection du THC dans le plasma des usagers chroniques de marijuana, à condition que le test soit pratiqué dans les 15 minutes après avoir fumé. Dans un autre test (12) employant une combinaison de chromatographie gaz-liquide et

d'analyse par spectrométrie de masse, un semblable temps limite dans la détection du THC dans le plasma est notée. Un autre test a été publié (13); il utilise un antisérum de mouton et  $^3\text{H}$ -THC pour détecter THC dans le sang ou l'urine d'une personne ayant fumé une seule cigarette imprégnée de 5 mg de THC pur.

Nous avons entrepris la synthèse de protéines conjuguées avec les dérivés (II à VI) du  $\Delta^6$ -tétrahydrocannabinol ( $\Delta^6$ -THC), la production d'anticorps spécifiques des groupes hapténiques II à VI, la préparation d'haptènes marqués par des pièges à radicaux, VII à X, (figure 8) et l'utilisation de ces produits dans le développement d'un test immunologique à radicaux libres pour l'analyse des urines (2). Ce travail faisait partie d'une étude systématique entreprise pour déterminer la capacité du squelette structural cannabinoïde à déclencher la formation d'anticorps spécifiques. De plus, nous poursuivons la production de préparations d'antisérums optimales pour un usage approprié des tests immunologiques.

Les haptènes (figure 8) ont été couplés à deux porteurs ne donnant pas de réaction immunologique croisée, le sérum albumine de bœuf (BSA) et l'ovalbumine (OVA), par le procédé d'anhydride mélangée utilisant le chloroformiate d'isobutyle dans le diméthylformamide. Le degré de conjugaison, *n*, (figure 8) a été déterminé par analyse UV différentielle.

Des lapins ont été immunisés par des injections sous-cutanées multiples dans le flanc, la nuque et la croupe d'une émulsion d'adjuvant total de Freund et du conjugué approprié cannabinoïde-BSA. Les prises de sang furent effectuées avant l'immunisation (pour le sérum normal) et chaque semaine après l'immunisation. Des injections de rappel furent faites à des intervalles réguliers de six semaines. Les sérums des prises de sang entre les rappels furent réunis.

A partir des antisérums réunis et des sérums normaux on prépara des immunoglobulines par précipitation par le sulfate d'ammonium suivie d'une dialyse contre un tampon salin phosphate 0,01 M, de pH 7,3.

Les tests immunologiques furent réalisés en utilisant à la fois les réactions de précipitation classiques avec inhibition de la précipitation par le haptène et les techniques de test immunologique avec radicaux libres. Les courbes de précipitation obtenues dans des tests quantitatifs montrent que les antisérums produits contenaient des anticorps à la fois du haptène et du porteur (BSA). Ceci fut démontré par la précipitation du BSA avec ou sans conjugaison avec le haptène, par la précipitation du conjugué haptène-OVA par des antisérums qui ne reconnaissaient pas l'OVA seule et par l'inhibition de la précipitation du haptène-OVA par du haptène libre. Les sérums normaux prélevés avant immunisation n'ont réagi avec aucun des antigènes testés. La quantité d'anticorps spécifiques anticannabinoïdes trouvée dans divers sérums variait de 0,3 mg/ml à 1,9 mg/ml.

Les haptènes VII à X marqués par des pièges à radicaux ont été préparés par couplage des dérivés acide carboxylique respectifs avec l'amino-3 tétraméthyl-2,2,5,5 pyrrolidinoxyle-1 (en utilisant la dicyclohexylcarbodiimide comme agent de couplage) et employés pour caractériser les anticorps anticannabinoïdes par une technique de radicaux libres à liaison compétitive, analogue à celle déjà décrite pour les anticorps antimorphine (2).

Une solution contenant des quantités appropriées connues de  $\gamma$ -globuline spécifique et de haptène marqué par piège à radicaux a été

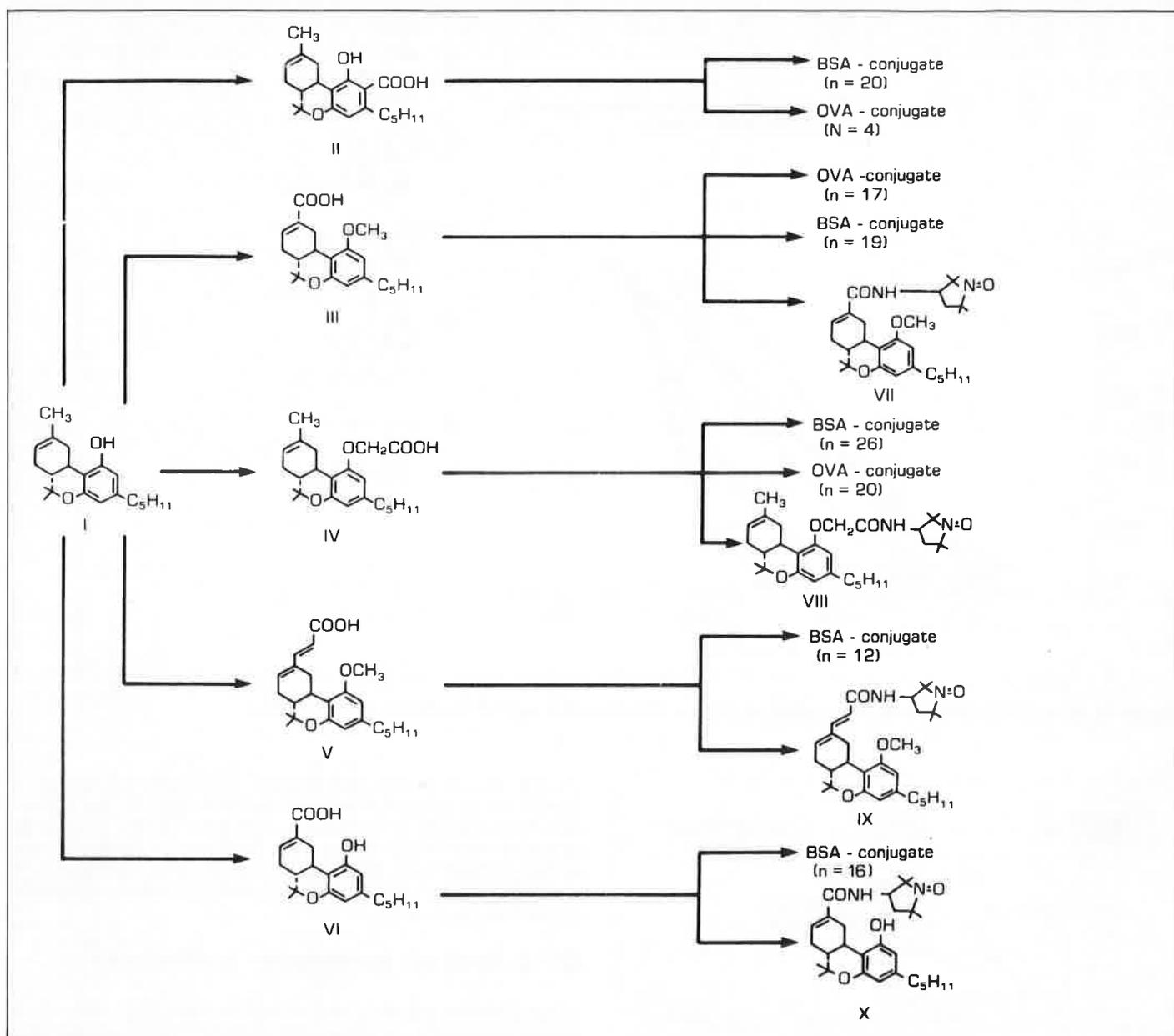


Figure 8. Antigènes cannabinoïdes.

titrée par des quantités croissantes de haptène non marqué. La quantité de haptène marqué déplacée de façon compétitive a été contrôlée par un appareil (ESR) Varian E-4. On a reproduit (Figure 9) une courbe type obtenue dans la détermination de la spécificité de l'antisérum pour l'anti-haptène VI ainsi que les courbes de réactivité croisée mesurées pour des cannabinoïdes de structures voisines.

On peut trouver des résultats supplémentaires dans une publication récente (14).

