

L'IDIOTYPIC COMPARÉE DES ANTICORPS QUI, DANS LE SÉRUM D'UN LAPIN IMMUNISÉ CONTRE LA SÉRUMALBUMINE HUMAINE, SONT DIRIGÉS CONTRE DES RÉGIONS DIFFÉRENTES DE CET ANTIGÈNE*

Pierre-André CAZENAVE

Service d'Immunochimie Analytique, Institut Pasteur, 28 rue du Docteur Roux, 75015 Paris, France

Received 1 February 1973

Original illustrations received 14 March 1973

Idiotypy has been studied in rabbit antibodies against human serum albumin. Antibodies which are directed against three different regions of serum albumin have similar idiotypic specificities. The molecular distribution of idiotypic determinants may be different in antibodies with specificity for different determinants as revealed for example by their precipitability or non precipitability by the same anti-idiotypic antibodies. The anti-albumin antibodies which are not precipitable by the anti-idiotypic antibodies, though they do combine with them, become precipitable after being mildly polymerized. Similar idiotypic specificities may be found in antibodies to serum albumin and in immunoglobulins apparently devoid of anti-serum albumin antibody function.

1. Introduction

Le terme d'idiotypie des anticorps [1, 2] désigne la propriété qu'ils ont de posséder des spécificités antigéniques, les spécificités idiotypiques, qui sont particulières aux anticorps contre un antigène donné synthétisés par un individu ou par un groupe d'individus donné.

Depuis les premières observations d'idiotypie des anticorps chez le lapin [3] et chez l'homme [4], un certain nombre de travaux ont été consacrés à l'étude de l'idiotypie des anticorps du lapin contre des bactéries [5–11] ou contre des structures hap-téniques [12]. Une partie de ces travaux indiquaient que la spécificité idiotypique de certains des anticorps qui étaient précipitables par le polysaccharide de *Salmonella typhi* étaient doués de la même spécificité idiotypique que d'autres anticorps qui n'étaient pas précipitables par ce polysaccharide quoiqu'ils fussent

précipitables par l'antigène somatique [5, 7]. Cette observation est à l'origine d'une série de travaux destinés à comparer les spécificités idiotypiques des anticorps qui, dans l'immunsérum d'un individu donné, ont des fonctions différentes à l'égard d'un même antigène entendu comme une espèce moléculaire définie par sa spécificité antigénique.

Il était naturel que les antigènes choisis pour l'étude de leurs anticorps homologues fussent cette fois des protéines, antigènes mieux définis que les polysaccharides et dont certains sont susceptibles d'être séparés en fragments assez bien définis au moins au point de vue immuno-chimique. C'est ainsi qu'il a été montré que plusieurs fractions d'anticorps contre l'ovalbumine de Poule, différant par certaines de leurs propriétés, possédaient des spécificités idiotypiques similaires [13]. Des anticorps qui, dans le sérum d'un lapin immunisé contre le fibrinogène humain, sont dirigés contre deux fragments distincts de cet antigène, sont précipités par les mêmes anticorps anti-idiotypiques qui ne précipitent pas des anticorps anti-IgG présents dans le même sérum anti-fibrinogène [14].

La sérumalbumine humaine (SAH) semble être un matériel de choix pour les buts qu'on se propose car il est possible d'en séparer par l'action de la cathepsine

* Ce travail a bénéficié de subventions de la Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique (convention n°670060501), puis du Centre National de la Recherche Scientifique (ER 67) au Service d'Immunochimie Analytique de l'Institut Pasteur (Chef de Service: Dr. Jacques Oudin) où il a été effectué.

de rate de lapin un fragment dit "inhibiteur" ou "I" de poids moléculaire 11 000 [15, 16] à partir duquel on peut préparer par l'action de la trypsine un fragment F_1 , de poids moléculaire 6 600 [17]. Un emploi approprié des immunoadsorbants permet de séparer à partir d'un sérum anti-albumine trois fractions d'anticorps distinctes par les déterminants antigéniques de la molécule d'albumine avec lesquels ils se combinent:

Ceux qui se combinent avec le fragment F_1 seul,

Ceux qui se combinent avec le fragment I à l'exception du fragment F_1 ,

Ceux qui se combinent avec la sérumalbumine à l'exception du fragment I.