### III. 3. Synthèse d'antigènes œstrogènes.

L'immunisation par un conjugué haptène-protéine a pour conséquence la production d'anticorps dirigés contre le haptène, la protéine et le pont chimique qui les relie. Fréquemment, l'acidité des anticorps est plus forte vis-à-vis de la protéine et du pont que vis-à-vis du haptène. Par conséquent, il y aura un attachement préférentiel des anticorps pour le haptène marqué entraînant une perte de sensibilité du test. Des tentatives ont donc été faites pour préparer des métallohaptènes comportant un pont entre la partie complexe métallique et le haptène, différent du pont entre le haptène et la

protéine. Quand nous avons mis au point notre stratégie pour la synthèse des haptènes œstrogènes nous avons tenu compte de ces considérations afin de tester l'hypothèse de « l'effet de pont ».

Sur la figure 10, est montrée la préparation des esters succiniques acides de l'œstradiol et de l'œstriol, IVb-c, qui furent ensuite utilisés à la fois dans la préparation des conjugués BSA-haptène respectifs pour l'immunisation des lapins et dans la préparation des métallohaptènes. Le dérivé aminé en 17, IV-a sert de précurseur pour la synthèse de métallohaptène (*vide infra*) pouvant fournir un pont entre le haptène et la partie métal différent du pont entre le haptène et le porteur protéine. Nous espérons avoir une meilleure série de composés pour l'étude de cette question particulière, avec les dérivés O-carboxyméthylés en 3 de l'œstrone (IIa), l'œstradiol (IIb) et de l'œstriol (IIc), que nous avons synthétisé avec de bons rendements (> 80%). Nous avons synthétisé également, les dérivés O-β-éthylaminés en 3 de l'œstradiol (IIIb) et de l'œstriol (IIIc). La synthèse du dérivé analogue de l'œstrone IIIa est en cours de réalisation. Ces composés serviront à la synthèse des métallohaptènes (voir chapitre IV).

On peut remarquer que pour le TMI, il est assez important d'avoir de bonnes synthèses avec de hauts rendements des haptènes substitués appropriés car ce sont les précurseurs de la synthèse

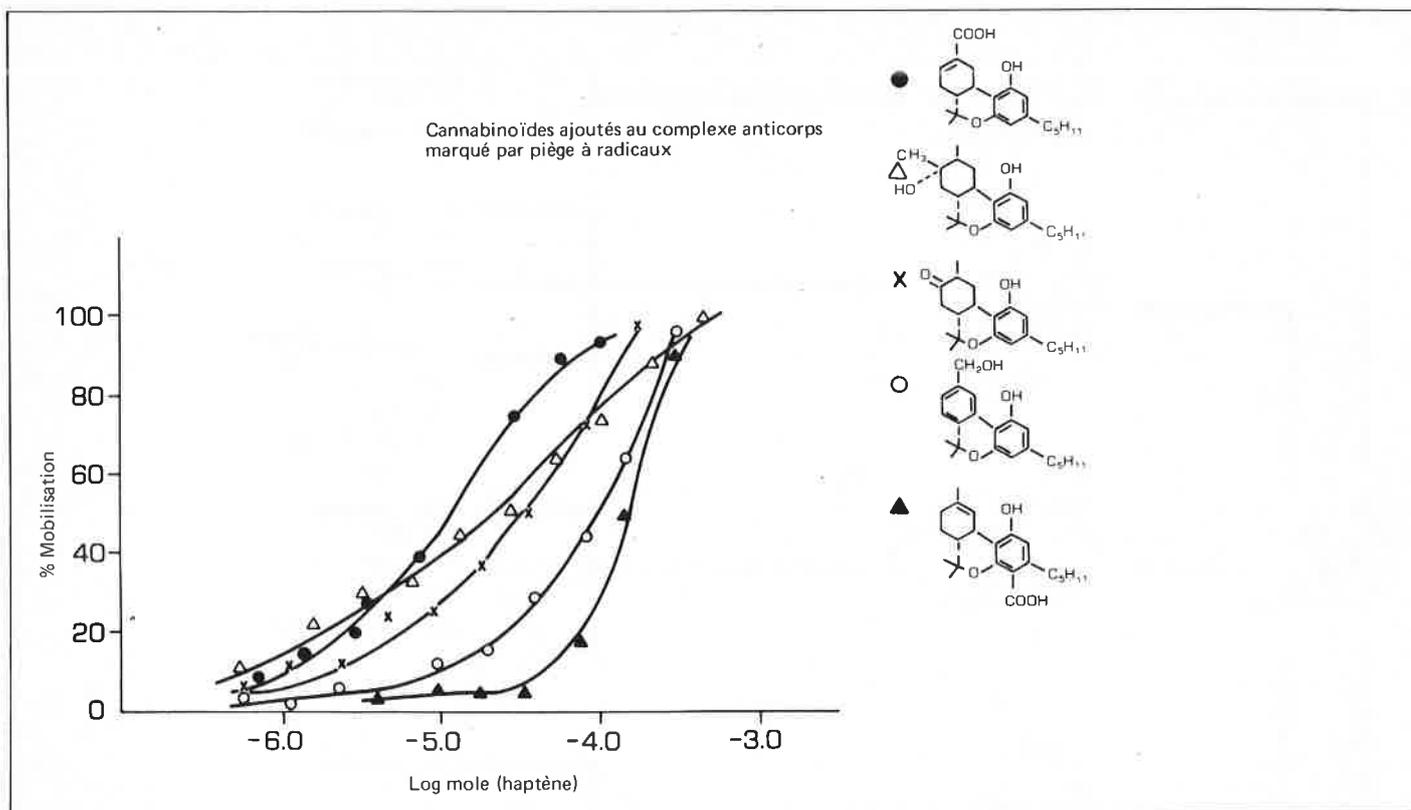


Figure 9. Réactivité croisée de cannabinoïdes avec l'antisérum anti-(7 carboxy- $\Delta^6$  - THC).

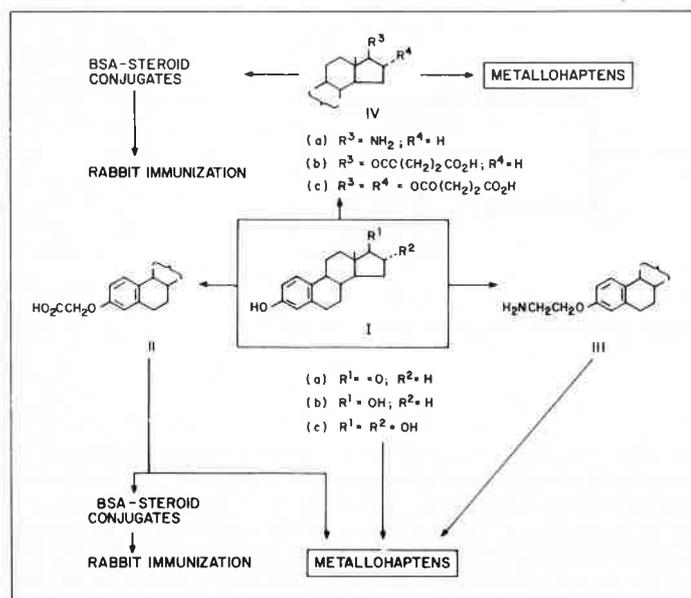


Figure 10. Synthèse d'antigènes (stéroïdes).

consécutives de métalohaptènes. C'est pourquoi nous avons fourni beaucoup d'effort pour développer de bons procédés de préparations des dérivés stéroïdes II-a-c et III-a-c de la figure 10.

Les conjugués BSA-haptène avec II-a-c ont été préparés à un haut degré de pureté et avec un bon rendement (~ 30) molécules d'haptène/molécule de BSA. Le protocole d'immunisation avec ces conjugués est en cours de réalisation. Nous espérons que les antisérums obtenus à partir de ces conjugués seront meilleurs que ceux obtenus précédemment avec les dérivés hémisuccinates IV b-c. Dans une publication récente (15), la synthèse des dérivés œstrogènes II a-c est rapportée avec de très faibles rendements (< 6%) mais en quantité suffisante pour préparer et tester les antisérums par un

procédé de test radioimmunologique. Cette publication semble justifier nos propres prévisions qui sont à l'origine de nos travaux dans la synthèse de cette série. Les résultats (15) indiquent que les antisérums individuels obtenus pour l'œstrone, l'œstradiol et l'œstriol en employant des conjugués stéroïde-protéine couplés au C-3, sont suffisamment spécifiques et peuvent distinguer les particularités structurales du cycle D.

### III. 4. Synthèse des antigènes barbituriques

Le test chimique des barbituriques est très demandé et nous avons entamé un programme pour la production d'un test métalloimmunologique pour ce type de composés. Le premier dérivé choisi comme substrat dans la famille des barbituriques fut la phénobarbitone. Nous avons préparé le dérivé carbométhoxy, III, en utilisant la méthode de catalyse par transfert de phase (16), comme indiqué dans le schéma réactionnel de la figure 11.

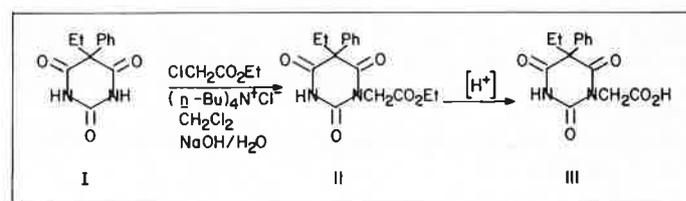


Figure 11. Synthèse de la N-carbométhoxy phénobarbitone par catalyse par transfert de phase.

Ce dérivé carbométhoxy a été conjugué au BSA et l'antigène injecté à des lapins suivant le protocole d'immunisation décrit dans le paragraphe III. 2.

La synthèse d'autres antigènes barbituriques est envisagée. De même, les synthèses d'antigènes de morphine, de méthadone et d'amphétamine progressent et font partie d'un programme de développement des tests métalloimmunologiques des drogues.

## IV. Synthèse des métallohaptènes

### IV.1. Introduction

Le marquage par des métaux des haptènes analysables est la partie la plus importante du TMI, du point de vue de la nouveauté du concept. L'activité considérable de recherche dans le domaine de la chimie de coordination et des organométalliques ces vingt dernières années a produit une foule d'informations se rapportant à notre sujet et facilement accessibles dans la littérature scientifique. Il est maintenant bien établi qu'on peut faire réagir chaque métal du tableau périodique avec des ligands organiques convenables pour former soit des complexes de coordination soit des dérivés organométalliques. Entrer dans des descriptions détaillées des différents types de métallo-dérivés accessibles dépasse le cadre de cette conférence et nous nous limiterons à la présentation de quelques définitions générales et de concepts se rapportant à notre sujet. Nous ferons mention de deux classes générales de composés qui incorporent des atomes de métal dans leur structure moléculaire :

a) les composés dans lesquels il y a une liaison directe entre le/les atomes de carbone de la partie organique et l'atome de métal sont définis comme composés organométalliques ;

b) les composés dans lesquels la liaison entre l'atome de métal et la partie organique passe à travers un hétéroatome du ligand sont classés comme complexes de coordination. C'est une définition arbitraire et il faut faire remarquer que les composés organométalliques sont un sous-groupe de la classe plus générale des complexes de coordination. Les deux types de composés, les organométalliques et les complexes de coordination, conviennent pour la synthèse des métallohaptènes. La partie organique du complexe peut être n'importe quel composé organique à condition qu'il possède le groupe fonctionnel convenable pour former une liaison avec l'atome métallique. Ceci ajoute un haut degré de souplesse au type de métallohaptènes qui peuvent être synthétisés. Nous pouvons dresser une liste des conditions requises pour arriver le plus près possible de l'obtention du métallohaptène « idéal ». Ces conditions sont résumées sur la figure 12.

#### Conditions d'obtention d'un métallohaptène « idéal »

1. Facilement accessible à un haut degré de pureté et de stabilité à un prix raisonnable.
2. Solubilité en milieu aqueux.
3. Le métal de marquage doit être en concentrations insignifiantes dans les fluides biologiques.
4. Durée de conservation prolongée.
5. Pas de risques pour la santé.
6. Détectable par des instruments analytiques bon marché, faciles à manipuler et de préférence de technologie existante.
7. Grand potentiel de sensibilité dans le test.

#### Figure 12. Propriétés d'un métallohaptène « idéal »

On peut envisager deux stratégies générales pour la synthèse des métallohaptènes. L'une des approches consiste à introduire un atome (ou des atomes) de métal directement dans le haptène, si la structure de ce dernier autorise des réactions avec les métaux. Dans l'autre approche, on se propose de synthétiser un réactif contenant un métal et fonctionnalisé, susceptible de réagir avec le haptène pour produire le métallohaptène voulu. Nous avons employé ces deux approches et nous l'illustrons dans les exemples suivants.

### IV.2. Synthèse d'œstrogènes marqués au mercure

Comme exemple d'introduction directe d'atomes de métal dans la molécule de haptène nous avons étudié la mercuration du cycle aromatique de l'œstradiol et de l'œstriol. Nous sommes en mesure d'obtenir les dérivés chloromercurés en 2 ou en 4 et les dérivés bis(chloromercurés) en 2,4 de l'œstradiol et de l'œstriol comme indiqué sur la figure 13.

Les trois dérivés chloro-mercuriques, II à IV, ont pu être caractérisés par leur spectre RMN typique, particulièrement dans la région des protons aromatiques, qui indique très clairement la position et le

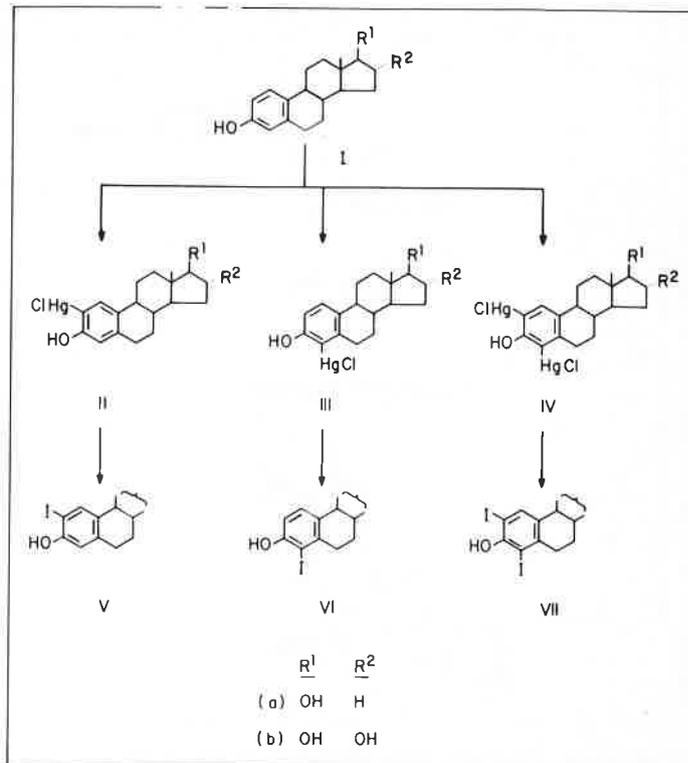


Figure 13. Synthèse des chloromercuro- et iodoœstrogènes.

degré de substitution. L'accessibilité des œstrogènes chloromercuriques purs fournit une méthode très commode pour la synthèse de dérivés à l'iode radioactif purs utilisés dans les tests radioimmunologiques. La réaction réalisée avec de l'iode « froid » consiste en un simple titrage de l'œstrogène chloromercurique en solution agitée magnétiquement dans le THF, par une solution chloroformique d'iode, jusqu'à ce que la couleur de l'iode dans le mélange réactionnel persiste. Les œstrogènes iodés ont été facilement purifiés par chromatographie sur colonne.

### IV.3. Synthèse d'un dérivé de l'œstrone marqué au platine

Sur la figure 14 est montré schématiquement un autre exemple de synthèse d'une liaison carbone-métal par l'introduction directe d'un atome de métal dans une molécule de haptène. L'œstrone a été transformé en dérivé énol acétate qui, après vérification, a donné l'ester acétique en 3 de la bromo-16 œstrone. Ce dernier composé réagit avec l'éthylène bis(triphénylphosphine)platine pour former le complexe de Pt(II) dans lequel la molécule d'œstrone est liée à l'atome de Pt à travers le C(16) du stéroïde. Le même composé peut être préparé par la réaction de l'ester acétique en 3 de la bromo-16 œstrone avec le tétrakis(triphénylphosphine)platine.