La comparaison de l'idiotypie des anticorps de ces trois fractions est l'objet du présent travail.

2. Matériel et méthodes

2.1. SAH, fragments de SAH, immunisations anti-SAH

La SAH utilisée pour les immunisations anti-SAH est une préparation hautement purifiée. La SAH utilisée pour les diverses études a été obtenue au moyen de la précipitation, par le sulfate d'ammonium saturé, du filtrat de la précipitation à 65% d'un mélange de sérum humain. Les fragments "inhibiteur" et F_1 de la SAH nous ont été aimablement fournis par le Dr. Lapresle que nous remercions très vivement.

Des lapins ont été immunisés par deux injections de 2mg de SAH avec l'adjuvant de Freund à 7 mois d'intervalle. Les saignées pratiquées après la seconde injection ont été utilisées dans le présent travail.

2.2. Immunoadsorbants

Un polymère insoluble de SAH (poly-SAH) a été préparé au moyen de la glutaraldéhyde [18]. La SAH ainsi que les fragments "inhibiteur" et F_1 ont été couplés à la para-amino-benzyl-cellulose diazotée [19]: PAB-SAH, PAB-I, PAB- F_1 ; nous remercions vivement le Dr. Lapresle qui nous a prêté le PAB-I et le PAB- F_1 . Le sérum anti-idiotypique a été polymérisé au moyen du chloroformate d'éthyle [20], les particules du polymère finement broyé ont été adsorbées sur "Biogel P-300" [21]. Des anticorps ont été fixés sur des billes de Biogel "P-300 minus" au moyen de glutaraldéhyde [22]. Les anticorps adsorbés sur les immunoadsorbants ont été élués par 0,1 N HCl.

2.3. Immunisations anti-idiotypiques

Les anticorps anti-SAH isolés d'un immunosérum par adsorption sur poly-SAH ont été polymérisés par la glutaraldéhyde [18] et utilisés dans une série d'immunisations anti-idiotypiques selon les modalités décrites par d'autres auteurs dans l'étude de l'idiotypie des anticorps anti-para-amino-benzoate [12].

2.4. Réactions antigène-anticorps

Les réactions de précipitation antigène-anticorps ont été étudiées en milieu liquide à l'interface entre deux solutions, et par la méthode d'analyse immuno-chimique par précipitation spécifique en milieu gélifié [23] selon la technique de diffusion double en cuves à faces parallèles [24].

Les précipités spécifiques ont été dosés selon la technique de Folin modifiée [25].

Les réactions antigène-anticorps ont été également étudiées par la méthode d'hémagglutination passive, la SAH et ses fragments ont été couplés à des hématies de mouton au moyen de la glutaraldéhyde [26].

2.5. Polymères solubles d'anticorps

Dans le but d'étudier par précipitation des fractions d'anticorps anti-SAH non précipitables par les anticorps anti-idiotypiques mais susceptibles de se combiner avec eux, on a polymérisé ces fractions par la glutaraldéhyde [18], mais de manière que les polymères obtenus soient d'une taille suffisamment restreinte pour être solubles [27]. A une solution d'anticorps anti-SAH à la concentration de 2 à 4 mg/ml on ajoute de la glutaraldéhyde en solution à 0,5% dans l'eau de manière que la concentration finale soit de 1 mg par ml de milieu. Au bout de 2 hr, on inhibe la réaction en ajoutant une solution de lysine 2 M pour que sa concentration finale soit de 0,2 M. Les polymères sont séparés des monomères par filtration sur une colonne de Séphadex G-200 (fig. 1).

2.6. Filtrations sur tamis moléculaire

Elles ont été effectuées sur Séphadex G-200 équilibré dans un tampon 0,05 M phosphate de pH 7.

3. Résultats

Sur les 5 lapins soumis à l'immunisation anti-idioty-

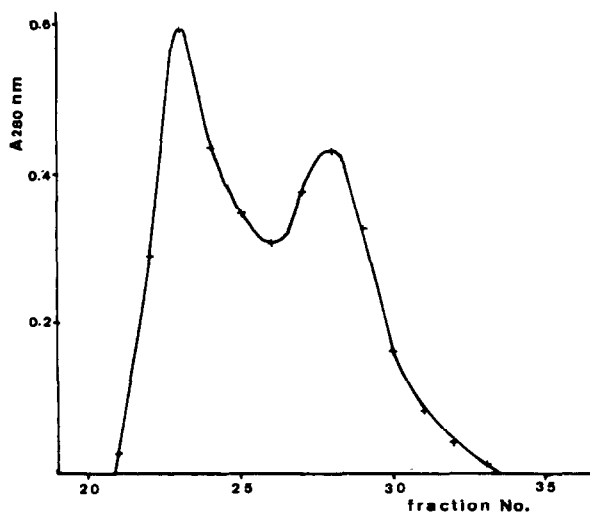


Fig. 1. Séparation des polymères solubles d'anticorps contre la SAH par filtration sur tamis moléculaire. Exemple de l'isolement des polymères solubles résultant de la polymérisation de 4 mg d'anticorps anti-F₁, sur une colonne de Séphadex G-200 (φ 1,5; longueur 90 cm), volume de recueil = 3 ml par fraction. Les fractions 21 à 25 ont été réunies et concentrées.

pique contre les anticorps anti-SAH d'un même lapin, 2 ont synthétisé des anticorps précipitants à l'égard de cet immunosérum. Ces anticorps anti-idiotypiques ne précipitent ni le sérum prélevé avant toute immunisation chez le lapin donneur d'immunosérum anti-SAH, ni les sérums anti-SAH de 7 autres lapins. Un seul des deux sérums anti-idiotypiques a été utilisé dans ce travail, le second étant trop faiblement précipitant.

3.1. Isolement des anticorps dirigés contre des régions différentes de la sérumalbumine

Les fragments I et F₁ préparés respectivement par l'action de la cathepsine sur la sérumalbumine et par l'action de la trypsine sur le fragment I [15-17] ont été utilisés pour isoler des anticorps dirigés contre des régions différentes de la molécule de SAH:

Les anticorps anti-F₁ ont été isolés par adsorption sur PAB-F₁,

Les anticorps anti-I isolés par adsorption sur PAB-I ont été épuisés sur PAB-F₁ de manière à isoler les anticorps dirigés exclusivement contre les déterminants antigéniques de I qui ne sont pas sur le fragment F₁. Ces anticorps seront désignés par anti-(I-F₁).

De même, les anticorps dirigés contre les déterminants de la SAH qui ne sont pas portés par le fragment I, (anticorps anti-(SA-I)) ont été isolés en épuisant sur PAB-I des anticorps anti-SAH isolés par adsorption sur PAB-SAH.

Ces anticorps appartiennent à la classe des IgG; en effet, ils ont été isolés à partir des fractions du second pic de filtration sur Séphadex G-200 du sérum anti-SAH.

On dispose ainsi de trois fractions d'anticorps anti-SAH: anti-F₁, anti-(I-F₁), anti-(SA-I), dont la spécificité a été vérifiée par la méthode d'hémagglutination passive au moyen d'hématies de mouton auxquelles on a couplé soit la SAH, soit I, soit F₁, les résultats obtenus sont rapportés sur le tableau 1.

Tableau 1
Etude de la spécificité des fractions d'anticorps anti-F₁, anti-(I-F₁) et anti-(SA-I) par la méthode d'hémagglutination passive.