### IV.4. Synthèse de réactifs marqueurs de métal fonctionnalisés

Dans l'approche plus générale de la synthèse des métallohaptènes, il est nécessaire de synthétiser un réactif contenant du métal et susceptible d'incorporer un groupe fonctionnel convenable permettant d'attacher ce réactif contenant du métal au haptène ou au haptène modifié. Par exemple, si le haptène contient un groupe acide carboxylique (ou est modifié pour contenir un tel groupe), on peut essayer de synthétiser un métalloréactif dans lequel un des ligands attachés au métal incorpore un groupe amine qui réagira avec la

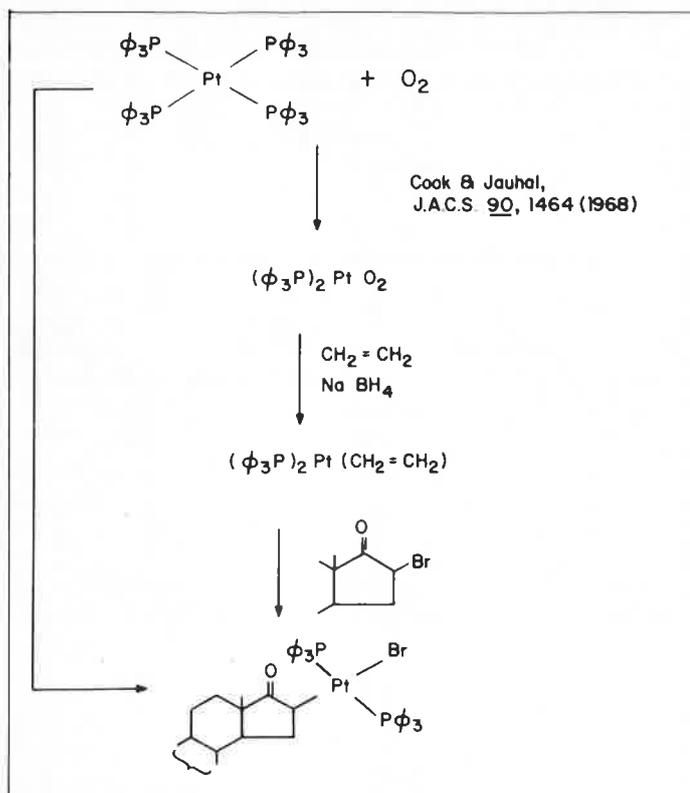


Figure 14. Synthèse d'un dérivé œstrone-platine.

fonction carboxy du haptène pour former un chaînon amide. De cette façon le métalloréactif devient le marqueur pour ce haptène et c'est le composé résultant qui sera le métallohaptène utilisable en test métalloimmunologique, pour ce haptène particulier. Évidemment, le même métalloréactif peut être utilisé pour d'autres haptènes possédant la fonction carboxy nécessaire.

Nous nous sommes efforcés d'utiliser des métalloréactifs fonctionnalisés variés et les structures de quelques-uns d'entre eux sont présentées sur la figure 15. Des exemples de synthèses de métallohaptènes spécifiques, en utilisant ces réactifs, sont donnés plus loin.

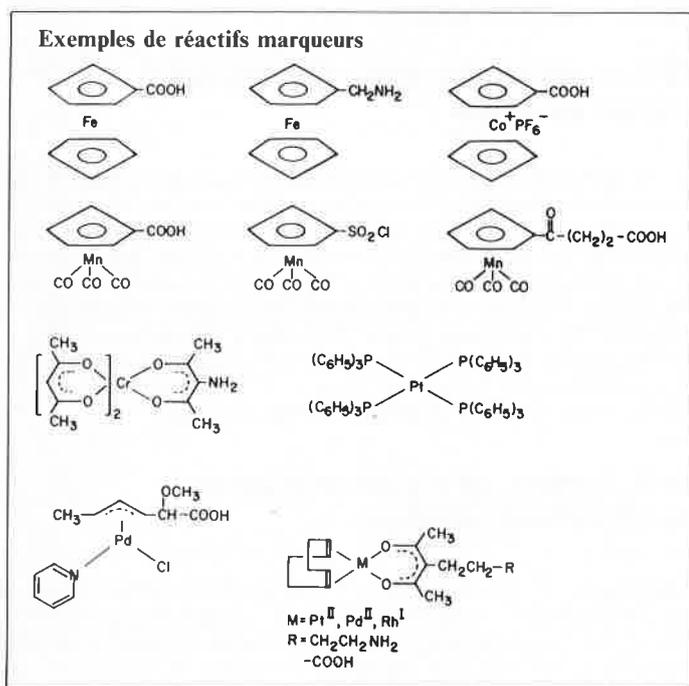


Figure 15. Métalloréactifs fonctionnalisés pour le marquage des haptènes.

#### IV.5. Synthèse de métallohaptènes marqués par le fer

Le ferrocène (et ses nombreux dérivés) est un métalloréactif facile à obtenir, stable, non toxique et souple pour le marquage des haptènes. Il a été commode pour nous de travailler avec ce complexe, au début de ce projet, de façon à tester la vraisemblance du concept du TMI, bien que nous sachions que les métallohaptènes de fer ne possèdent pas toutes les conditions requises pour un métallohaptène « idéal » (voir figure 12).

Les antigènes, décrits au chapitre III, pour la production d'anticorps ont été préparés par réaction d'un haptène carboxylique avec le BSA. Ainsi, la disponibilité de ces carboxy-heptènes nous a conduit à utiliser la ferrocénylméthylamine (I), comme réactif général de marquage de nos haptènes par le fer. Les métallohaptènes de fer synthétisés jusqu'ici sont présentés sur la figure 16. Nous y avons inclut les métallohaptènes de fer préparés par réaction de ferrocènes carboxyliques avec des haptènes aminés.

#### IV.6. Synthèse de métallohaptènes marqués au cobalt

L'hexafluorophosphate de carboxycobalticénium, I, a été transformé en ester activé N-hydroxysuccinimide, III, qui réagit avec l' amino-17 œstradiène-1,3,5 ol-3, IV, pour donner l'œstrogène marqué au cobalt, V. (Figure 17). Un conjugué de cobalt marqué en BSA, analogue au composé de fer VI de la figure 16, a été obtenu par réaction du dérivé ester activé III (figure 17) avec le BSA.

#### IV.7. Synthèse de métallohaptènes marqués au manganèse

Le « cyantrène » (ou tricarbonylcyclopentadiénylmanganèse) est un complexe organométallique contenant du manganèse ayant une chimie semblable à celle du ferrocène. Il est donc possible de préparer les dérivés du cyantrène fonctionnalisés pour les utiliser comme réactifs de marquage. Nous avons utilisé les dérivés carboxylé et chlorosulfonylé du « cyantrène » pour préparer plusieurs métallohaptènes de manganèse. (Figure 18).

#### IV.8. Synthèse de réactifs marqueurs de rhodium, de palladium et de platine

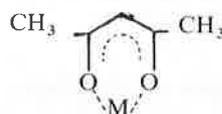
A ce stade nous présentons les résultats de quelques essais de synthèse d'un réactif de marquage « sur mesures » versatile et possédant les propriétés désirées.

Les β-dicétones énolisables telles que l'acétylacétone



constituent une classe de ligands chélatant convenable.

L'acétylacétone peut former, par perte d'un proton, avec un grand nombre de métaux, des chélates à six chaînons de la forme



La plupart de ces acétylacétonates sont solubles dans les solvants organiques, ce qui constitue un avantage en synthèse organique dans les étapes où ces complexes entrent en jeu. Il est connu que l'un (ou les deux) des protons du méthylène central peut être substitué par des groupes fonctionnels variés et la β-dicétone monosubstituée