Antigène couplé aux hématies	Fraction d'anticorps testée	Concentration des anticorps (μg/ml)									
		1000	100	10...	1,25	0,6	0,3	0,15	0,07	0,03	0,015
SAH	Anti-F ₁				+	+	±	±	0	0	0
	Anti-(I-F ₁)				+	+	+	±	0	0	0
	Anti-(SA-I)				+	+	+	+	+	±	0
	Anti-SAH				+	+	+	+	+	±	0
I	Anti-(I-F ₁)				+	+	±	0	0	0	0
	Anti-(SA-I)	0	0	0							
F ₁	Anti-F ₁				+	±	0	0	0	0	0
	Anti-(I-F ₁)	0	0	0							
	Anti-(SA-I)	0	0	0							

+ Représente une réaction positive, ± une réaction ambiguë et 0 une réaction négative.

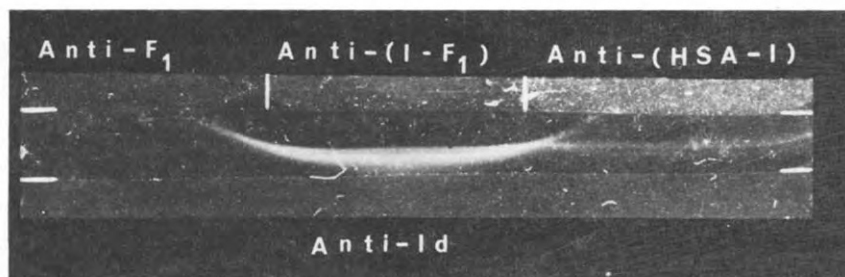


Fig. 2. Réaction de précipitation en milieu gélifié dans une cuve à faces parallèles (diffusion double) du sérum de lapin anti-idiotypique contre les anticorps anti-SAH (anti-Id, couche inférieure) avec trois fractions d'anticorps (couches supérieures): anticorps anti- F_1 à 1 mg/ml, anticorps anti-(I- F_1) à 1,2 mg/ml et anticorps anti-(SA-I) à 0,9 mg/ml. Les repères blancs indiquent les limites entre les différentes couches gélifiées. La fraction anti- F_1 n'est pas précipitée par l'immunsérum anti-idiotypique. Un idiotype qui se manifeste par une zone de précipitation est particulier à la fraction anti-(I- F_1). Un idiotype qui se manifeste par une zone de précipitation continue en regard des couches anti-(I- F_1) et anti-(SA-I) est commun à ces deux fractions. La disposition de ces 2 zones de précipitation est schématiquement représentée au-dessous de la photographie.

3.2. Etude comparative de l'idiotypie des anticorps dirigés contre des régions différentes de la sérum-albumine humaine

En milieu liquide, le sérum anti-idiotypique précipite les fractions anti-(I- F_1) et anti-(SA-I) mais ne précipite pas la fraction anti- F_1 .

La réaction comparée du sérum anti-idiotypique avec les trois fractions anti- F_1 , anti-(I- F_1) et anti-(SA-I) par précipitation en milieu gélifié selon la technique de diffusion double en cuve à faces parallèles est représentée fig. 2. Comme on pouvait s'y attendre d'après les réactions en milieu liquide, on n'observe pas de zone de précipitation en regard de la couche anti- F_1 . On peut dénombrer deux zones de précipitation en regard de la couche d'anti-(I- F_1) ce qui démontre la présence d'au moins deux idiotypes dans cette fraction. L'une de ces zones, la plus proche de la couche d'anti-(I- F_1) est continue avec celle que l'on observe en regard de la couche d'anti-(SA-I).

Si l'on s'en tenait à cette réaction, une partie des anticorps anti-(I- F_1) sembleraient posséder une spécificité idiotypique que l'on ne retrouve pas dans les deux autres fractions. Une autre partie de ces anticorps se comportent, dans la réaction en milieu gélifié, comme si leur spécificité idiotypique était la même que celle des anticorps anti-(SA-I). On peut conclure que les spécificités idiotypiques des anticorps contre (SA-I) qui sont précipités par le sérum anti-idiotypique

que se retrouvent sur les anticorps anti-(I- F_1).