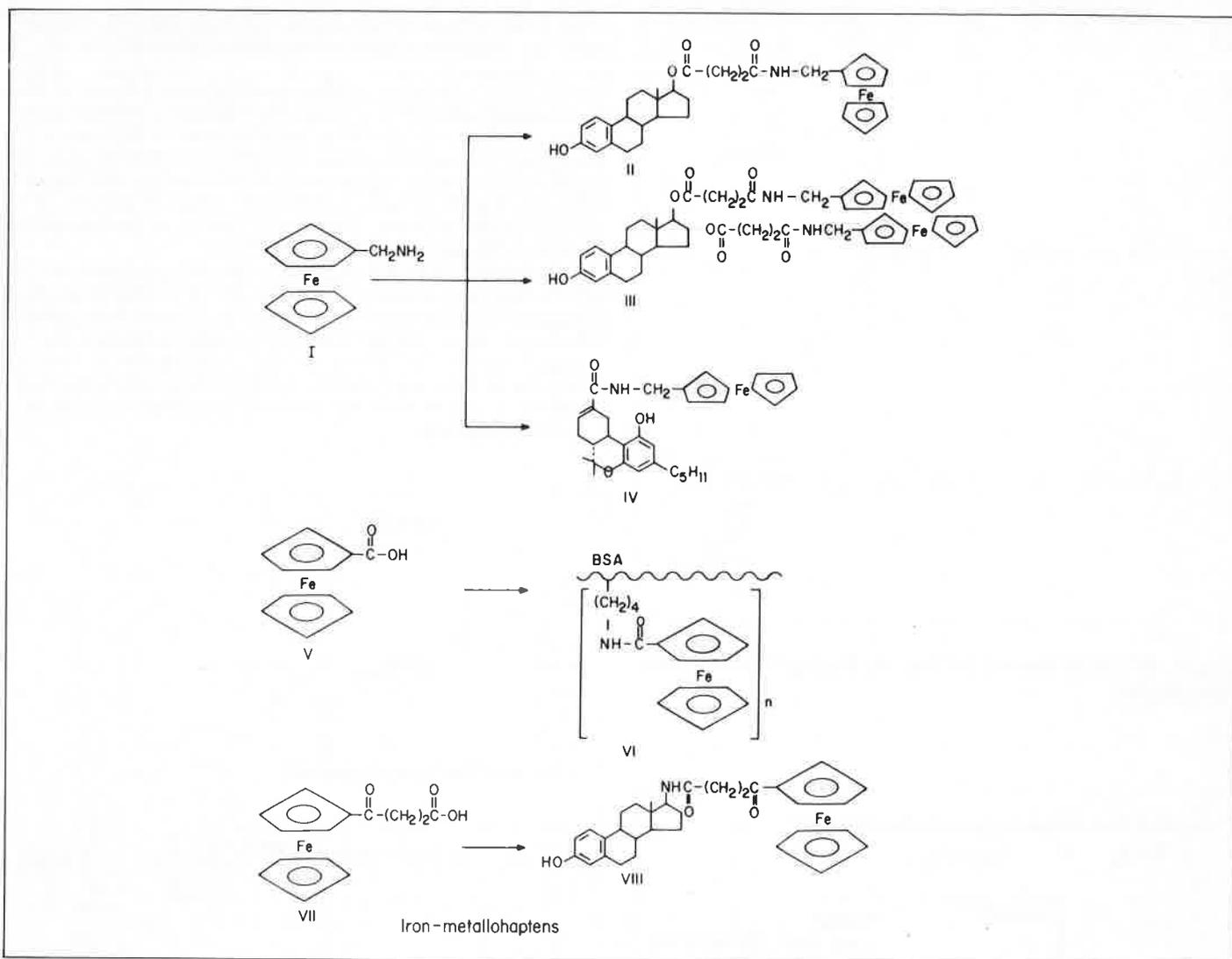


Figure 16. Métalloheptènes de fer.

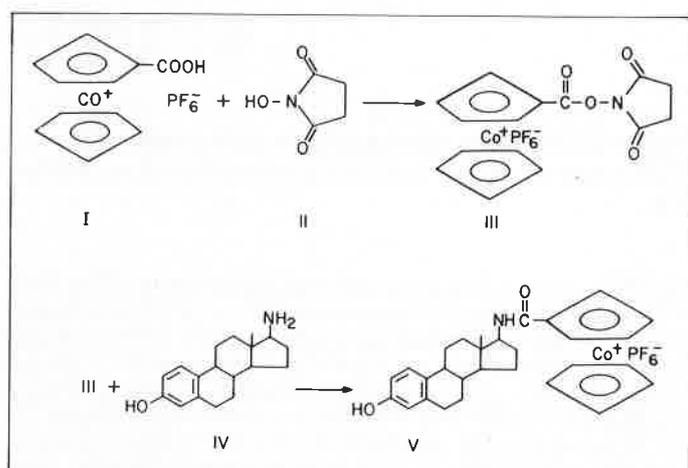


Figure 17. Synthèse d'un œstrogène marqué au cobalt.

reste encore capable de former des complexes acétylacétonates. En fonctionnalisant le groupe R (par exemple  $-\text{CH}_2-\text{COOH}$  ou  $-\text{CH}_2\text{NH}_2$ ), on peut l'utiliser pour l'attacher au heptène que l'on désire marquer au métal. Ainsi, quand on fait réagir l'acétylacétone avec l'acrylate d'éthyle dans une solution de dioxane-eau (1 : 1) dans

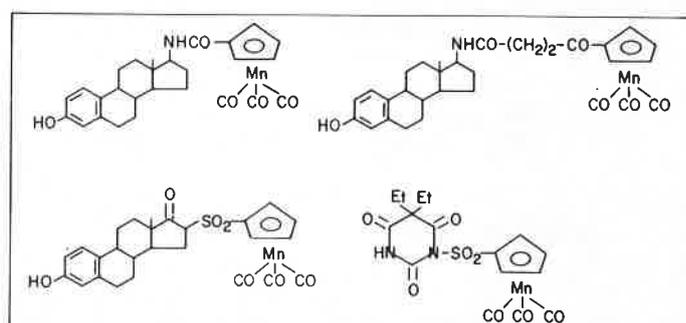


Figure 18. Métalloheptènes marqués au manganèse.

la soude en présence d'hydroquinone (pour atténuer la polymérisation de l'acrylate d'éthyle), la C-alkylation au méthylène central a lieu pour donner le dérivé substitué désiré III avec un rendement de 35 % (de produit distillé) (17). L'hydrolyse de III dans la potasse méthanolique donne le dérivé acide carboxylique IV, avec un rendement de 80 %. Le dérivé acide est transformé en ester activé, V par condensation avec le N-hydroxysuccinimide (Rendement 92 %). Par une voie analogue, l'acétylacétone réagit avec l'allylacétamide, VI, pour donner le dérivé VII, qui porte un groupe amino protégé en substitution sur le méthylène central de l'acétylacétone. Les étapes de la réaction sont résumées sur la figure 19.



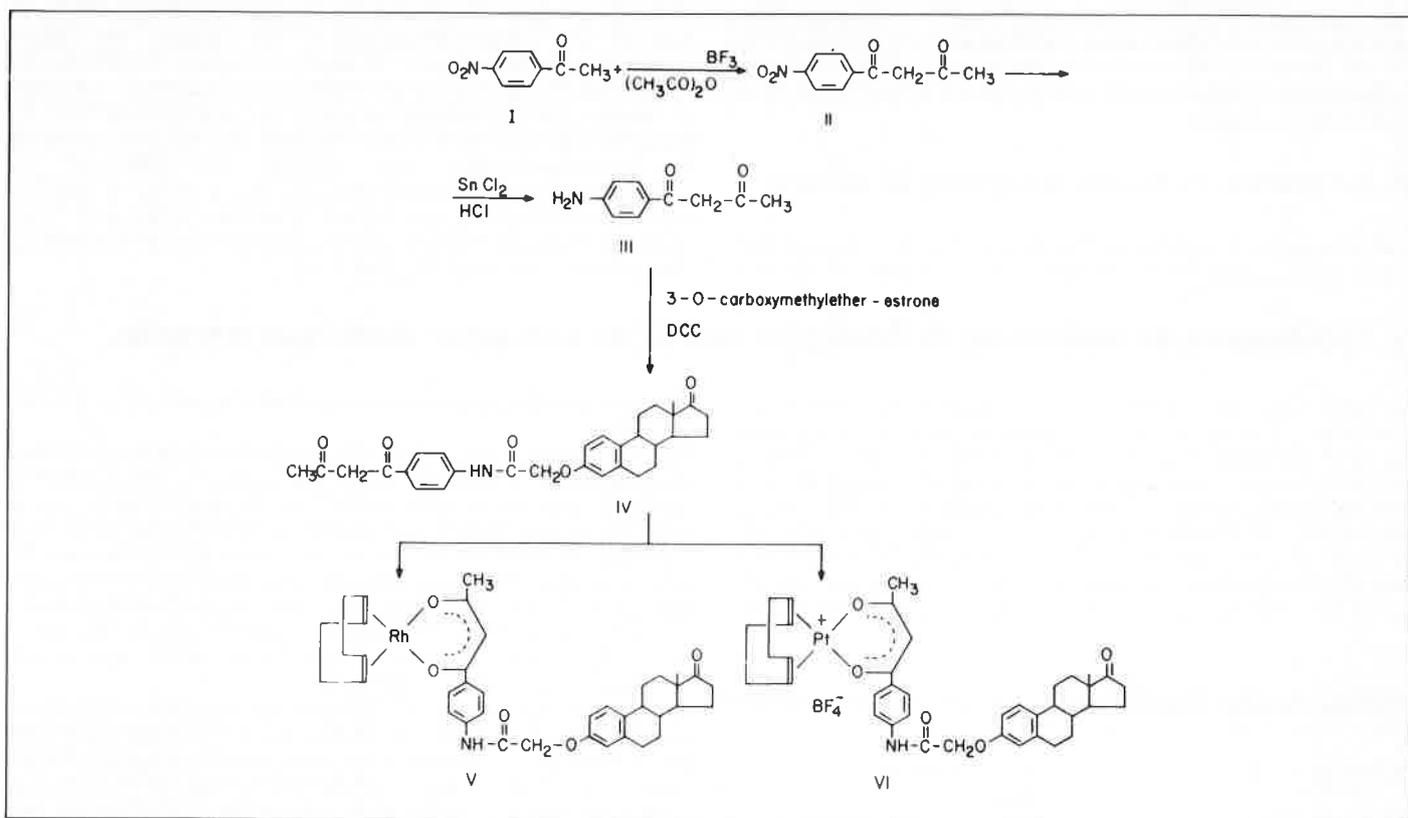


Figure 22. Synthèse des métallohaptènes benzoylacétionate-Rb et Pt.