Des précisions importantes ont été apportées par les réactions en milieu liquide. Si le sérum anti-idiotypique est épuisé par la fraction anti-(I- F_1) dans des proportions proches de l'équivalence, le liquide surnageant ne précipite plus la fraction anti-(SA-I). Par contre, comme on pouvait s'y attendre d'après les réactions en milieu gélifié, si on épuise le sérum anti-idiotypique par la fraction anti-(SA-I), le liquide surnageant précipite encore la fraction anti-(I- F_1) bien que moins fortement et plus lentement. Cependant, si la quantité de fraction anti-(SA-I) ajoutée au sérum anti-idiotypique est égale à quatre fois celle qui précipite ce sérum dans les conditions de l'équivalence, la précipitation de la fraction anti-(I- F_1) par le liquide surnageant est complètement inhibée.

La fraction anti- F_1 , qui ne précipite pas le sérum anti-idiotypique, inhibe partiellement la précipitation de la fraction anti-(I- F_1) par ce sérum; cette inhibition atteint un plateau à 30% (fig. 3). Des anticorps anti-idiotypiques ont pu être isolés (100 μ g) par passage du sérum anti-idiotypique (2 ml) sur un immunoadsorbant d'anticorps anti- F_1 (2 mg) couplés à du Biogel P-300; ces anticorps, qui ne précipitent pas les anticorps anti- F_1 , précipitent les anticorps anti-(I- F_1) et les anticorps anti-(SA-I).

Ces résultats conduisent à supposer que certains anticorps anti-(SA-I) possèdent des déterminants idio-

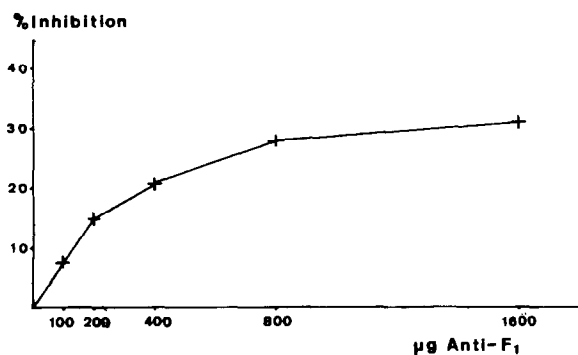


Fig. 3. Inhibition partielle, par la fraction anti-F₁, de la précipitation de la fraction anti-(I-F₁) (160 µg) par l'immunsérum anti-idiotypique (0,2 ml).

typiques (soit x, y, z) répartis sur des molécules différentes qui de ce fait ne sont pas précipitables par le sérum anti-idiotypique, alors que certains anticorps de la fraction anti-(I-F₁) qui possèdent les mêmes déterminants ou des déterminants x', y', z' peu différents de x, y, z, mais groupés sur les mêmes molécules, sont précipitables par le sérum anti-idiotypique. Dans cette hypothèse, certains des anticorps anti-F₁ ne possèdent que les déterminants x ou xy (ou x' ou x'y').

Si cette hypothèse est correcte, on doit s'attendre que la réunion artificielle de plusieurs molécules possédant séparément les déterminants x, y, z permette d'obtenir des complexes précipitables par le sérum anti-idiotypique. Ces complexes ont été obtenus en polymérisant par la glutaraldéhyde les différentes fractions de telle sorte que les polymères formés restent solubles. Ces polymères ont été séparés des

anticorps non polymérisés par filtration sur une colonne de Séphadex G-200 (fig. 1).

Les polymères de la fraction anti-F₁ (poly anti-F₁) et de la fraction anti-(SA-I) (poly anti-(SA-I)) sont très fortement précipités en milieu liquide par le sérum anti-idiotypique. On a vérifié que des polymères solubles d'IgG isolés du sérum prélevé avant toute immunisation chez le lapin donneur d'anticorps anti-SAH et que des polymères solubles d'anticorps anti-SAH de cinq autres lapins immunisés contre la SAH n'étaient pas précipités par le sérum anti-idiotypique.

La réaction comparée du sérum anti-idiotypique avec les trois fractions polymérisées d'anticorps anti-SAH par précipitation en milieu gélifié selon la technique de diffusion double en cuve à faces parallèles est représentée fig. 4. On observe une continuité totale des zones de précipitation en regard des couches de poly anti-(I-F₁) et de poly (anti-(SA-I)); la solution poly anti-F₁ présente une réaction croisée avec les anticorps qui précipitent les deux autres solutions. Le sérum anti-idiotypique épuisé soit par la solution poly anti-(I-F₁), soit par la solution poly anti-(SA-I) ne précipite plus les deux autres solutions; épuisé par la solution poly anti-F₁, il précipite encore les deux autres solutions, et ces réactions de précipitation ne peuvent pas être empêchées par un excès de poly anti-F₁.

On peut conclure que cet ensemble de résultats est très fortement en faveur de l'hypothèse formulée plus haut.

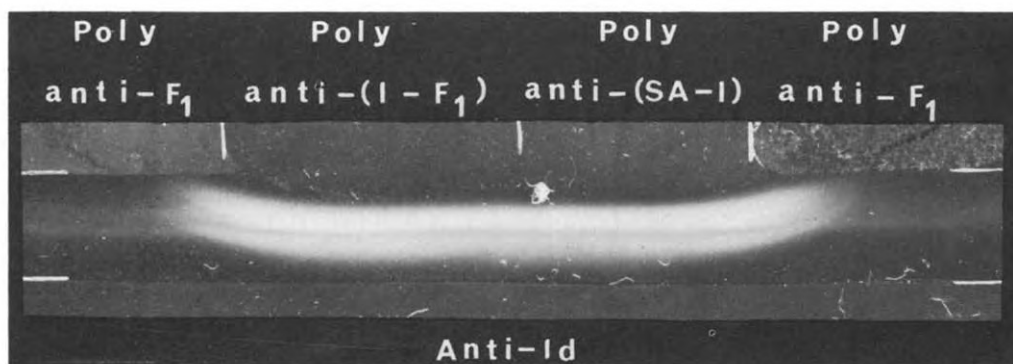


Fig. 4. Réaction, dans des conditions semblables à celles de la fig. 1, du sérum anti-idiotypique contre les anticorps anti-SAH (anti-Id, couche inférieure) avec trois fractions de polymères solubles aux couches supérieures. Ces trois fractions, toutes trois à la concentration de 1 mg/ml, sont celles des polymères des anticorps: anti-F₁ (poly anti-F₁), anti-(I-F₁) (poly anti-(I-F₁)), anti-(SA-I) (poly anti-(SA-I)). On observe une continuité des zones de précipitation en regard des solutions (poly anti-(I-F₁) et poly anti-(SA-I), la solution poly anti-F₁ présente une réaction croisée avec les anticorps qui précipitent les deux autres solutions.

3.3. *Immunoglobulines sans fonction anticorps décelable, possédant pourtant des spécificités idiotypiques qu'on trouve sur les anticorps anti-SAH*

Les fractions du deuxième pic dans la filtration de l'immunsérum anti-SAH sur Séphadex G-200 ont été épuisées sur le polymère insoluble de SAH. Cependant, à partir de ces fractions épuisées, il a été possible d'isoler des IgG par adsorption sur le polymère insoluble de sérum anti-idiotypique. Ces IgG n'agglutinent pas, même à 1 mg/ml, les hématies auxquelles on a couplé la SAH, alors que les anticorps anti SAH et anti-(SA-I) les agglutinent franchement à 0.07 μ g/ml; elles ne précipitent pas les polymères solubles de SAH, et ne se fixent ni sur le polymère insoluble de SAH, ni sur le PAB-SAH. Elles sont pourtant précipitables par les anticorps anti-idiotypiques qui ont été isolés sur un immunoadsorbant d'anticorps anti-SAH couplés à du "Biogel P-300".