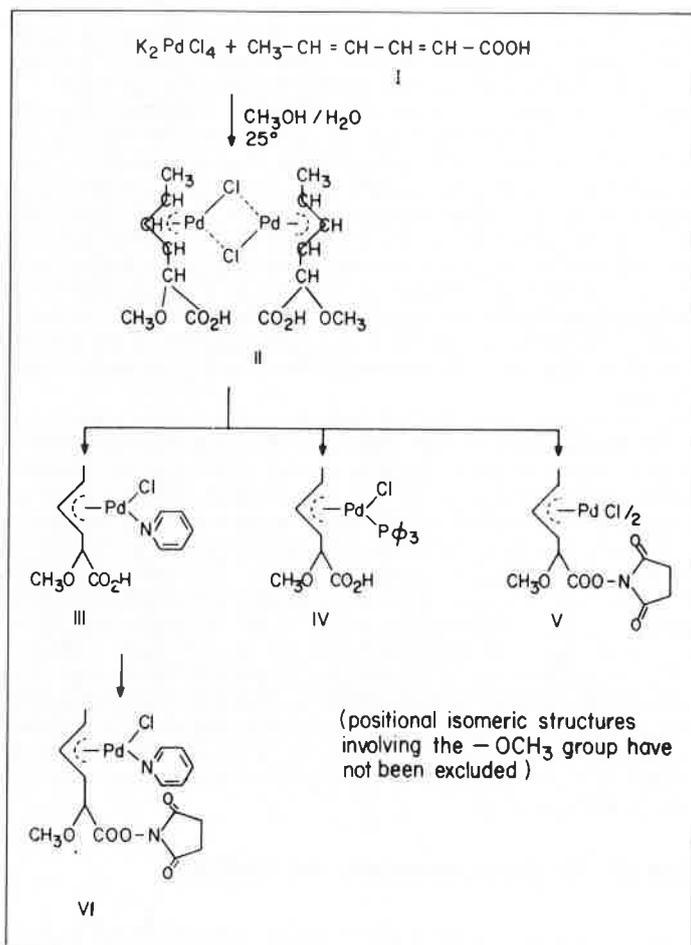


Figure 23. Synthèses des complexes fonctionnalisés du  $\pi$ -allylpalladium.

Lorsqu'on fait réagir l'acide sorbique, I, avec  $\text{K}_2\text{PdCl}_4$  dans le méthanol aqueux à la température ambiante, on obtient le dimère du  $\pi$ -allylpalladium, II, sous forme de cristaux jaunes, et la réaction avec la pyridine et le triphénylphosphine conduit successivement aux  $\pi$ -allylpalladium monomères, III et IV.

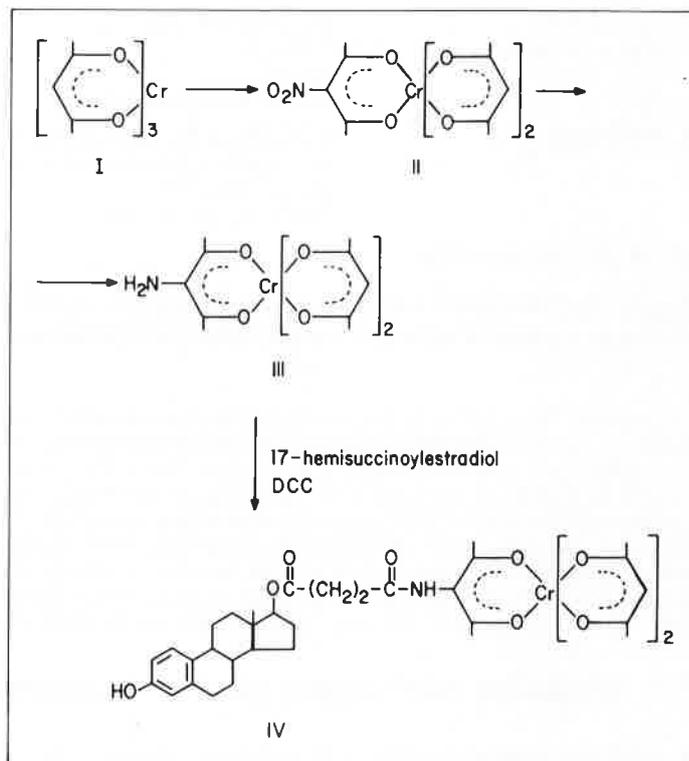


Figure 24. Synthèse d'un dérivé de l'œstradiol marqué au chrome.

Les composés V et VI, esters activés de la *N*-hydroxysuccinimide de la fonction carboxylique du dimère II et du monomère III, ont été obtenus par condensation avec le DCC. Nous étudierons l'utilisation de ces esters activés pour la synthèse des métallohaptènes marqués au palladium.

#### IV.9. Synthèse de réactifs marqueurs de chrome

L'utilisation des complexes acétylacétonate comme agents de marquage a été appliquée au chrome avec un chemin réactionnel

### V. Techniques de séparation de l'antigène non lié du complexe Anticorps-Antigène.

La production de réactifs de reconnaissance des liaisons (les anticorps) et d'antigènes marqués (métallohaptènes) doit être suivie du développement d'une méthode de séparation des substances marquées « liées » des « libres ». Cette étape de séparation est un élément essentiel pour le TMI autant que pour le TRI. Malgré l'importance de cette étape de séparation, il n'entre pas dans le cadre de cette mise au point de détailler les nombreuses techniques de séparation accessibles, quelques-unes d'entre elles étant énumérées sur la figure 25. Le lecteur peut se repérer à deux mises au point

Méthodes de séparation de l'antigène lié à l'anticorps et de l'antigène libre	
I. Partage	Chromatographie Électrophorèse Filtration sur gel Ultracentrifugation
II. Précipitation non spécifique (de l'antigène lié)	Sulfate d'ammonium Éthanol Dioxane Polyéthylène glycol.
III. Précipitation immunologique (de l'antigène lié)	Méthode de double anticorps
IV. Absorption (de l'antigène libre)	Charbon/Dextrane Cellulose Silicates Résines échangeuses d'ions
V. Phase solide	Anticorps lié de façon covalente au support solide (premier ou second anticorps) Tubes enrobés ou billes
VI. Antisérums polymérisés	

**Figure 25. Principales catégories de techniques de séparation dans les tests d'attachement compétitif des protéines.**

récentes (23, 24) sur les problèmes rencontrés au cours de différentes séparations dans le test TRI. Dans l'une des références ci-dessus (23), les auteurs font remarquer que « la méthode de séparations a ses propres propriétés de précision et de spécificité qui devraient être étudiées à fond comme le sont les propriétés semblables de la protéine de reconnaissance des liaisons ». Nous croyons qu'une telle étude devrait être entreprise en se référant spécifiquement au TMI car les réactifs marqués par un métal doivent avoir des propriétés différentes de celles des antigènes marqués aux radioisotopes et la méthode

### VI. Méthodes analytiques pour la détermination de la concentration en métal.

Le quatrième composant (figure 7) dans le développement d'un test métalloimmunologique est le choix d'une méthode analytique convenable pour doser le métal dans les phases « liée » et/ou « libre » du réactif analytique, après l'étape de séparation. Diverses méthodes

diffèrent de celui décrit dans la section précédente (III.8). Le chrome au degré d'oxydation III forme un dérivé tris(acétylacétonato)chrome, I, stable et neutre (Figure 24). Ce composé peut être nitré (22) par  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$  pour former un mélange de dérivés tris(acétylacétonato)mono-, di- et trinitro-chrome. Le tris(acétylacétonato)nitrochrome, II, peut être séparé du mélange par chromatographie sur colonne et réduit (22) en tris(acétylacétonato)amino-chrome, III. On a utilisé la fonction amine du composé III pour former un chaînon amide avec l'ester succénique acide en 17 de l'œstradiol, ce qui conduit au métallohaptène marqué au chrome, IV (Figure 24).

d'analyse du TMI (vide infra) est totalement différente de la méthode du TRI.