Cette observation s'accorde avec celle qui avait déjà été faite lors de l'étude de l'idiotypie des anticorps anti-ovalbumine [13] de la présence, dans le sérum d'un lapin immunisé contre l'ovalbumine de Poule, d'immunoglobulines sans fonction anticorps décelable mais possédant les spécificités idiotypiques des anticorps présents dans le même sérum.

4. Discussion

La similitude idiotypique, démontrée par cette expérience, entre des anticorps dirigés contre des régions différentes de la molécule de SAH, ne peut pas être attribuée à la contamination d'une fraction par les constituants d'une autre fraction; il résulte en effet des résultats portés au tableau 1 que la fraction d'anticorps anti-(SA-I) n'est pas contaminée à plus de 6:10 000 par les anticorps anti- F_1 . De même, la fraction d'anticorps anti-(I- F_1) n'est pas contaminée à plus de 1.25:1 000 par les anticorps anti- F_1 .

Cette similitude ne peut pas être due non plus à la présence, et à la combinaison avec les anticorps des différentes fractions, d'immunoglobulines douées de la fonction anticorps à l'égard des IgG, sur lesquelles certains travaux ont insisté récemment [28, 29], et qui porteraient les déterminants idiotypiques trouvés communs aux différents anticorps. En effet, les composés solubles que cette possibilité suppose seraient faits d'au moins 2 molécules d'IgG. Dans la filtration

de l'immunsérum anti-SAH sur Séphadex G-200, ils auraient donc dû être exclus et sortir avec les fractions du 1er pic, comme le fibrinogène dont le poids moléculaire est sensiblement le double de celui des IgG et qui contient une proportion semblable de glucides. Or, on a vu que les anticorps utilisés dans la présente étude avaient été isolés à partir des fractions du second pic. D'autre part, d'après la réaction en milieu gélifié représentée fig. 2, il faudrait supposer que les immunoglobulines anti-IgG sont en mesure de se combiner à des anticorps dirigés contre certains déterminants de la SAH et non à des anticorps dirigés contre d'autres déterminants.

La similitude idiotypique observée entre des anticorps dirigés contre des déterminants antigéniques distincts situés en des endroits différents de la molécule de SAH, similitude déjà observée dans l'idiotypie des anticorps contre le fibrinogène humain [14], conduit à supposer qu'un antigène (défini comme une espèce moléculaire) doit intervenir dans son entier lors d'un événement primordial du processus immunitaire.

Cette expérience montre également, comme on l'avait déjà observé dans l'étude de l'idiotypie des anticorps contre le fibrinogène humain [14], que la répartition moléculaire des mêmes déterminants idiotypiques peut être différente dans des fractions d'anticorps de spécificités différentes. Cette observation serait compatible avec l'hypothèse selon laquelle le sérum anti-idiotypique reconnaît, d'une part des déterminants idiotypiques portés par une chaîne légère donnée, d'autre part des déterminants idiotypiques portés par une chaîne lourde donnée; les anticorps qui seraient constitués de l'assemblage de ces deux chaînes possèderaient un nombre de déterminants idiotypiques suffisant pour qu'ils soient précipités par le sérum anti-idiotypique, alors que les anticorps qui ne possèderaient dans leur structure tétracaténaire que l'une ou l'autre de ces chaînes ne seraient pas précipitables par le même sérum anti-idiotypique. Cette situation serait semblable à celle qui a été décrite au sujet du comportement particulier de certains anticorps anti-allotypiques [30]. Cette hypothèse ne serait naturellement pas suffisante si les déterminants idiotypiques qui se trouvent réunis sur une même molécule d'anticorps IgG étaient, dans une autre fraction, répartis sur plus de 2 molécules. Il faudrait alors envisager un autre mécanisme qui n'excluerait pas nécessairement le premier. Si les cellules qui synthétisent des anticorps

dirigés contre des déterminants différents du même antigène ont une origine commune, on peut imaginer que la différenciation de ces cellules à partir du (ou des) précurseur(s) commun(s), différenciation qui conduit à la spécialisation d'une cellule dans la synthèse d'un anticorps de spécificité donnée, s'accompagne de recombinaisons génétiques; ces recombinaisons auraient pu avoir pour effet que certaines cellules expriment les déterminants idiotypiques x, y, z, groupés sur les mêmes molécules d'anticorps alors que d'autres cellules n'exprimeraient que soit x, soit y, soit z, soit xy...

Remerciements

Je remercie le Dr. J. Oudin qui a inspiré ce travail et en a guidé le développement par ses nombreuses suggestions et par les discussions qu'il a souvent suscitées. Je remercie le Dr. C. Lapresle pour ses conseils et pour son aide sans laquelle ce travail n'aurait pu être entrepris.

References

- [1] J. Oudin, *J. Cell. Physiol.* 67 Suppl. 1 (1966) 77.
- [2] J. Oudin, *Proc. Roy. Soc. B* 166 (1966) 207.
- [3] J. Oudin et M. Michel, *Compt. Rend.* 257 (1963) 805.
- [4] H.G. Kunkel, M. Mannik and R.C. Williams, *Science* 140 (1963) 1218.
- [5] J. Oudin et M. Michel, *Compt. Rend.* 268 (1969) 230.
- [6] J. Oudin and M. Michel, *J. Exp. Med.* 130 (1969) 595.
- [7] J. Oudin and M. Michel, *J. Exp. Med.* 130 (1969) 619.
- [8] P.G.H. Gell and A.S. Kelus, *Nature* 201 (1964) 687.
- [9] D.G. Braun and R.M. Krause, *J. Exp. Med.* 128 (1968) 969.
- [10] J. Oudin and G. Bordenave, *Nature New Biol.* 231 (1971) 86.
- [11] J.B. Winfield, J.H. Pincus and R.G. Mage, *J. Immunol.* 108 (1972) 1278.
- [12] H. Daugharty, J.E. Hopper, A.B. MacDonald and A. Nisonoff, *J. Exp. Med.* 130 (1969) 1047.
- [13] J. Oudin and P.A. Cazenave, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 68 (1971) 2616.
- [14] P.A. Cazenave and J. Oudin, *Compt. Rend.* 276 (1973) 243.
- [15] C. Lapresle et T. Webb, *Ann. Inst. Pasteur* 99 (1960) 523.
- [16] T. Webb and C. Lapresle, *Biochem. J.* 91 (1964) 24.
- [17] C. Lapresle and T. Webb, *Biochem. J.* 95 (1965) 245.
- [18] S. Avrameas and T. Ternynck, *Immunochemistry* 6 (1969) 53.
- [19] D.H. Campbell, E. Luescher and L.S. Lerman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 37 (1951) 575.
- [20] S. Avrameas and T. Ternynck, *J. Biol. Chem.* 242 (1967) 1651.
- [21] M. Stanislawski and G. Coeur-Joly, *Biochimie* 54 (1972) 203.
- [22] T. Ternynck and S. Avrameas, *FEBS Letters* 23 (1972) 24.
- [23] J. Oudin, *Compt. Rend.* 222 (1946) 115.
- [24] J. Oudin, *Ann. Inst. Pasteur* 89 (1955) 531.
- [25] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall, *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265.
- [26] S. Avrameas, B. Taudou and S. Chuilon, *Immunochemistry* 6 (1969) 67.
- [27] P.A. Cazenave, en préparation.
- [28] K. Aho and O. Wager, *Ann. Med. Exp. Biol. Fenn.* 39 (1961) 79.
- [29] V.A. Bokisch, D. Bernstein and R.M. Krause, *J. Exp. Med.* 136 (1972) 799.
- [30] J. Oudin, *Compt. Rend.* 254 (1962) 2877.