Pour le moment, nous n'avons que des résultats limités sur le choix d'une méthode de séparation convenable pour le TMI à partir de quelques expériences préliminaires. Le principal objectif est la séparation complète de la fraction libre de celle liée à l'anticorps sans introduire de changement dans la distribution du haptène entre les deux composés (24). Pour y parvenir, nous avons essayé principalement, jusqu'à présent, d'utiliser un système en phase solide (anticorps liés au Sépharose) et une méthode de chromatographie sur Séphadex, mais nous n'avons pas encore réalisé les recherches nécessaires à l'obtention des conditions optimales.

Les anticorps anti-œstradiol-17 $\beta$ -hemisuccinate ont été insolubilisés par réaction avec le Sépharose 4B (Pharmacia Fine Chemicals) activé par le bromure de cyanogène selon un procédé standard (25). La quantité de protéine liée a été déterminée par la technique de Lowry (25) et la préparation d'anticorps liés au Sépharose a été mise en suspension dans du tampon phosphate 0,1 M (pH 7,3) fournissant ainsi le réactif du test. Dans une expérience type, des quantités croissantes d'une solution de métallohaptène (par exemple l'ester succinique acide en 17 $\beta$  de l'œstradiol marqué par du fer, II, figure 16) sont ajoutées à un volume constant (30  $\mu\text{l}$ ) de réactif anticorps lié au Sépharose dans des fioles en polyéthylène. On ajuste à 120  $\mu\text{l}$  avec du tampon phosphate contenant 15 % de DMF.

Après une incubation de 30 mn à la température ordinaire, en agitant au Vortex de temps en temps, les fioles sont centrifugées 1 mn à 3 000 t.p.m. Des parties aliquotes (20-30  $\mu\text{l}$ ) de surnageant sont injectées dans le four en graphite d'un spectromètre d'absorption atomique, (vide infra) pour mesurer la quantité de métal en solution. La concentration trouvée en métal constitue la fraction libre de métallohaptène non lié aux anticorps immobilisés sur le Sépharose et la fraction liée est obtenue par différence. Pour déterminer le pourcentage d'inhibition de la liaison métallohaptène, on a réalisé la même expérience en utilisant une concentration constante de métallohaptène et en faisant croître les quantités de haptène non marqué.

Le choix de cette méthode a été dicté par la simplicité de la technique et le nombre réduit de manipulations, permettant ainsi d'éviter la contamination et/ou la perte du réactif analytique. Le principal inconvénient est la perte du titre par couplage des antisérums au Sépharose et la nécessité d'avoir une forte concentration d'antisérum spécifique. On peut surmonter cet inconvénient en utilisant la technique combinée du support solide et du double anticorps. Comme dans notre cas, tous les antisérums sont produits chez les lapins, il serait commode de préparer un anti-lapin IgG lié au Sépharose. Une telle préparation une fois caractérisée et standardisée, conviendrait avec n'importe quel antisérum anti-haptène produit par les lapins et bénéficierait de la simplicité des techniques de séparation ne nécessitant que l'étape de centrifugation. Cette approche est à l'étude. D'autres méthodes, telles que l'utilisation de techniques sur colonnes sont susceptibles d'être automatisées et doivent être étudiées.

sont maintenant accessibles pour l'analyse des métaux, telles que la spectrométrie d'émission, d'absorption et de fluorescence, et d'autres méthodes : électrochimiques, activation aux neutrons etc...

Dans nos travaux, jusqu'à présent, nous n'avons utilisé que la

spectrométrie d'absorption atomique sans flamme avec l'emploi d'un four en graphite chauffé électriquement pour le séchage, la carbonisation et l'atomisation de l'échantillon contenant le métal à analyser. Le choix de cette méthode a été dicté par plusieurs facteurs, tels que la relative simplicité de l'opération, l'accessibilité générale des instruments dans les laboratoires de chimie clinique (plus de 30 000 spectromètres d'absorption atomique sont en service dans le monde), la nécessité de faibles fractions aliquotes de réactif analytique (20-30  $\mu$ l) et une sensibilité potentielle de détection élevée (on peut descendre jusqu'au picogramme).

Dans les instruments AAS, équipés de four de graphite, la sensibilité de détection des atomes de métal varie d'un métal à l'autre et dépend d'un nombre de variables rattachées à la fois aux paramètres de l'instrument et à la matrice de l'échantillon du test. Il est donc toujours nécessaire d'effectuer l'opération « développement de la méthode » de façon à déterminer les conditions optimales pour chaque système de test. Ensuite, il est possible d'utiliser les mêmes réglages de l'instrument pour faire les analyses avec ce même système de test sans que l'on ait à passer par le procédé « développement de la méthode ».

Dans le procédé analytique utilisant le four AAS en graphite, on injecte un faible volume d'échantillon analytique (20-50  $\mu$ l) dans le tube de graphite. Le solvant s'évapore au cours de l'opération et la partie métal du résidu est atomisée. Le signal d'absorption enregistré est donc une mesure de la quantité absolue d'élément métal présent dans le volume de l'échantillon injecté. Les résultats de la figure 26 fournissent une indication sur la zone de concentrations applicables au AAS. Les valeurs de la dernière colonne montrent la concentration approximative de métal (ng/ml) nécessaire pour obtenir 0,1 U.A. (unités d'absorption), étant entendu que l'on peut lire avec une précision acceptable des unités d'absorption (donc des concentrations) dix fois plus faibles.

**Sensibilité du four de graphite en spectrométrie d'absorption atomique dans la détection de quelques éléments (a).**

Élément	Poids A.	Sensibilité (b) ng/0,0044 U.A.	Concentration en élément ng/20 $\mu$ l (c) pour 0,1 U.A.	Concentration en élément ng/ml (c) pour 0,1 U.A.
Au	197	0,030	0,68	34
Co	59	0,080	1,80	91
Cr	52	0,025	0,57	28
Fe	56	0,030	0,68	34
Mn	55	0,008	0,18	9
Mo	96	0,090	2,00	102
Pd	106	0,140	3,20	159
Pt	195	0,090	2,04	102
Rh	103	0,170	3,86	193

(a) Dans « Analytical Methods Using the HGA graphite furnace » Manuel d'opération Perkin Elmer 1974.

(b) Par définition, la sensibilité s'exprime comme la quantité absolue d'élément nécessaire pour avoir 0,0044 unité d'absorption. Les valeurs données peuvent varier suivant la forme chimique de l'élément et les paramètres de l'instrument.

(c) En admettant qu'il y ait une injection de 20  $\mu$ l de l'échantillon dans le four.

**Figure 26. Sensibilité de détection de quelques métaux en spectrométrie d'absorption atomique.**

Ainsi, il est clair que l'on peut, dans des conditions optimisées, déterminer confortablement des concentrations de métal dans la zone de 3 ng/ml à 200 ng/ml.

Si nous admettons maintenant que l'atome métal constitue 10 % du

poids moléculaire du métallohaptène (valeur qui est plus élevée, naturellement, pour les métaux lourds comme Pt, Au, Hg), la zone de détection ci-dessus est équivalente à une zone de 30 ng/ml — 2 000 ng/ml pour le métallohaptène. Cette échelle est comparable à celle décrite pour d'autres méthodes de tests immunologiques non radioactifs tels que les TRL et EMIT et plus sensible que celle de tests non immunologiques comme le TLC.

De plus, la zone de concentration de 10 nanogrammes par ml convient tout à fait à la détection (sans opérations préliminaires d'extraction ni de concentration) d'un assez grand nombre de métabolites urinaires comme l'œstriol, la morphine, les barbiturates, l'amphétamine, la cocaïne et d'autres.

Il faut remarquer que la gamme de détection donnée ci-dessus est celle obtenue par des appareils courants. Quand on voit la popularité croissante de l'AAS, il est raisonnable de prévoir que dans peu d'années les fabricants d'instrumentation AAS produiront des systèmes d'absorption atomiques avec des capacités de détection supérieures d'au moins un ordre d'intensité. Ceci signifierait que l'on pourrait détecter les métallohaptènes dans la zone de 3 à 10 ng/ml, et que le TMI serait très proche de la zone de concentration couramment utilisée en TRI (par exemple, dans le plasma des femmes enceintes le taux d'œstradiol est de 2-20 ng/ml de même que pour l'œstriol. Dans l'urine de grossesse, le taux d'œstriol est  $10^3$  fois plus élevé). Cependant, à ce stade primitif de développement et étant donné les spectromètres d'absorption atomique du commerce, le TMI ne peut être utilisé pour la détection de concentrations de haptène de l'ordre du picogramme, comme cela est possible en test radioimmunologique.

Nous avons l'espoir que ce but n'est pas hors de portée et nous examinons les possibilités d'amplification.

Pour donner une indication de la méthodologie employée, nous décrivons maintenant très brièvement un des procédés utilisant des réactifs décrits ci-dessus : à l'aide de solutions standards de métallohaptène œstradiol-17 $\beta$ -succinate contenant du fer (figure 16) dans du tampon phosphate 0,01 M (pH 7,3) à 15 % de DMF, on obtient une courbe d'étalonnage d'absorption atomique, dans la zone de concentration 0-50 ng Fe/ml, avec une équation de régression linéaire  $y = 1,731x + 42,88$  et un coefficient de corrélation  $r = 0,9977$ . Une préparation d'anticorps anti-œstradiol-17 $\beta$  hémisuccinate lié au Sépharose est titrée par des solutions standards de métallohaptène, (figure 16), agitée au Vortex, incubée (30 mn à la température ordinaire) et centrifugée (1 mn à 3 000 t.p.m.).

Des fractions aliquotes (20-30  $\mu$ l) « de surnageant » sont injectées dans le four de graphite du spectromètre d'absorption atomique et mesurées, ce qui donne la quantité de métallohaptène libre, Ag — M. Pour déterminer l'inhibition (%) de la liaison métallohaptène, une expérience semblable a été réalisée avec une concentration constante en métallohaptène et des quantités ajoutées croissantes de stéroïdes non marqués (IVb, figure 10). Avec l'antisérum particulier utilisé dans cette expérience et des concentrations en haptène de 0,1 — 1  $\mu$ g/ml, il faut un rapport molaire 1,31/1 de stéroïde non marqué au métallohaptène pour obtenir environ 44 % d'inhibition de la liaison métallohaptène.

Ces résultats et d'autres similaires (27, 28) nous ont convaincu de la plausibilité du concept et des efforts préliminaires pour optimiser les conditions du test semblent prometteurs. De plus, des recherches sont en cours qui portent sur d'autres facettes et d'autres possibilités inhérentes au TMI. Nous espérons que ce concept, qui réunit dans une approche interdisciplinaire, l'immunochimie, la chimie organique, la chimie organométallique et la chimie de coordination ainsi que des aspects de l'instrumentation analytique, stimulera l'intérêt de beaucoup d'autres chercheurs dans ces domaines.

Je souhaite exprimer mes remerciements à mes collaborateurs dont les noms suivent pour leur contribution dans le développement du TMI :

Dr S. Dani, Mme Y. Eden, Dr O. Gandolfi, Mme H. Horn, Dr E.E. Isaacs, Mme Y. Josephi, M. Y. Saar, M. E. Slovin, Mlle L. Snarsky, Mlle S. Balsiger et M. M. Shimoni.

De plus je souhaite remercier le Dr Harriet Gershon du Technion Medical School pour ses conseils et son aide dans les aspects immunologiques de ce travail.

## Bibliographie

- (1) R.S. Yalow and S.A. Berson, *J. Clin. Invest.*, 1960, **39**, 1157.
- (2) R.K. Leute, E.F. Ullman, A. Goldstein and L.A. Herzenberg, *Nature, New Biol.*, 1972, **236**, 93.
- (3) J. Landon, J. Crookall and A. McGregor, in « Steroid Immunoassay » (eds. E.H.D. Cameron, S.G. Hillier and K. Griffiths) Alpha Omega Publishing Ltd., Cardiff, Wales, 1975, page 183.
- (4) K.E. Rubenstein, R.S. Schneider and E.F. Ullman, *Biochem. Biophys. Research Comm.*, 1972, **47**, 846.
- (5) H.R. Lindner, E. Perel and A. Friedlander, in « Research on Steroids » (Eds. M. Finkelstein, C. Conti, A. Klopffer and C. Cassano) Pergamon Press, Oxford, 1970, vol. 4, p. 197.
- (6) G.D. Niswender and A.R. Midgley, Jr., in « Immunologic Methods in Steroid Determination » (Eds. F.G. Peron and B.V. Caldwell) Meredith Corp., New York, 1970, p. 149.
- (7) « Analysis of Drugs of Abuse », Special Issue *J. Chromatog. Science*, 1974, **12**, 209-336.
- (8) R. Mechoulam, Ed., « Marijuana, Chemistry, Pharmacology, Metabolism and Clinical Effects », Academic Press, New York, N.Y. 1973.
- (9) P.T. Tsui, K.A. Kelly, M.M. Pongpipom, M. Strahilevitz, and A.H. Sehon, *Can. J. Biochem.*, 1974, **52**, 252.
- (10) S.J. Gross, I.R. Soares, S.-L.R. Wong, and R.E. Schuster, *Nature*, 1974, **252**, 581.
- (11) J.D. Grant, S.J. Gross, P. Lomax, and R. Wong, *Nature, New Biol.*, 1972, **236**, 216.
- (12) S. Agurell, B. Gustafsson, B. Holmstedt, K. Leander, J.E. Lindgreen, I. Nilsson, F. Sandberg, and M. Asberg, *J. Pharm. Pharmacol.*, 1973, **25**, 554.
- (13) J.D. Teale, E.J. Forman, L.J. King, and V. Marks, *The Lancet*, 1974, p. 553.
- (14) M. Cais, S. Dani, Y. Josephi, A. Modiano, H. Gershon and R. Mecheulam, *FEBS Letters*, 1975, **55**, 257.
- (15) P.N. Rao and P.H. Moore, Jr., *Steroids*, 1977, **29**, 461.
- (16) E.V. Dehmlow, *Angew. Chem. Internat. Edit.*, 1974, **13**, 170.
- (17) I.N. Nazarov, S.I. Zavyalov and G.M. Kossolapoff, *Zhur. Obshchei Khim.*, 1954, **24**, 469; *Chem. Abst.*, 1955, **49**, 6142h.
- (18) R. Cramer, *Inorg. Synth.*, 1974, **15**, 14.
- (19) D.A. White, *Inorg. Synth.*, 1972, **13**, 55.
- (20) V.N. Andrievskii, I.L. Kothyarevskii and M.S. Shvartsberg, *Isv. Akad. Nauk SSSR, Ser. Khim.*, 1966, p. 882.
- (21) S. Gabriel and W. Gerhard, *Ber.*, 1921, **54**, 1615.
- (22) J.P. Collman and M. Yamada, *J. Org. Chem.*, 1963, **28**, 3017.
- (23) W.D. Odell, C. Silver and P.K. Grover, in « Steroid Immunoassay » (eds. E.H.D. Cameron, S.G. Hillier and K. Griffiths), Alpha Omega Publishing Ltd., Cardiff, Wales, 1975, p. 207 and references therein.
- (24) W.P. Collins, G.J.R. Barnard and J.F. Hennam, *ibid.*, p. 223 and references therein.
- (25) F. Cuatrecasas and C.B. Anfinsen in « Methods in Enzymology » (eds. S.P. Colowick and N.D. Kaplan), Academic Press, New York and London, 1971, vol. 22, p. 345.
- (26) O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall, *J. Biol. Chem.*, 1951, **193**, 265.
- (27) M. Cais, S. Dani, Y. Eden, O. Gandolfi, M. Horn, E.E. Isaacs, Y. Josephi, Y. Saar, E. Slovin, and L. Snarsky, *Nature*, 1977, **270**, 534.
- (28) M. Cais, E. Slovin and L. Snarsky, *J. Organometal. Chem.*, 1978, **160**, 223.

# N'AVEZ-VOUS PAS AUTRE CHOSE A FAIRE?



Pourquoi ne pas se libérer d'une tâche aussi ingrate et fastidieuse que le lavage. Lancer, premier fabricant français, propose une gamme complète de lave-verrerie multiprogramme spécialement conçue pour les laboratoires (lavage aux détergents ou au solvant avec régénérateur). Utiles, efficaces et économiques, les lave-verrerie Lancer allient technologie de pointe : lavage par injecteurs sur 3 niveaux, rinçage acide, eau distillée ou déminéralisée, séchage par air chaud pulsé par turbine... et spécialisation : exécution de paniers sur mesure...

**Lancer est le garant d'un lavage parfait.**



**LANCER S.A. 23 av. François-Verdier 31170 Tournefeuille (61) 86.21.95**

DROPSY